



Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 細川, 誠二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1965

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 7 4 号	学位授与年月日	平成 21 年 12 月 11 日
氏 名	細 川 誠 二		
論文題目	Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct (ラット蝸牛管におけるコクリンの超微細構造的な局在)		

博士(医学) 細 川 誠 二

論文題目

Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct

(ラット蝸牛管におけるコクリンの超微細構造的な局在)

論文の内容の要旨

[はじめに]

COCH 遺伝子の変異は、非症候群性の遺伝性感音難聴を引き起こし、疾患はDFNA9と呼ばれている。コクリンは内耳に多量に存在しながら、いまだその役割は十分わかっていない。タイプ II コラーゲンは、内耳細胞外支持組織の重要な構成要素である。コクリンとタイプ II コラーゲンの、蝸牛管における超微細構造的な局在を、免疫電顕法を用いて示し、その生理学的及び病理学的役割について考察した。

[材料ならびに方法]

コクリンの電顕レベルでの局在を明らかにするため、以下の方法を用いた(免疫電顕法:2次抗体に標識している金粒子を可視化することで目的蛋白の局在を知る方法)。

一次抗体にはラットコクリンを特異的に認識するウサギ抗体を、二次抗体には 15 nm 金コロイド標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。ネガティブコントロールは、一次抗体として免疫していないウサギ IgG 抗体を用いた。Wistar rat を麻酔下で、4 %パラホルムアルデヒドと 0.1 %グルタルアルデヒドの混合液を用いて経心灌流固定した後、内耳を摘出し 4 °C で 2 時間固定した。Lowicryl K4M に包埋後、超薄切片を作成し、一次抗体に 4 °C で一晩、二次抗体と室温で 1 時間反応させてウラン鉛二重染色にて観察した。

[結果]

内耳蝸牛管のらせん板縁、内らせん溝細胞下、基底板、らせん隆起、らせん靱帯のすべての線維性組織において、コクリンとタイプ II コラーゲンの染色を認めた。抗コクリン抗体による染色は、基底膜やらせん靱帯では線維束に、内らせん溝細胞の下ではわずかに散乱した線維に認めた。らせん隆起の上皮細胞下の染色された線維は散在し、方向性を持たない状態であった。ネガティブコントロールでは染色を認めなかった。

[考察]

この研究は蝸牛におけるコクリンの局在を、電顕で示した初めての報告である。ラット蝸牛管において、コクリンとタイプ II コラーゲンの共局在を、細胞外マトリックスの線維性組織において認めた。Robertson らは、我々の使用したものと同一抗コクリン抗体を用いて DFNA9 の罹患耳で好酸性沈着物質が染色されることを発見し、沈着物質(変異コクリン)の経年的増加による関連構造破壊が難聴を引き起こすと推察した。これとは別に DFNA9 の罹患耳ではタイプ II コラーゲンが消失しているという報告があった。タイプ II コラーゲンは内耳では組織の形態を維持し、音の機械的エネルギーを柔軟に受け止める役割がある。今回の研究でコクリンとタイプ II コラーゲンの共局在が示されたことから、タイプ II コラーゲンはコクリン関連蛋白で、変異型コクリンにより障害を受ける蛋白の一候補であると考えられた。

DFNA9 難聴は成人に発症しゆっくりと進行していくことから、COCH 遺伝子の老人性難聴への関与が示唆されている。Schknecht らは、老人性難聴をいくつかのカテゴリーに分けた。それは感覚神経障害、血管条障害、蝸牛伝導性障害、それらの混合性障害そして不確定障害である。過去の報告によると、蝸牛伝導性障害では基底板の障害が老化に影響をきたすことが考えられている。Bukinova らは、血管条障害型老化モデルである Fischer 344 ラットのらせん靱帯において、タイプ II コラーゲンの免疫染色性の低下を示したが、基底板におけるコラーゲンの変化は認めなかった。しかし、両者が共局在するらせん靱帯で、タイプ II コラーゲンの変性があるとすれば、DFNA9 難聴と同じく、老化でも両者の共局在する基底板でタイプ II コラーゲンが変性している可能性があると考えられる。基底板は感覚細胞の電氣的・機械的変換のため、音により蝸牛管に発生した進行波により振動する。よってこの機械的振動性の低下は聴力低下の原因となりうる。しかし、上に述べたように老化に関して基底板の病理学はよくわかっていない。らせん靱帯の老化と同様に、基底板でのコクリンとコラーゲンの加齢変化を電顕的に解析し、COCH 遺伝子と老人性難聴の関係を証明することが今後の研究目標である。

[結論]

コクリンは内耳蝸牛管のらせん板縁、内らせん溝細胞下、基底板、らせん隆起、らせん靱帯など内耳の主要な部位に存在し、内耳の形態維持、音受容に役割のあるタイプ II コラーゲンと共局在していたことから、コクリンはタイプ II コラーゲンとともに働いて形態的機能維持に重要な役割を果たしていると考えられた。また、この共局在は DFNA9 と老人性難聴の病理解明の糸口のひとつになることが示された。

論文審査の結果の要旨

COCH 遺伝子の変異は、非症候群性の遺伝性感音難聴を引き起こし、その疾患は DFNA9 と呼ばれている。COCH 遺伝子がコードするタンパク質のコクリンは内耳に多量に存在しながら、いまだその役割は十分わかっていない。そこで、申請者はコクリンの、蝸牛管における超微構造的な局在を、免疫電顕法を用いて検討した。

その結果、内耳蝸牛管のらせん板縁、内らせん溝細胞下、基底板、らせん隆起、らせん靱帯のすべての線維性組織において、コクリンの染色を認めた。

本研究は蝸牛におけるコクリンの局在を、電顕で示した初めての報告である。ラット蝸牛管において、コクリンとタイプ II コラーゲンの共局在を、細胞外マトリックスの線維性組織において認めた。今回の研究でコクリンとタイプ II コラーゲンの共局在が示されたことから、タイプ II コラーゲンはコクリン関連蛋白で、変異型コクリンにより障害を受ける蛋白の一候補であると考えられた。また、この共局在は DFNA9 と老人性難聴の病理解明の糸口になることが示された。

審査委員会は、本研究は蝸牛におけるコクリンの局在を、電顕で示した初めての報告であることを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	佐藤 康二		
	副査	堀田 喜裕	副査	宮嶋 裕明