

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861381

研究課題名(和文)リーリン変異動物を用いたオリブ蝸牛束の構築異常と内耳保護機構の解明

研究課題名(英文)Olivocochlear neuron central anatomy and function in Dab-1 deficient mice

研究代表者

井之口 豪 (INOKUCHI, GO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10457046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オリブ蝸牛束は音響刺激に対するフィードバック作用を有し、外有毛細胞の音響増幅を抑制する内耳保護作用を有すると考えられている。Dab1はReelinシグナル経路の下流に存在し、Dab1遺伝子異常マウスでは大脳皮質ニューロンのradial migrationに異常をきたす。今回、Yotariマウスの蝸牛に逆行性トレーサーとしてCTBを注入し、上オリブ核の局在を検討した。Homo個体では内側オリブ蝸牛束ニューロンの位置異常を認めた。またHomo個体では生後8週時点でABRの閾値上昇を認めた。Yotariマウスではオリブ蝸牛束のフィードバック機能が働かず、早期から難聴が進行すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Medial olivocochlear neurons (MOC) originate in the superior olivary complex and project to the cochlea. MOC neurons have a role in acoustic efferent feedback, which suppresses the cochlear amplification of outer hair cells. In the present study, we use the different Dab1-deficient mice (yotari) and investigate the position of MOC neurons in ventral nucleus of trapezoid body (VNTB). Immunohistochemistry revealed that MOC neurons were absent in VNTB and scattered around the motor vestibular nucleus. Auditory brainstem response (ABR) showed the elevated threshold of hearing only in mutated mice. Thus, Dab-1 mutated mice are lack of MOC feedback, which has a protective effect of cochlea against surrounding noise. Dab-1 mutated mice could be the model of accelerated age-related hearing loss due to MOC feedback.

研究分野：神経解剖学

キーワード：オリブ蝸牛束 Reelin Dab1 聴力障害

1. 研究開始当初の背景

オリブ蝸牛束は脳幹から内・外有毛細胞へ投射する遠心性線維であり、上オリブ核外側核 (LSO) からは内毛細胞へ、上オリブ核内側核 (MSO) からは外有毛細胞へそれぞれ投射している。

オリブ蝸牛束は音響刺激に対してフィードバック作用を有し、外有毛細胞の音響増幅を抑制する効果やや両耳からの音入力を調整して音源定位を可能にする働きなどがあると考えられているが、難聴の予防に関する働きについては未解明な部分が多い。

リーリンは皮質ニューロンの位置決定に重要な役割を果たす分泌性蛋白である。リーラマウス、Shaking rat Kawasaki (SRK) などのリーリン変異動物では、カハール・レチウス細胞が分泌するリーリンがないために、大脳皮質のインサイド-アウト構造が乱れ、特に第 V 層皮質脊髄路ニューロンは皮質のほぼ全層に分布するといった異常を示す。脳幹の運動性神経核ニューロンの腹方移動・位置決定におけるリーリンシグナル系の詳細な機能は明らかにされていない。

Dab1 は Reelin シグナル経路の下流に存在し、Dab1 遺伝子異常マウス (Yotari マウス) では大脳皮質ニューロンの radial migration に異常をきたし、リーラマウスと同様のフェノタイプを示す。これまで Reelin, Dab1 異常マウスにおける聴覚経路についての研究は殆ど行われていない。

2. 研究の目的

加齢に伴う難聴は蝸牛の変化とされてきたが、近年の耳音響反射 (OAE) を用いた研究により、より中枢の神経学的な変化、特にオリブ蝸牛束の反応低下が先行することが知られている。

申請者らはこれまでリーリン変異動物における脳幹の神経核の位置異常について研究を行ってきたが、聴覚の中枢である上オリブ核については、先行研究が少なく、オリブ蝸牛束の構築については胎芽の研究で異常が示唆されていたのみであった。また、リーリン変異動物の聴力についてはこれまでほとんど評価されたことがなかった。

