

学位論文

2型糖尿病モデルマウスにおける聴覚と内耳の
組織学的変化の検討

津田潤子

山口大学大学院医学系研究科
情報解析¹医学系専攻 耳鼻咽喉科学分野

(平成28年 11月)

目次

| | |
|------------|----|
| 1. 要旨 | 3 |
| 2. 諸言 | 4 |
| 3. 実験材料と方法 | 5 |
| 4. 結果 | 10 |
| 5. 考察 | 13 |
| 6. 結語 | 19 |
| 7. 参考文献 | 20 |
| 8. 図表 | 24 |
| 9. 図表の説明 | 30 |

1. 要旨

【諸言】糖尿病と感音難聴の関連は以前から指摘されており、糖尿病患者に難聴が合併する割合が高いことは多く報告されている。糖尿病が聴力障害を発症する機序は、これまでヒト側頭骨病理や糖尿病モデル動物を用いて検討されてきたが、いまだに解明できていない点が多く論議が続いている。我々は糖尿病における難聴発症の機序について、2型糖尿病モデルマウスである Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD) マウスおよび対照系統である Tsumura Suzuki Non-obesity (TSNO) マウスを用いて検討した。【方法】TSOD マウスおよび TSNO マウスを用いて、体重、血糖値、および聴覚の評価として聴性脳幹反応(ABR)を経時的に測定した。また各々の側頭骨を摘出し、病理組織学的に検討した。【結果】体重は TSOD マウスにおいて2か月齢から著しい増加を認め、13か月齢まで有意に高い値を示した。血糖値は TSOD マウスにおいて2か月齢から著明な高血糖を示し、7か月齢まで有意に高値を示した。ABRの閾値は TSOD マウスで8か月齢より有意な上昇を認めた。病理組織学的には TSOD マウスでは蝸牛軸の血管壁の肥厚と血管条毛細血管内腔の狭小化を認め、さらに血管染色を行うと血管条毛細血管の血管密度の減少を認めた。組織学的検討から TSOD マウスでは内耳への血流の低下が示唆された。【考察】我々の研究で用いた糖尿病モデルマウスでは、加齢に伴う難聴を早期から発症し、組織学的には血管条毛細血管の血管面積の減少を認め、蝸牛における慢性的な血流不全が難聴発症に関連している事が考えられた。

2. 諸言

食事や運動などの生活習慣の変化からわが国では糖尿病人口は増加しており、平成 24 年の厚生労働省による国民健康・栄養調査結果¹⁾によると糖尿病有病者は約 950 万人、糖尿病予備軍は約 1100 万人、併せて約 2050 万人と推計されている。日本糖尿病学会によると糖尿病は 1 型、2 型、その他の特定の機序、疾患によるもの、妊娠糖尿病の 4 つに分類されているが、わが国では 95%以上が 2 型糖尿病である。2 型糖尿病は内臓脂肪型肥満を背景に高血圧、脂質異常を伴うメタボリックシンドロームとも深く関係している。糖尿病を有する患者に難聴が合併することは、Jordao²⁾による糖尿病性昏睡後に聴力障害を訴えた報告が最初とされており、その後これまでに数多く報告されている。難聴は徐々に進行する左右対称性の高音漸傾型感音難聴が多いとされており、加齢性変化が早期から出現する可能性が示唆されている。糖尿病が聴力障害にどのように関与しているのか発症機序について、ヒト側頭骨モデルや動物モデルを用いた研究が多く存在しているが、いまだ見解は一致していない。今回糖尿病モデルマウスとして作成されたメタボリックシンドロームモデルマウスを用いて聴力障害とその発症に関係すると思われる内耳の組織学的変化について検討した。

3. 実験材料と方法

3.1. 動物

2型糖尿病モデルとして作出された Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD)マウス、および対照系統である Tsumura Suzuki Non Obesity (TSNO)マウス (財団法人動物繁殖研究所) を用いた。TSOD マウスはヒトの肥満型糖尿病に類似した病態を発症し、過食、重度の肥満、高血糖、高インスリン血症、高脂血症を認める³⁾。合併症として末梢神経障害による後肢運動機能障害や軽度の腎障害も認められる⁴⁾。QTLs(量的形質関連遺伝子)解析では肥満型糖尿病に関する複数の遺伝子座が明らかになっており、多因子遺伝でありヒトに類似している⁴⁾。また皮下脂肪の蓄積が比較的少なく、メタボリックシンドロームの病態で重要視される内臓脂肪の蓄積が多い肥満体形を呈し、東洋人の肥満に類似しているとされている⁴⁾。すべての実験は山口大学生命科学実験施設の許可を得た実施計画に基づいて行い、動物の愛護法、動物管理使用規則を遵守した。

