

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861556

研究課題名(和文) Wnt経路に基づいた老人性内耳障害の解明

研究課題名(英文) Involvement of Wnt-pathway in aging-related inner ear dysfunction

研究代表者

森鼻 哲生 (Morihana, Tetsuo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80634170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：内耳の発生に関するシグナル伝達経路ウイント(Wnt)が老化にも関与しているとの仮説を立てた。研究では、wntが不活化したC1q遺伝子欠損マウスを用い、加齢にともなう内耳障害の評価を行った。mRNAやタンパクの発現確認はin-situ-hybridizationや免疫染色を利用した。生理機能検査では聴覚検査(ABR)と、我々が開発した平衡検査(VOR)を用いた。それらの結果、加齢による内耳障害にはWntの関与は否定的との結果が得られた。マウスの内耳機能評価でABRだけでなくVORを同時に行えることは、蝸牛と前庭の両方の評価が可能となり今後の内耳機能研究に大いに役に立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We made a hypothesis that Wnt pathway plays any roles in aging-related inner ear dysfunction. Little expression of wnt-related genes was detected in aged WT mice. Using C1q-deficient mice, hearing and balance functions were simultaneously evaluated using ABR and VOR devices. Although our hypothesis was denied from the results, the availability of simultaneous evaluation of both ABR and VOR in mice was shown.

研究分野：聴覚

キーワード：加齢 難聴 前庭機能 ウイント

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う難聴と平衡障害は高齢者の QOL に多大な影響を及ぼしており、今後解決すべき重要な問題である。ところで加齢性変化にウイント (Wnt) の古典的経路が関与することはすでに報告されている (参考文献 1)。さらに内耳において Wnt は発生や成熟化に関与することも報告されている (参考文献 2、3)。以上から内耳の老化にも Wnt が何等かの関与をしており、治療のターゲットになるのではと我々は仮説を立てた。

2. 研究の目的

(1) 加齢マウスの内耳における Wnt 関連遺伝子 (タンパク) の発現を確認し、加齢性難聴を起こす野生型マウスと C1q 欠損マウス (Wnt 経路が不活化している) を用いて種々の生理実験をおこない、内耳の加齢変化における Wnt の関与について検討することを目的とした。

(2) また同時に、我々が以前独自に開発した、マウスの前庭動眼反射 (VOR) 測定を (聴性脳幹反応) ABR と同時に行い、動物における聴覚と平衡覚の同時評価を安定的に施行することも目標とした。

3. 研究の方法

加齢難聴を自然発症することが知られている C57BL6/J 系統の高齢マウスにおいて、内耳における Wnt 関連物質の発現を、mRNA レベルでは、RT-PCR を用いて、さらに in-situ-hybridization や免疫染色を用いて確認する。野生型高齢マウスおよび Wnt の古典経路が不活化された C1q 欠損マウス (高齢) を用いて、ABR による聴覚検査と同時に、VOR を用いた前庭機能評価を行う。上記結果より総合的に、加齢内耳障害における Wnt の関与について検討する。

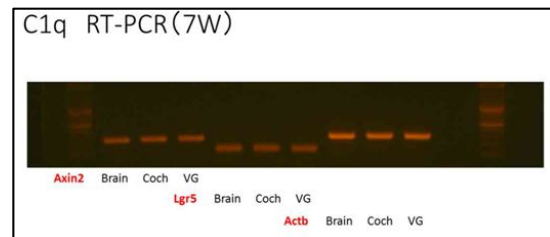
4. 研究成果

(1) 高齢難聴モデルの作成、ABR による聴覚検査、VOR 検査装置の安定化
我々が以前に開発したマウス VOR 測定装置の運用を安定化させ、ABR による聴覚閾値測定と同時に VOR による前庭機能評価を速やかに行えるようになった。

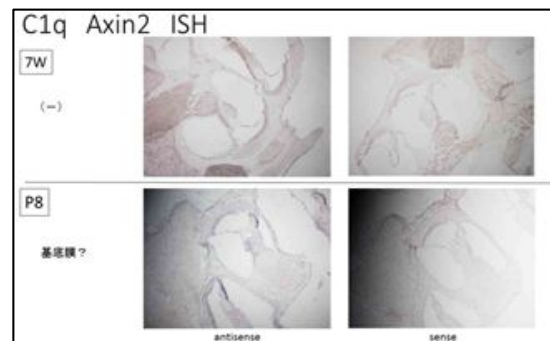
(2) 野生型マウスにおける、Wnt 関連遺伝子 (タンパク) の内耳における発現

確認

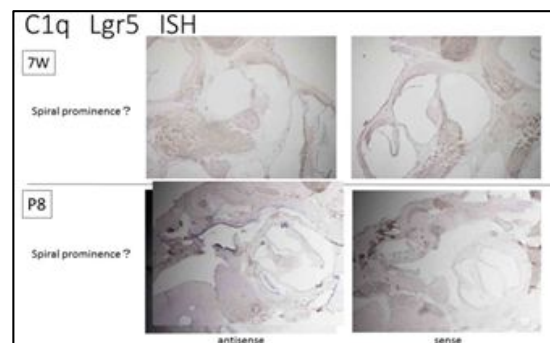
アダルトの野生型マウスにおいて、Wnt 関連物質の、Axin2 や Lgr5 の発現を確認した。手法としては、RT-PCR、in-situ hybridization、免疫染色法を用いた。結果、RT-PCR では蝸牛や前庭神経節での発現を認めしたが、in-situ hybridization、免疫染色法では、わずかな発現にとどまった。