そのため、今回の研究では生後のリーリン変異マウスにおけるオリブ蝸牛束の構築異常を明らかにし、胎芽の研究では不可能であった聴覚についての評価を行った。蝸牛形態、オリブ蝸牛束の構築、聴覚の評価をすべて行うことで、オリブ蝸牛束の難聴に対する影響を明らかにし、中枢性の難聴進行モデルを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生後 7-10 週齢の Yotari マウスの Homo と Wild 個体を用いた。深麻酔下に左耳後部を皮膚切開し、左蝸牛の中回転付近で開窓し、逆行性トレーサーとして 10%CTB (コレラトキシンサブユニット B) を 0.5-1.0 μ l を注入し、24-48hr 後に再び深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドで経心還流固定を行い、抜脳した。4%パラホルムアルデヒドで 2 時間後固定の後、20%スクロースに浸潤させた。フリージングマイクロトームを用いて 40 μ m の凍結切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。一次抗体として CTB 抗体、ChAT (コリンアセチルトランスフェラーゼ) 抗体を用いた。二次抗体は Anti-goat IgG、その後は ABC キット (Vector 社) とジアミノベンチジン (DAB) による免疫組織学的染色を行った。

(2) 同様の生後 7-10 週齢の Yotari マウスおよび Wild 個体 (B6 background) を用いた。midazolam 10 mg/kg, medetomidine 37.5 mg/kg, and butorphanol tartrate 0.5 mg/kg を混合した麻酔薬を腹腔内に投与し、深麻酔下に聴性脳幹反応 (ABR) の閾値を 4KHz、8KHz、16KHz の 3 周波数で測定した。

4. 研究成果

(1) マウス蝸牛へのトレーサー注入
マウスの蝸牛へのアプローチには前庭窓經由、蝸牛窓經由、蝸牛開窓の 3 つが考えられるが、過去の報告では蝸牛開窓が最も安定した結果であったため、蝸牛開窓の手技を確立した。まず深麻酔下にマウス左耳後部を皮膚切開し、中耳骨胞を露出、中耳腔を開放した。その後、顕微鏡下に蝸牛中回転に小さな錐を用いて約 1mm の開窓し、ハミルトンシリンジを用いて CTB の注入を行った。

マウス蝸牛



図 1. マウス蝸牛

左点線が蝸牛の開窓部
アブミ骨動脈の損傷を避けるため、中回転に開窓する手技を確立した。

(2) CTB 免疫染色 (逆行性トレーサー実験)
左蝸牛に CTB を注入したマウスの脳標本を作製し、上オリブ核レベルでの冠状断、凍結切片を作成し、CTB 抗体で免疫染色を行った

(図 1)。Wild では注入側の LSO (Lateral superior olive) と反対側の MVPO (medioventral periolivary) に標識を認めた。Yotari (Homo) 個体では注入側の LSO には標識を認めたが、反対側の MVNO には標識を認めなかった。

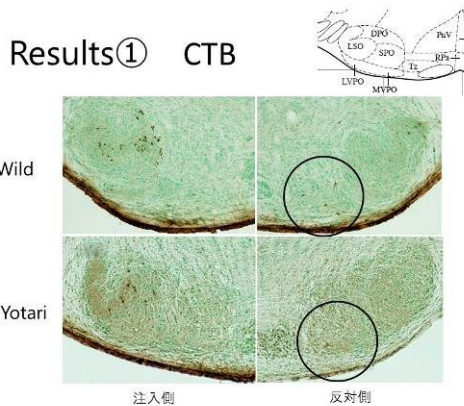


図 1 注入側の LSO には Homo, Yotari とともに標識を認める。反対側の Yotari では MVNO に標識を認めない。

また顔面神経膝部の近傍に前庭神経運動核が存在し、蝸牛への注入により CTB で標識される。Wild 個体では通常は 8 個程度のニューロンが標識されるのに対し、Homo 個体では約 20 個のニューロンが広い範囲に散在していた(図 2)。これは MVNO へ腹側移動できなかった遠心性ニューロンが、前庭神経運動核近辺に取り残された結果だと考えられた。

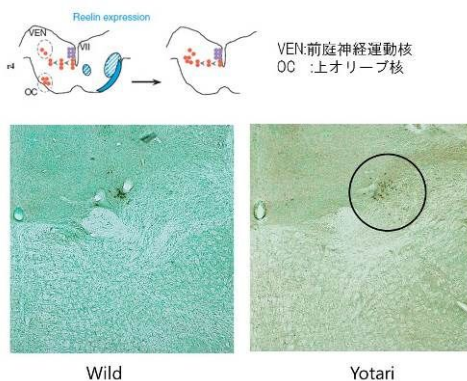


図 2 顔面神経膝部の頭側に前庭神経運動核を認める。

以上の結果より、CTB を蝸牛内に注入する手技は確立できていることが確認できた。また、MOC ニューロンの交差性線維が蝸牛へ投射していないことが判明した。

(3) ChAT 抗体による免疫染色

アセチルコリンエステラーゼ抗体 (ChAT 抗体) を用いて、同じ脳幹レベルの切片の免疫染色を行った。蝸牛への注入手技を伴わないため、両側とも Homo 個体では LOC に染色されるニューロンを認め、MVNO の MOC ニューロ