3.2. 体重および血糖値の測定

TSOD および TSNO マウスの体重測定を各々2,5,7,10,13 か月齢で行った。またあわせて、血糖値の評価を Glucose Pilot (Aventiir Biotech, LLC, USA)を用いて、随時血糖で日中に測定した。

3.3. 聴性脳幹反応(auditory brain stem response, ABR)検査

ABR 検査を用いて聴覚生理学的検討を行った。塩酸メゾトミジン(1 mg/kg)、

キシラジン塩酸塩(2 mg/kg)、ペントバルビタールナトリウム(24 mg/kg)の混合麻酔薬を腹腔内投与し、全身麻酔を施行後に記録した。刺激は 10 cm のチューブをイヤホンに接続し、外耳道に挿入して行った。刺激音は 2 kHz, 4 kHz, 8 kHz のトーンバースト(rise-fall time 2ms, duration 4 ms)を用いた。加算回数は 500 回とした。ABR 記録装置は signal processor (Synax 1100, NEC Co., Tokyo, Japan)を用いた。白金針電極を用いて陽極を頭頂部、陰極を眉間正中中部、接地電極を体幹皮下に刺入し反応を記録した。ABR 閾値は、ABR 波形の 3 波もしくは 5 波を確認できる最も低い刺激を閾値とした。

3.4. 組織学的検査

5、8、9、13、17か月齢において、同様に混合麻酔薬による深麻酔後、4%パラホルムアルデヒドで経心灌流固定を行い、断頭して側頭骨を摘出した。摘出した側頭骨より蝸牛を取り出し、蝸牛の頂点と前庭窓を開けて、4%パラホルムアルデヒドを内耳腔内に注入し蝸牛を灌流固定した。固定された蝸牛をK-CX decalcification solution (Fujisawa, Osaka, Japan)に、常温で2日間浸漬し脱灰を行った。PBS (phosphate-buffered saline)で洗浄後、プラスチック包埋を行い、4 μ m厚で水平断の薄切切片を作製した。

HE (Hematoxylin-eosin)染色

Mayer's hematoxylin solutionに15分間浸し核染色を行い、30分間の流水水洗により色だしを行った。その後、eosin solutionに10分間浸し細胞質染色を行い、エタノールで脱水・脱色分別を行い、キシレンで透徹し、乾燥させたのちに封入した。

PAS (periodic acid-Schiff)染色

塗抹乾燥標本を蒸留水で水洗し、1%過ヨウ素酸水溶液に5分間浸し、蒸留水で水洗した。Schiff試薬に室温で30分間浸し、5分間の流水水洗を行った。

Mayer's hematoxylin solutionに 30分間浸し、流水水洗により色だしを行い、乾燥させたのちに封入した。

これらの標本は光学顕微鏡(BZ-8100; Keyence, Osaka, Japan)を用いて観察を行った。

蝸牛有毛細胞の同定

蝸牛コルチ器をsurface preparation techniqueにて摘出し、0.3%Triton X-100で10分間浸透させた。その後標本を1 μ g/ml fluorescein isothiocyanate-conjugated phalloidin (Sigma, St. Louis, MO, USA)に室温で1時間放置した。PBSでリンス後に蛍光顕微鏡(BZ-8100; Keyence, Osaka, Japan)を用いて観察を行った。

蝸牛外側壁血管の同定

9、17か月齢のTSODおよびTSNOマウス（各々n=2）を用いて、同じく混合麻酔薬による深麻酔後、開胸しIndia ink (Fount India; Pelikan, Feusisberg, Switzerland)を左心室に注入し経心灌流を行い、断頭して側頭骨を摘出し、蝸牛を取り出し前庭窓より4%パラホルムアルデヒドを内耳腔内に注入し蝸牛を灌流固定した。4%パラホルムアルデヒドで固定後にK-CX decalcification solution (Fujisawa)に常温で浸漬し脱灰を行い、PBSで洗浄したのちに、70%グリセリンの中に側頭骨が透明に見えるまで、2日間浸漬した。Surface preparation法を用いて観察試料を作成し、実体顕微鏡（SMZ-800,Nikon,Tokyo）および光学顕微鏡(BZ-8100; Keyence, Osaka, Japan)で観察した。また画像を撮影し、ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて蝸牛基底回転の血管条毛細血管の血管面積を比較した。

