

研究概要報告書

(1/3)

研究題目	騒音性内耳障害の分子生物学的機構に関する研究	報告書作成者	村井 紀彦
研究従事者	村井 紀彦、Mats Ulfendahl		
研究目的	<p>騒音・強大音の生体聴覚系に対する負荷は内耳障害を引き起こすが、この障害が可逆的で治癒するか、非可逆的で治癒しないかは負荷されたエネルギーの大きさと、生体がこれに対して示す防御的反応の如何による。幾つかの解剖学的部位と、即時的から数日間という広いスパンの刺激後経過時間において、聴覚系はこの障害に対する予防・拮抗・修復的機構を発動する。このうち障害発生後遷延性に起こる反応については、例えば蝸牛の血管条では、メラニン色素の異常を呈する遺伝性疾患における知見(Waardenburg. Am J Hum Genet 1951)や、白色および有色の実験動物が騒音に対して異なった受傷性を有するという報告(Barrenäs and Hellström. Ear Hear 1996)、活性酸素拮抗剤の投与による、アポトーシスを含む細胞障害の軽減を示唆する報告などから(Yamasoba et al. Brain Res 1999)、中間細胞のメラニン色素が強大音刺激の結果発生した活性酸素類の処理に関わっているのではないかと考えられている。カリウムイオン再循環経路の gap junction に関わる connexin 遺伝子、K-Cl トランスポーター遺伝子や、メラニン含有細胞内の転写因子 MITF microophthtalmia-associated transcription factor 遺伝子などが血管条の生理および発生に關与する遺伝子として知られているが、強大音という有害刺激によって惹起されるこの病態生理を制御する分子生物学的機構は、未解明の点が多い。本研究は、騒音性内耳障害の成立と自己防御に關与する遺伝子を同定することを目的として、音響負荷後に内耳組織において発現の変動を示す遺伝子を検索する。このような研究は、内耳、血管条の機能の解明にも必要である。また臨床的に意義深い点は、分子生物学的防御的機構の外因的増強が、現在有効な治療法が極めて限られている、老人性難聴をはじめとした感音性難聴に対する新しい治療戦略になりうるということである。</p>		

研究内容	<p><u>1. モデル作成:</u> 定量的化学反応による衝撃性音響負荷モデルを作成。</p> <p><u>2. 細胞死と転写活性に関する組織学的検討:</u> 障害モデルにおいて遺伝子転写活性の変化を確認するために、摘出した内耳の包埋標本切片において、各種の転写因子についてその活性化を免疫組織化学的手法により検索する。また同じ切片において DNA 断片化と実行相カスパーゼ活性化の状況を精査する。</p> <p><u>3. マイクロアレイ用 mRNA 試料の抽出:</u> 上記の vivo モデルの全蝸牛 homogenate から、マイクロアレイへの適用に耐える高品質の total RNA を抽出する。</p> <p><u>4. 抽出 RNA のマイクロアレイとの反応および解析:</u> 高品質の組織由来 total RNA を用いて、実験群、対照群それぞれ複数個の試料による遺伝子発現解析を行う。標識 RNA の調製、アレイとの反応、結果の解析、発現調節されている遺伝子の annotation の順に行う。</p>
------	--

研究概要報告書

(3 / 3)

<p>研究のポイント</p>	<p>本研究の特色は、これまでのところ報告のない、哺乳類音響外傷モデルにおける遺伝子発現調節のマイクロアレイによる検索という点である。マイクロアレイまたは同様の高スループット遺伝子発現解析システムにはいくつかの種類があり、それぞれ一長一短があるが、本研究では、独自の反応特異性検証方式をもち、広く世界的に用いられ、その利用の報告数が増加しており、協力施設と人材の利便性が高いシステムを採用し、満足すべき結果を得た。遺伝子発現調節解析実験においては、実際の音響外傷症例への臨床的応用可能性を視野に入れて、障害後のごく短い時間枠を採用した。</p>
<p>研究結果</p>	<p>障害後早期、晩期の複数の時期で観察した転写因子活性、実行相カスパーゼ、DNA 断片化標識の免疫組織化学的検討から、本障害モデルでは、蝸牛内の各垂部位(骨包、らせん靱帯、血管条、感覚上皮など)が、同じ障害刺激に対して、その機械的、代謝的役割に応じて異なった細胞内情報伝達経路を活性化させ、結果として、異なった時期に、異なった細胞死様式を呈することが示唆され、また遺伝子発現調節は相当早期から行われていることが示唆された。この点を踏まえて全蝸牛組織より Total RNA を抽出し、システムの指定する純化を行い、抽出手技の改良の結果、少数の蝸牛から一枚のアレイと反応させるのに十分な量の試料を作成することができた。試料は増幅の後、それぞれの増幅法での結果の直線性と感度を検討した。実験群、対照群各1個の試料を用いたパイロット実験の結果、2-fold 以上の発現変動を示す十分な数の遺伝子が同定されたため、次に各群3個の試料を用いて本実験を行い、多数の統計学的に有意な変動を示す遺伝子を同定し得た。このように病態モデル蝸牛におけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動調査実験モデルを確立することができた。</p>
<p>今後の課題</p>	<p>発現の変動が見られた遺伝子のアノテーション、未知配列の機能推測・検索、PCR、ISH、IHC による生物学的検証が行われている。対象となる遺伝子の数の絞り込みを行い、必要に応じて複数の共同研究施設と作業を分担する必要もあると思われる。培養細胞を使わずに、標的をより絞った実験を実現するために、蝸牛の microdissection 材料で再現性のあるデータが得られるか、試行を重ねる事も重要である。</p>