ンは標識されないという結果を認めた(図 3-1)。比較対象のためにニッスル染色を用いて上オリーブ核の断面を比較したが、MVNO のニューロン数が少なく見えるものの、ChAT 抗体染色時のような顕著な差は認めなかった(図 3-2)。

Results② ChAT抗体

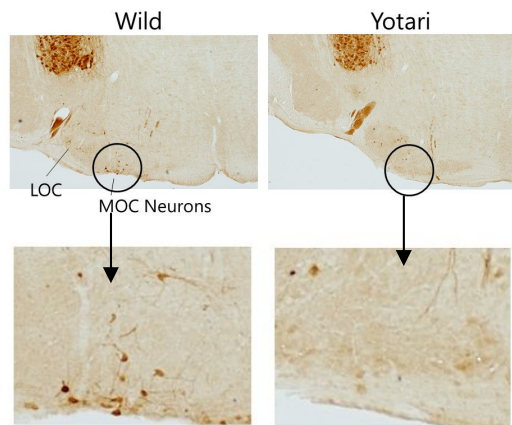


図 3-1. ChAT 抗体を用いて免疫染色を行った上オリーブ核の冠状断面

LOC には両側とも ChAT 抗体で染色されるニューロンを認めるが、MNTV の MOC ニューロンは Yotari マウスでは認めない。

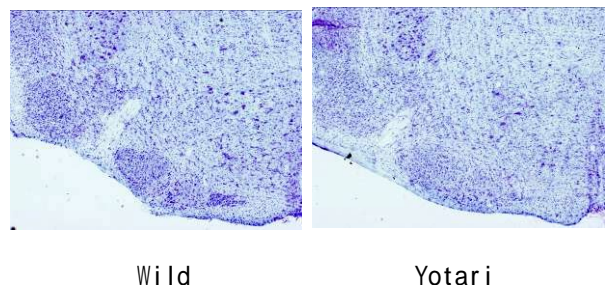


図 3-2. 上オリーブ核の断面 (ニッスル染色)

Wild type に比して Yotari では LSO と MSO の境界が不明瞭であり、MSO のニューロンが不明瞭化している。

(4) 蝸牛切片の検討

以上の結果より、MOC (medial olivocochlear bundle) ニューロンが第四脳室近傍から外側へ遊走し、その後腹側へ移動する過程において、腹側移動ができずに前庭神経運動核近傍に取り残されたと考えられた。MOC ニューロンの位置異常が存在するため、オリーブ蝸牛束の蝸牛保護作用が働かないことが想定された。そのため、調整脳幹反応 (ABR) による聴力評価と蝸牛の形態についての検討を行った。

摘出した蝸牛のパラフィン切片を作成し、H-E 染色を行った。コルチ器の形態およびらせん神経節の形態については、Wild 個体と Homo 個体での差は認められなかった(図 4)。Reelin および Dab-1 は大脳および脳幹の神経核の遊走には関与しているが、蝸牛の形態形成に影響するという報告はない。形態学的に変化を認めなかった結果より、Yotari マウスの聴力障害は内耳よりも中枢で発生している可能性が示唆された。

蝸牛切片 H-E

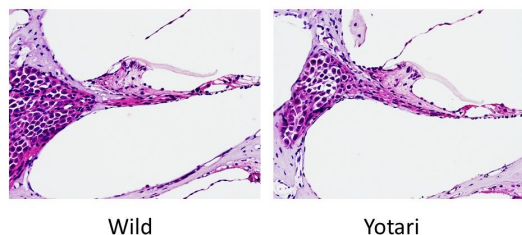


図 4-1 . 蝸牛切片 (コルチ器, H-E 染色)