3.5. 網羅的遺伝子発現解析

総RNAの抽出はRNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen Ltd., Crawley, UK)を用いて行った。14か月齢のTSODおよびTSNOマウス(各々n=3)を用いて、深麻酔後に両側の側頭骨を摘出し、氷上で蝸牛を取り出した。蝸牛を破碎し溶解物を-80℃で保存しRNA抽出に使用した。RNAの量と質は分光光度計 (NanoDrop 1000; Thermo Scientific, Waltham, MA)と automated gel electrophoresis (Experion; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)により評価し

た。遺伝子発現はAffymetrix GeneChip mouse Genome 1.0 Array (Affymetrix, UK Ltd., High Wycombe, UK)を用いて検討を行った。

3.6. 統計学的解析

すべてのDataは平均値と±S.E.Mのerror barで表記した。統計学的解析はエクセル統計2006 for windows (Microsoft, Tokyo, Japan)を用いて行った。比較にはMann-WhitneyのU検定を用いた。P<0.05を有意とした。

4. 結果

4.1. 体重および血糖値

TSNOマウスおよびTSODマウスにおける体重および血糖値の経過を示す (Fig 1.)。TSODマウスは2か月齢より著しい体重増加を認め、5か月から10か月齢にかけて60 g を超える重度の肥満を呈した。13か月齢でゆるやかな体重減少を認めたが、いずれの月齢においても、TSNOマウスに比較して有意な体重増加を認めた。血糖値は2か月齢より200 mg/dℓ以上の高値を示し、7か月齢まで有意に高血糖を呈した。10か月齢では有意差は得られなかったものの、高い傾向を示した。13か月齢では血糖値に明らかな異常は認めなかった。

4.2. ABR検査

TSNOマウスおよびTSODマウスにおけるABR閾値の経過を示す (Fig 2.)。5か月齢までは両群に有意な差は認められなかった。TSODマウスでは2 kHzおよび4 kHzにおいて8か月齢より有意な閾値上昇を認めた。8 kHzでは10か月齢より有意な閾値上昇を認めた。

4.3. 組織学的検査

5か月齢および8か月齢では、血管条や有毛細胞およびらせん神経節を含めて明らかな差は認められなかった (Fig 3.)。8か月齢でSurface preparation techniqueを用いて蛍光染色で有毛細胞の形態を観察したが、外有毛細胞の状態

に差は認められなかった。13か月齢では蝸牛血管条の委縮や変性は認めなかったが、TSODマウスではTSNOマウスに比較して血管条毛細血管の内腔の狭小化を認めた。ラセン靭帯やラセン神経節細胞に差は認められなかった。蝸牛軸の血管を比較するとTSODでは一部の血管壁内にPAS陽性となる無構造の物質の沈着を認めた。9か月齢と17か月齢においてIndia inkを用い蝸牛の血管染色を行い、Surface preparation法を用いて蝸牛外側壁の血管の評価を行ったところ、TSODマウスでは血管条毛細血管の血管密度の低下を認めた(Fig 4.)。さらに血管条における毛細血管の血管面積を画像処理ソフトImageJを用いて評価したところ、TSODはTSNOと比較していずれの月齢でも有意に血管面積の縮小を認めた。

4.4. 内耳の発現変動遺伝子の網羅解析

糖尿病による内耳の発現遺伝子の変動について観察するため、TSODマウスとTSNOマウスの2群間において内耳の遺伝子発現の比較統計解析を行った。解析対象となる遺伝子数は28944である。P<0.01の条件を通過し、発現比>1.5(=Log2 ratio>0.585)および発現比<0.66(=Log2 ratio<0.585)の条件を通過する遺伝子数は521であった。遺伝子の階層型クラスタリングをPearson相関係数に基づき実施し、Z-scale化後の発現値を反映したHeatMap画像を作成した(Fig 5.)。TSODマウスではTSNOマウスに比較して、176の遺伝子が発現上昇しており、345の遺伝子が発現低下していた。さらにこれを発現比>2(=Log2 ratio

>1)および発現比<0.5(=Log2 ratio<-1)の条件で検討すると該当遺伝子数は153であり、TSODマウスでは39の遺伝子が発現上昇しており、114の遺伝子が発現低下していた。免疫や炎症に関与する遺伝子の変異を認め、TSODマウスでは栄養因子の発現低下を示し、炎症性サイトカインの発現増加を示した(Fig 6.)。