(RT-PCR : Axin2 および Lgr5 は蝸牛と前庭神経節で明らかな発現をみとめる)

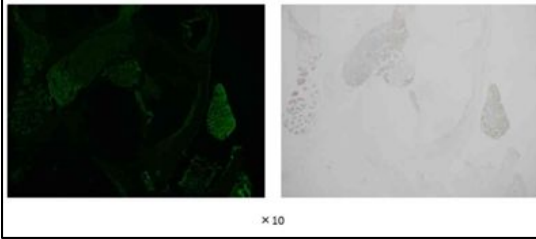


(in-situ hybridization : Axin2 の発現をわずかに認める)



(in-situ hybridization : Lgr5 の発現をわずかに認める)

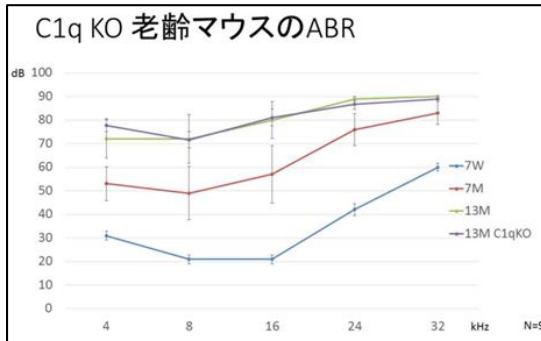
Axin2 免疫染色(7W)



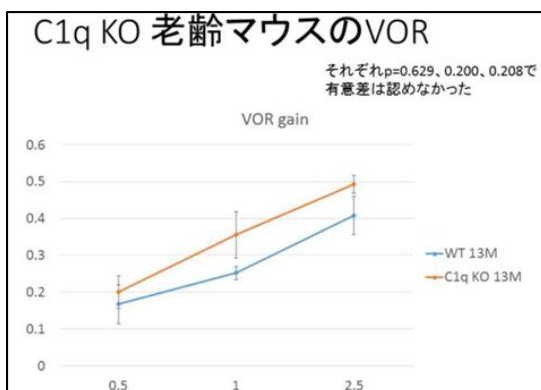
(免疫染色: Axin2 の発現は認めず)

(3) 相当数のマウスを用いた、老化 C1q 欠損マウスの生理実験

ABR においては、同月齢の野生型マウスと比べ閾値に有意差を認めなかった。VOR においても、同月齢の野生型マウスと比べ有意差を認めなかった。(n=9)



(ABR: 聴覚閾値に有意な差をみとめず)



(VOR: 前庭動眼反射において有意な差をみとめず)

(4) 考察

以上の結果より、高齢マウスの内耳において、タンパクレベルでは Wnt 古典経路の関連物質は明らかには活性化されておらず、生理実験の結果からも、野生型マウスと C1q 欠損マウスの中に内耳機能の有意な差を結局は認めなかった。つまり、

加齢にともなう内耳障害には、Wnt の古典経路の関与は否定的であると考えられた。

ところで最近では、内耳の再生において Wnt 関連物質の必要性が指摘されており(参考文献 4) 今後は Wnt のなかでも古典経路以外の pathway に注目する必要性が示された。

(5) ABR と VOR 同時評価の有用性

さらに、今回の検討のように、マウス内耳機能評価において、ABR だけでなく VOR の測定も同時に安定的に行えるようになったことは、蝸牛と前庭の両方の評価が可能となり、今後の内耳機能研究に大いに役に立つと考えられる。

引用文献;

(1)

Naito AT, Sumida T, Nomura S, 他, Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes.

Cell. 2012 Jun 8;149(6):1298-313.

(2)

Chai R, Xia A, Wang T, 他

Dynamic expression of Lgr5, a Wnt target gene, in the developing and mature mouse cochlea.

J Assoc Res Otolaryngol. 2011 Aug; 12(4):455-69.

(3)

Geng R, Noda T, Mulvaney JF, 他

Comprehensive Expression of Wnt Signaling Pathway Genes during Development and Maturation of the Mouse Cochlea.

PLoS One. 2016 Feb 9;11(2):e0148339.

(4)

Romero-Carvajal A, Navajas Acedo J, Jiang L, 他

Regeneration of Sensory Hair Cells Requires Localized Interactions between the Notch and Wnt Pathways.

Dev Cell. 2015 Aug 10;34(3):267-82.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

第 34 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス
研究会 2016 年 8 月 27 日 ホテルグラ
ンヴィア大阪

発表者 花田有紀子 森鼻哲生

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森鼻 哲生 (MORIHANA, Tetsuo)

大阪大学大学院医学系研究科

耳鼻咽喉科・頭頸部外科学・助教

研究者番号 : 80634170

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

・花田 有紀子

・滝本 泰光

大阪大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉
科・頭頸部外科学

大阪大学大学院医学系研究科 神経細胞生
物学