

京都大学	博士 (医学)	氏名	嘉田 真平
論文題目	A mouse model for degeneration of the spiral ligament (ラセン靭帯変性マウスモデル)		
(論文内容の要旨)			
<p><はじめに></p> <p>哺乳類の内耳のラセン靭帯(SL)は5種類の線維細胞で構成され、内リンパ腔の高カリウムイオン濃度の維持と内リンパ電位(EP)の産生という聴覚にとって重要な役割を果たしている。その SL は、老人性難聴、音響外傷、遺伝性難聴、またメニエール病等で変性が報告されており、感音性難聴治療のターゲットとなり得る。すでに、ラットにおいて、SL が障害されるモデルは報告されているが、重要な機能的指標である EP は測定されていなかった。本研究の目的は、SL の再生による感音難聴治療の可能性を検討する研究の基盤となり得る、EP が低下したマウスモデルを確立することである。</p> <p><材料と方法></p> <p>動物は C57BL/6 マウス(59 匹)を用い、内耳障害は左後半規管にミトコンドリアにおけるコハク酸脱水素酵素阻害剤である 3-ニトロプロピオン酸(3-NP; 1, 3, 5, 10mM)を投与した。対照群には生理食塩水を投与した。薬剤の投与時には骨壁の小孔とチューブとの隙間をフィブリン糊で閉鎖した。</p> <p>聴性脳幹反応(ABR)測定を内耳障害処置前、内耳障害処置後 1 日目、7 日目、14 日目に行った。内耳障害処置後 14 日目の時点での EP 測定後に側頭骨を採取し、固定・脱灰の後、組織学的解析を行った。</p> <p>凍結切片に対して HE 染色を行い、血管条は蝸牛管に対する面積比、SL は5種類の線維細胞の細胞密度で評価し、また、Na,K-ATPase-α と Connexin26 の免疫染色を行い、機能蛋白の発現を評価した。内耳の他の部位は、ラセン神経節のニューロン密度と、内・外有毛細胞の単位距離あたりの残存数で評価した。</p> <p><結果></p> <p>5mM や 10mM の高濃度の 3-NP 投与群において、ABR の高度閾値上昇と EP の著明な低下を認め、組織学的に SL の細胞密度の著明な減少と基底回転における血管条の面積比の減少を認めた。またラセン神経節・有毛細胞の障害も認めた。3mM の 3-NP 投与群では、ABR の中等度閾値上昇と EP のおよそ半分(約 50mV)までの有意な低下を認め、組織学的に SL の細胞密度の減少を認めたが、血管条の面積比の減少は認めなかった。また頂回転のラセン神経節の障害、基底回転の外有毛細胞の障害も認めた。1mM の 3-NP 投与群では、ABR の高音域での有意な閾値上昇と EP の約 90mV までの有意な低下を認め、組織学的に SL の細胞密度の減少を認めたが、血管条の面積比の減少は認めなかった。またラセン神経節や有毛細胞の障害は認めなかった。</p> <p>Na,K-ATPase-α による免疫染色では、各群で血管条の染色性は保たれている一方で SL タイプ II 線維細胞領域の染色性が低下しており、また同領域の細胞密度も有意に低下していた。一方、各群で Connexin26 による免疫染色では、SL タイプ I 線維細胞領域の染色性には低下を認めず、細胞密度の有意な低下も認めなかった。</p> <p><考察と結論></p> <p>本障害モデルでは、濃度依存性の ABR 閾値上昇と EP 低下を認めた。高濃度 3-NP 投与群では蝸牛内全域の障害が著しく、各種治療の評価を行うには不適切と考えられた。一方で、1mM 投与群では SL 線維細胞のみが選択的に障害されているが、EP の低下は正常の 110mV からわずかに 20mV の低下のみで、ABR 閾値上昇も高音域に限定されており、各種治療による回復の効果判定</p>			

は難しくなることが想定される。3mM 投与群では、頂回転でのラセン神経節細胞の障害と基底回転での外有毛細胞の障害を伴っているため、ABR 閾値の完全回復は難しいが、周囲構造は比較的保たれつつ SL 障害があり、EP の低下も 50mV 前後と大きいため、各種治療による EP の回復の効果判定には適切なモデルと考えられる。また、SL 線維細胞の領域毎の評価により、タイプ II 線維細胞が 3-NP への感受性が高く、また EP と強く関連していることが示唆された。

本研究の成果を踏まえ、本モデルに対して細胞移植を行い、SL の組織学的・機能的な再生の評価を行う予定である。

(論文審査の結果の要旨)

蝸牛のラセン靭帯は、聴覚において必須である内リンパ高カリウム・高電位の維持・産生に重要な役割を果たす組織で、線維細胞で構成されている。老人性難聴、音響外傷、遺伝性難聴、またメニエール病による難聴でラセン靭帯の変性とそれに伴う聴力低下が報告されており、ラセン靭帯は、聴覚に不可欠な存在で、内耳再生による感音難聴治療の新たなターゲットとなり得る。

しかし、ラセン靭帯の再生研究を行うために必要となる「ラセン靭帯が選択的に変性する動物モデル」は確立されていなかった。今回、本研究により、ミトコンドリアにおける ATP 合成阻害剤 3-NP を内耳へ局所投与することによって、ラセン靭帯の選択的な変性とラセン靭帯の機能を反映する内リンパ電位と聴力の低下を伴ったマウスモデルが確立された。特にラセン靭帯の線維細胞の中でもミトコンドリアの豊富なタイプ II とタイプ IV の線維細胞が高度に変性しており、これらの細胞の重要性が示された。

一方で、ラセン靭帯が変性するよりも高濃度の 3-NP を投与した場合には、ラセン神経節は頂回転側、外有毛細胞は基底回転側が変性すること、また、血管条や内有毛細胞は比較的変性しにくいこと、が示され、ATP 枯渇に対する脆弱性が蝸牛内の各部位で異なることも示された。

以上の研究は、蝸牛ラセン靭帯の選択的変性モデルの作製方法の解明に貢献し、ラセン靭帯変性による感音難聴の新たな治療法の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成21年1月14日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降