5. 考察

糖尿病モデルとしてメタボリックシンドロームモデルマウスを用いた本研究において、糖尿病は聴力障害の発症に関与する因子であることを示した。糖尿病と聴力障害の関連については、これまでも数多く報告されている。Austinらは、退役軍人を対象に165名の糖尿病を有する群と137名の糖尿病を有さない群で、聴力を比較検討したところ、糖尿病は聴力障害のリスクを増加させ、特に50歳未満で顕著となり、インスリン非依存性糖尿病では全周波数で聴力の差を認めた⁶⁾。またVaughanらは、5年間の前向き研究で、退役軍人を対象に342名の糖尿病を有する群と352名の糖尿病を有さない群で、聴力を比較検討したところ、60歳以下の糖尿病を有する群で加齢性難聴に類似する高周波数での聴力障害を認めると報告した⁶⁾。米国National Health and Nutrition Examination Survey(NHANES)における1999年から2004年にかけての大規模疫学調査で、399名の糖尿病を有する成人と4741名の糖尿病を有さない成人を比較すると、糖尿病群では有意に聴力障害の有病率が高かった。また中低音域では、難聴の有病率が糖尿病群では21.3%であったのに対して、非糖尿病群では9.4%、高音域では、難聴の有病率が糖尿病群では54.1%であったのに対して、非糖尿病群では32.0%であり、中低音域より高音域の聴力障害がより強く関連していると報告している⁷⁾。Kakarlapudiらは、12575名の糖尿病患者と53461名の非糖尿病患者を比較し、糖尿病患者において感音難聴を合併する割合が高く、また難聴

の重症度と血清クレアチニンに反映される糖尿病の重症度とは関連があり、内耳における細小血管障害の可能性について報告した⁸⁾。Uchidaらは、国立長寿医療センター研究所の老化に関する長期縦断疫学研究として、2004年から2006年の中高年齢2306名の地域住民における糖尿病と聴力障害の関係を調査し、糖尿病は聴力に負の影響を及ぼしていると報告した。またその効果は中年齢の特に高周波数域の聴力により影響を及ぼしており、老人性難聴の発症の時期を早めている可能性について示唆した⁹⁾。Olubunmiらは、18の論文を比較検討し、2型糖尿病群では少なくとも軽度難聴が合併する割合が、コントロール群と比較して統計学的に有意に高いと報告した。純音聴力検査による聴力閾値の平均は、糖尿病群ですべての周波数においてコントロール群と比較して高く、特に6000Hzと8000Hzで顕著であった。また年齢と糖尿病罹病期間が糖尿病関連難聴に重要な役割を果たすと報告した¹⁰⁾。Horikawaらは13の適切と考えられる研究からメタ解析を行い、糖尿病と聴力障害のオッズ比を2.15 (1.72-2.68) と報告した。またこのオッズ比は60歳以下の群で2.61であり、60歳を超えた群では1.58と、60歳以下の比較的若年者で有意差をもって高値であったと報告した¹¹⁾。

糖尿病と感音難聴の病態解明のためには、組織学的検討が重要となる。ヒト側頭骨標本の検討では、Fukushimaらが2型糖尿病症例の蝸牛病理所見について報告している。インスリン使用群では、基板および血管条の血管壁の厚さがすべての回転でコントロール群に比較して有意に肥厚していると報告した。経

口血糖降下薬群では、基底回転において血管条の血管壁の肥厚を指摘した。これらはいずれも糖尿病による細小血管障害の所見とした。また、血管条の変性および萎縮や基底回転における外有毛細胞の消失も指摘した。一方でらせん神経節細胞や内有毛細胞の有意な減少は認められないとした¹²⁾。

糖尿病の聴覚および蝸牛に対する影響は動物モデルでも検討されている。

Smithらは、ストレプトゾシン投与して作成したラットを用いて検討したところ、糖尿病性細小血管障害と関与していると考えられる基底膜の肥厚を報告した¹³⁾。またRaynorらは、ストレプトゾシン投与に騒音暴露を加えたラットにおいて、外有毛細胞の消失を報告した¹⁴⁾。しかしながら、これらのストレプトゾシン投与による糖尿病モデル動物はインスリン分泌を急激に低下させて生じる糖尿病であり、ヒトの肥満型糖尿病である2型糖尿病とは病態が異なることが考えられる。