音響障害による蝸牛障害を、細胞死と、それに至る細胞内情報伝達に関わる転写因子の指標によって分析した。蝸牛は多くの細胞種からなり、複雑な機能を営んでいる。機械的な刺激に対する反応から見ると、基底板、らせん靭帯、蝸牛骨包は最も直接の刺激を受け、らせん唇とコルチ器も比較的直接的な刺激を受ける。らせん神経節はコルチ器の感覚細胞の興奮毒性などによる比較的間接的な障害を、また血管条は内リンパ液環境の変化という間接的な影響から障害を受ける。このような細胞障害様式、入力刺激の違いは、細胞障害の伝達様式、情報伝達分子の違いに反映され、さらに最終的な細胞の反応、細胞死様式の違いとなって現れることが分かった。

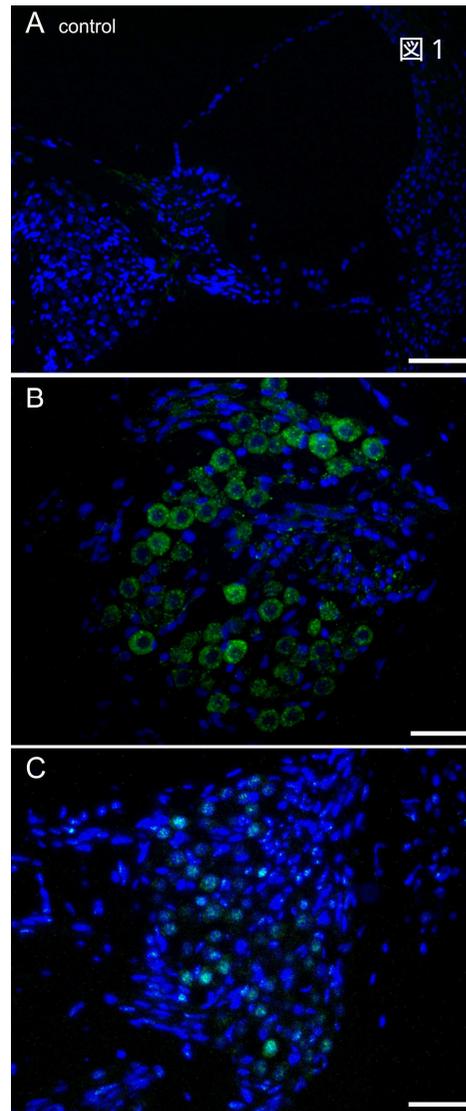
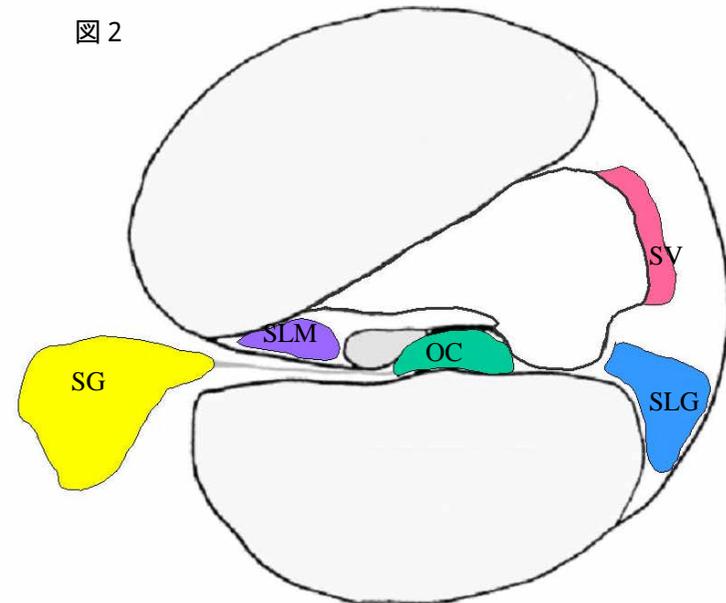


図 1

図 1 :らせん神経節における転写活性の時間推移による変化。青色は核染色、緑色はシグナル。A. コントロール蝸牛の全体像。シグナルを認めない。B. 障害後短時間群のらせん神経節では、大型の細胞体を有する細胞の核と周核領域にシグナルを認める。C. 障害後長時間群のらせん神経節では、シグナルはより核に局限しており、小型の細胞体の細胞にもシグナルが認められる。

図 2 転写活性と細胞死標識からみた蝸牛内亜部位の分類。SG. らせん神経節、SLM. らせん唇、OC. コルチ器、SLG. らせん靭帯 (中心下領域) SV. 血管条

図 2



全蝸牛から抽出したtotal RNAを用いて、音響障害によって発現調節される遺伝子を分析した。図は各群 1個の試料を用いたパイロット実験の結果である。各プロットは一つの遺伝子に対応し、横軸値は対照蝸牛における当該遺伝子の発現量のインデックスであり、縦軸は障害蝸牛におけるそれである。ここに抽出したプロットは、ここで用いた特定の解析システムによって両群間で 2倍以上の有意な発現差があると判定された遺伝子であり、その数は 300以上に登る。一般に、神経細胞などにおける障害の影響をみる実験系では、腫瘍細胞や腫瘍組織などの増殖が盛んな細胞を用いた実験におけるよりも、発現差のスケールは小さいことが多いと言われる。ここには示されていないが、全ての配列での散布図を作ると、ここで用いたシグナル定量化法では、散布図左下側でばらつきが大きく、発現量が低い遺伝子についてはその解釈に注意が必要である。