蝸牛切片 H-E②

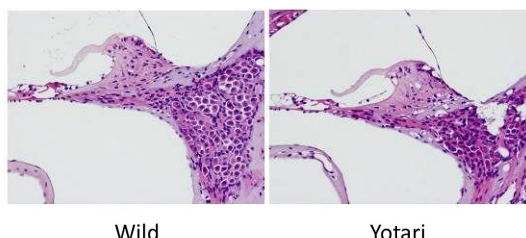


図 4-2 . 蝸牛切片 (らせん神経節, H-E 染色)

コルチ器(図 5-1)およびらせん神経節の形態に明らかな差は認めない。らせん神経節細胞数(図 5-2)は Yotari が若干少なく見える写真であるが、他の切片も含めた神経細胞数では明らかな差は認めない。

(5) Dab-1 欠損マウスにおける聴力評価
聴性脳幹反射 (Auditory Brainstem Response: ABR) を生後 7-10 週で Wild および Homo 個体に行った。その結果、8 KHz と 16KHz の周波数において、Homo 個体では ABR 閾値の有意な上昇を認めた(図 4)。Wild 個体でも加齢とともに難聴を認めるが、通常は 8 週齢では ABR 閾値の上昇は認めない。しかし、Homo 個体では特に音響外傷などの誘引なく、生後 8 週頃という比較的早期から難聴が進行するという結果が得られた。

Results③ ABR

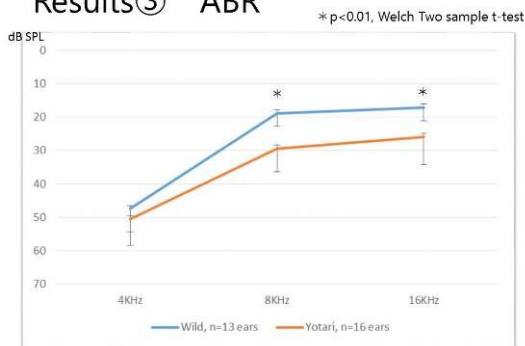


図 5. Yotari, Wild type それぞれの ABR 閾値を示す。8KHz および 16KHz の 2 周波数において、統計的に有意な ABR 閾値の差を認めた。

(6) 本研究の位置づけおよび展望

本研究では大脳の層構造の形成に重要な役割を果たす分泌性タンパク、リーリンのシグナルが欠損すると、聴覚の中枢である上オリーブ核の位置異常が生じることが確認された。外側オリーブ核には CTB の標識が確認された。そのため、オリーブ蝸牛束の線維のうち、非交差性成分の LOC ニューロンには影響がなく、交差性成分の MOC ニューロンの位置にのみ選択的に位置異常が生じていることが判明した。

聴覚の加齢性変化はオリーブ蝸牛束 (MOC ニューロン) のフィードバックによる内耳保護機能が衰えると考えられている。そのため、このリーリン異常動物は蝸牛に異常を有さない、聴覚の加齢性変化のモデルとして有用である可能性が示唆された。

ABR によるリーリン異常動物の聴覚評価について、過去の報告では聴力のばらつきが多かったと結論付けられていた。しかし、本研究では測定時期を生後 7 - 10 週と比較的短い時間に限ることで、安定した結果が得られた。以前の報告でのばらつきは測定時の年齢に差が大きくあり、オリーブ蝸牛束の内耳保護機能が働かないため、早期に難聴が進行した結果、聴力にも大きな差が生じたと推測された。

当初、本研究ではこの内耳保護機能の解明のため、ABR だけではなく、耳音響反射 (OAE) による外有毛細胞の障害も定量化する予定であったが、実験装置の問題等の影響により、今回の研究期間中には実現できなかった。蝸牛形態に異常がなく、脳幹の障害から早期に難聴を来すモデル動物は貴重であり、今後も解析を継続していくことが重要である。今後はこの動物モデルを使用して、慢性的な音響外傷を負荷してその影響を検証したり、難聴の予防に有用な薬剤を探索したりできる可能性がある。

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)
投稿準備中

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 井之口 豪、薛 富義、吉川 知志、寺島 俊雄、四宮 瞳、山下 大介、丹生 健一
Dab1 遺伝子異常マウスにおけるオリープ蝸牛束の構築異常の解明
耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、2015. 8.29、ホテルグランヴィア大阪、大阪

〔図書〕(計 0 件)

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井之口 豪 (INOKUCHI GO)

神戸大学 大学院医学研究科 助教

研究者番号：10457046