2型糖尿病モデルとされる動物モデルでは、レプチン遺伝子欠損マウスである*Ob/ob mice*があり、これは肥満、高インスリン血症、高血糖をきたす。Leeらは*Ob/ob mice*を用いて聴覚について検討し、対照群と比較して早期よりABR閾値が上昇し、組織学的には外有毛細胞の変性およびらせん神経節細胞の消失を指摘した¹⁵⁾。

Akinpeluらは蝸牛の糖尿病における組織学的変化について過去の報告を検索し、genetically diabetic animal modelとdrug-induced diabetic animal model

およびヒト側頭骨のそれぞれのモデルで蝸牛の部位ごとに特徴をまとめている¹⁶⁾。コルチ器ではgenetically diabetic modelで外有毛細胞の消失が顕著であるとの報告が多くあるが、その一方で他のモデルでは同様な報告があるものの変化はないとの報告も多い。血管条についてはヒト側頭骨で毛細血管壁のPAS positive precipitatesや毛細血管基底膜の肥厚の報告が多く、動脈硬化を示唆する所見と考えられる。その他のモデルでも毛細血管壁の肥厚の報告や血管条細胞の変性の報告がある。らせん神経節については、らせん神経節細胞の減少や変性の報告も散見されるが変化なしとの報告が多い¹⁶⁾。

このように糖尿病においては多くの研究で内耳の組織学的変化が指摘されているが、モデルや蝸牛内の部位によりその変化は報告によって様々であり、発症機序の解明には議論の余地がある。

我々が用いたTSODマウスは、株式会社ツムラ中央研究所においてddY系雄マウスの飼育群から肥満と糖尿病を呈するマウスが発見され、それらの個体と同系由来の雌を用いて兄妹交配を繰り返した結果確立された、肥満と尿糖を高率に発症する近交系マウスである¹⁷⁾。過食、体重60～70 gに達する肥満、高血糖、高インスリン血症、高脂血症が認められ、のちに糖尿病合併症である末梢神経障害として後肢の運動障害と知覚異常、組織学的には有髄神経線維の異常を認めると報告されている。眼球では水晶体で線維細胞の空胞形成やモルガン氏球様物の形成、角膜で炎症細胞浸潤、血管新生、上皮の増殖を認めている。腎臓

に関しては12カ月齢より糸球体係蹄壁の肥厚やメサンギウム領域の拡大と結節の形成が報告されている。膵臓では著しい重量増加が認められ、ラ氏島の肥大および β 細胞質内のインスリン分泌顆粒の減少、空胞形成および発達した粗面小胞体や豊富なミトコンドリアが認められ、インスリン分泌および産生の持続的な亢進が推測されるとされている¹⁸⁾。生化学的にも高インスリン血症を高齢まで認める。また脂質異常症も確認されており、総コレステロール値およびトリグリセリド値の上昇を認める。TSODマウスの総コレステロール値は2か月から12か月齢まで高値を示し、またトリグリセリド値は1か月から12か月齢まで対照マウスに比較して高値であると報告されている。LDLコレステロールも7か月から12か月齢まで高値であることが確認されているが、HDLコレステロールについても3か月齢から18か月齢まで高いレベルを維持しているとの報告があった²⁰⁾。TSODマウスはX線CT画像による検討から皮下脂肪組織が比較的少なく内臓脂肪組織の過剰な蓄積を認めている¹⁹⁾。内臓脂肪はメタボリックシンドロームの病態発症と深く関与しており、内臓脂肪の過剰蓄積によりインスリン抵抗性および高インスリン血症をきたし、耐糖能異常、脂質代謝異常、高血圧など複数の病態を伴い、その結果、心脳血管疾患発症のリスクを高めるとされている。TSODマウスは内臓脂肪型肥満、耐糖能異常、高脂血症、高血圧症を伴っており、メタボリックシンドロームモデルマウスと考えると良いと思われる。

メタボリックシンドロームモデルマウスであるTSODマウスの聴力は、コントロールマウスであるTSNOマウスと比較すると、若年では明らかな差は認められないが、加齢に伴って8か月齢より有意な低下をきたした。内耳における組織学的変化は、8か月齢までは指摘できなかったものの、13か月齢で血管条において変化を認め、血管条毛細血管の狭小化および蝸牛軸の血管壁の肥厚を認めた。さらに血管染色により9か月齢より血管条毛細血管の血管面積の有意な低下を認めた。コルチ器および外有毛細胞やラセン神経節にはコントロール群と比較して明らかな差は認められなかった。組織学的評価からはTSODマウスでは内耳における慢性的な血流不全が存在することが示唆される所見であった。過去のヒト側頭骨病理による検討では糖尿病症例の蝸牛でも、血管条毛細血管基底膜の肥厚、蝸牛軸の血管壁の肥厚、血管条の委縮など血管病変が多く報告されている。ただこれまでの従来の糖尿病モデル動物の検討では、有毛細胞の変性やラセン神経節細胞の減少が多く指摘されているが、血管病変について報告したものは少なかった。今回我々が用いた糖尿病モデルマウスは、加齢に伴い聴覚の早期の低下をきたし、組織学的に蝸牛軸の血管壁の肥厚および血管条毛細血管の狭小化を認めておりヒト側頭骨モデルに類似していると考えられる。蝸牛における慢性的な血流不全が、糖尿病における聴力障害発症に関与していることが考えられた。先に述べたように、今回用いたモデルマウスは糖尿病モデルマウスであるだけでなく、メタボリックシンドロームモデルマウスであり、高

血圧や高脂血症も血管病変発症のリスクとなるため、今回の結果はメタボリックシンドロームにおける組織学的変化および聴力障害と言えるかもしれない。

蝸牛の発現遺伝子の検討からは免疫応答や炎症に関連した多数の遺伝子の変動を認め、糖尿病が内耳に及ぼす影響が小さくない事が示唆された。成長因子や受容体の発現低下を認め、また炎症性サイトカインの発現上昇を認めた。また脂質代謝に関してfatty acid-binding protein 5 (FABP5)は発現比も高く大きく変動していた。FABP5は毛細血管内皮細胞に発現することが報告されており²¹⁾、fatty acid-binding protein 4 (FABP4)/FABP5ダブルノックアウトマウスではメタボリック症候群の症候が著しく減弱し、インスリン感受性増加と動脈硬化が抑制されると報告されており^{22,23)}、内耳における動脈硬化病変と関与している可能性も考えられ、今後の検討課題としている。

6. 結語

糖尿病モデルであるTSODマウスにおける聴力障害について検討を行い、対照マウスに比較して早期に聴力低下の発症を認め、組織学的には血管条毛細毛管の血管面積の低下を認め、内耳における血流不全が示唆された。発現遺伝子の検討では免疫応答や炎症に関連した遺伝子の変動を多く認めた。

7. 参考文献

- 1) 厚生労働省 平成 24 年国民健康・栄養調査報告
- 2) Jordao AMD: Consideration sur un cas du diabete. Un. med. Paris
11:446-450,1857.
- 3) 鈴木 亘: TSOD マウス. Diabetes Frontier, 9:485-488, 1998.
- 4) Iizuka S, et al: Diabetic complications in a new animal model (TSOD mouse) of spontaneous NIDDM with obesity. Experimental Animals. Vol.54(1), 71-83, 2005.
- 5) Austin DF, Konrad-Martin D, Griest S, et al: Diabetes-related changes in hearing. Laryngoscope. 119:1788-1796, 2009.
- 6) Vaughan N, James K, McDermott D, Griest S, Fausti S: A 5-year prospective study of diabetes and hearing loss in a veteran population. Otol Neurotol. Jan; 27(1):37-43, 2006.
- 7) Bainbridge KE, Hoffman HJ, Cowie CC: Diabetes and hearing impairment in the United States: audiometric evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. Ann Intern Med, 149: 1-10, 2008.
- 8) Venkata Kakarlapudi, Robert Sawyer, Hinrich Staecker: The effect of diabetes on sensorineural hearing loss. Otol Neurotol, 24:382-386, 2003.
- 9) Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Nakashima T, Shimokata H: Diabetes

- reduces auditory sensitivity in middle-aged listeners more than in elderly listeners: A population-based study of age-related hearing loss. *Med Sci Monit*, 16(7):63-68, 2010.
- 10) Olubunmi V. Akinpelu, Mario Mujuca-Mota, Sam J. Daniel: Is type 2 diabetes mellitus associated with alterations in hearing? A systematic review and meta-analysis. *The Laryngoscope*, 124:767-776, 2014.
- 11) Horikawa C, Kodama S, Tanaka S, Fujihara K, Hirasawa R, Yachi Y, Shimano H, Yamada N, Saito K, Sone H: Diabetes and risk of hearing impairment in adults: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(1):51-58, 2013.
- 12) Fukushima H, Cureoglu S, Schachern P.A, Paparella M.M, Harada T, Oktay MF: Effects of type 2 diabetes mellitus on cochlear structure in humans. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 132:934-938, 2006.
- 13) Smith TL, Raynor E, Prazma J, Pillsbury HC. Insulin-dependent diabetic microangiopathy in the inner ear. *Laryngoscope*, 105:236-240, 1995.
- 14) Raynor EM, Carrasco VN, Prazma J, Pillsbury HC. An assessment of cochlear hair-cell loss in insulin-dependent diabetes mellitus diabetic and noise-exposed rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 121(4):452-456, 1995.
- 15) Hyun-Seok Lee, Ki Ryung Kim, Won-Ho Chung, Yang-Sun Cho, Sung

- Hwa Hong. Early sensorineural hearing loss in Ob/Ob mouse, an animal model of type 2 diabetes. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*, 1:211-216, 2008.
- 16) Olubunmi Victoria Akinpelu, Faris Ibrahim, Sofia Waissbluth, and Sam J. Daniel: Histopathologic changes in the cochlea associated with diabetes mellitus—a review. *Otology & Neurotology*, 35:764-774, 2014.
- 17) Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Funo S, Yanagisawa T, Kimura M, Sato T, Endo T, Kawamura H: A new mouse model of spontaneous diabetes derived from ddY Strain. *Exp. Anim* 48(3), 181-189, 1999.
- 18) Iizuka S, Suzuki W, Tabuchi M, Nagata M, Imamura S, Kobayashi Y, Tanitani M, Yanagisawa T, Kase Y, Takeda S, Aburada M, Takahashi K: Diabetic complications in a new animal model (TSOD mouse) of Spontaneous NIDDM with obesity. *Exp. Anim*. 54(1), 71-83, 2005.
- 19) Shimada T, Kudo T, Akase T, Aburada M: Preventive effects of Bofutsushosan on obesity and various disorders. *Biol Pharm Bull*. 31(7)1362-1367, 2008.
- 20) Kawada T, Miyata S, Shimada T, Sanzen Y, Ito M, Hemmi C, Iizuka S, Suzuki W, Mihara K, Aburada M, Nakazawa M: A study of cardiovascular function in Tsumura Suzuki Obese Diabetes, a new model mouse of type 2 diabetes. *Biol. Pharm. Bull*. 33(6)998-1003, 2010.

- 21) Iso T, Maeda K, Hanaoka H, Suga T, Goto K, Syamsunarno MR, et al.
Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.33:2549-2557,2013.
- 22) Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell metabolism*. 1:107-119,2005.
- 23) Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, et al. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*.110:1492-1498,2004.

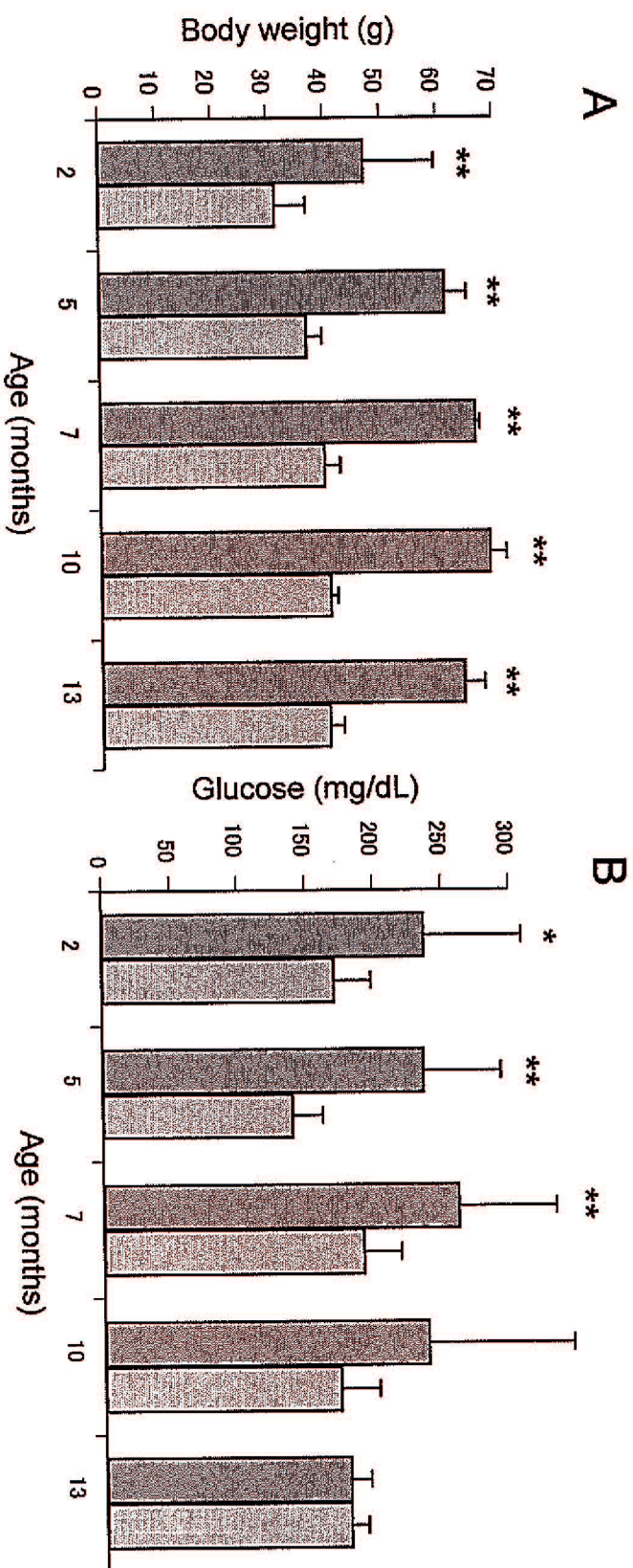


Figure 1

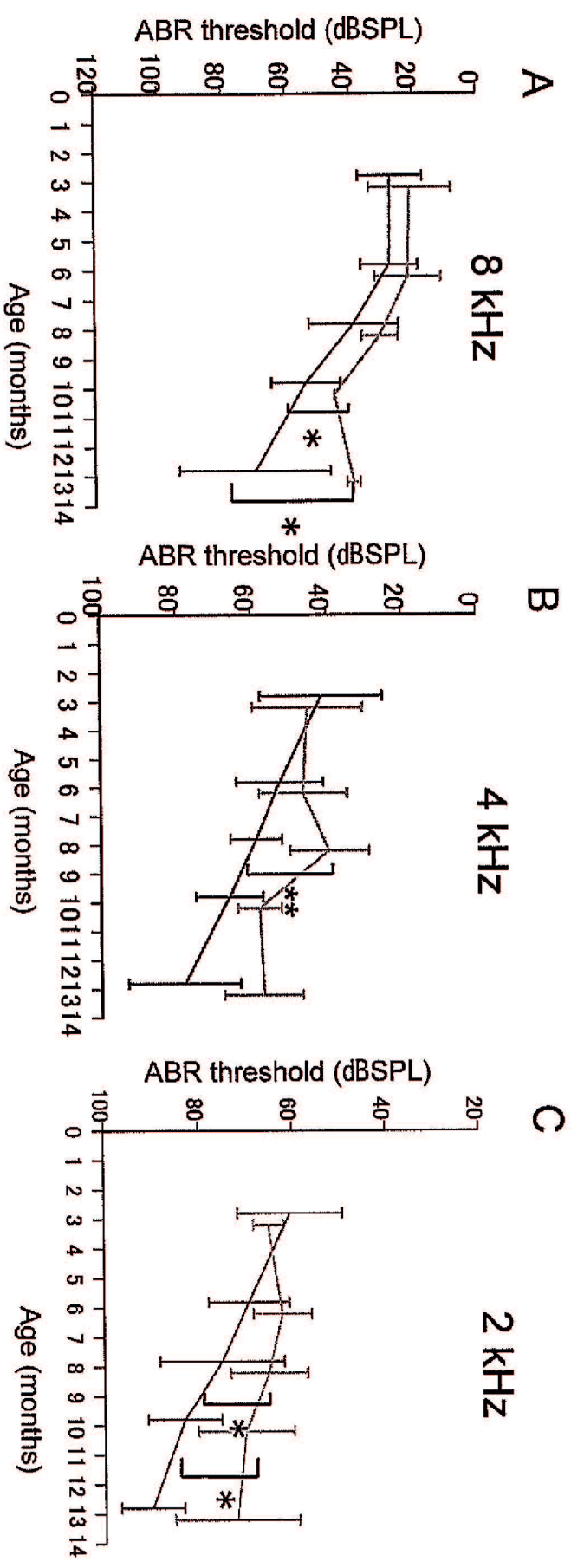
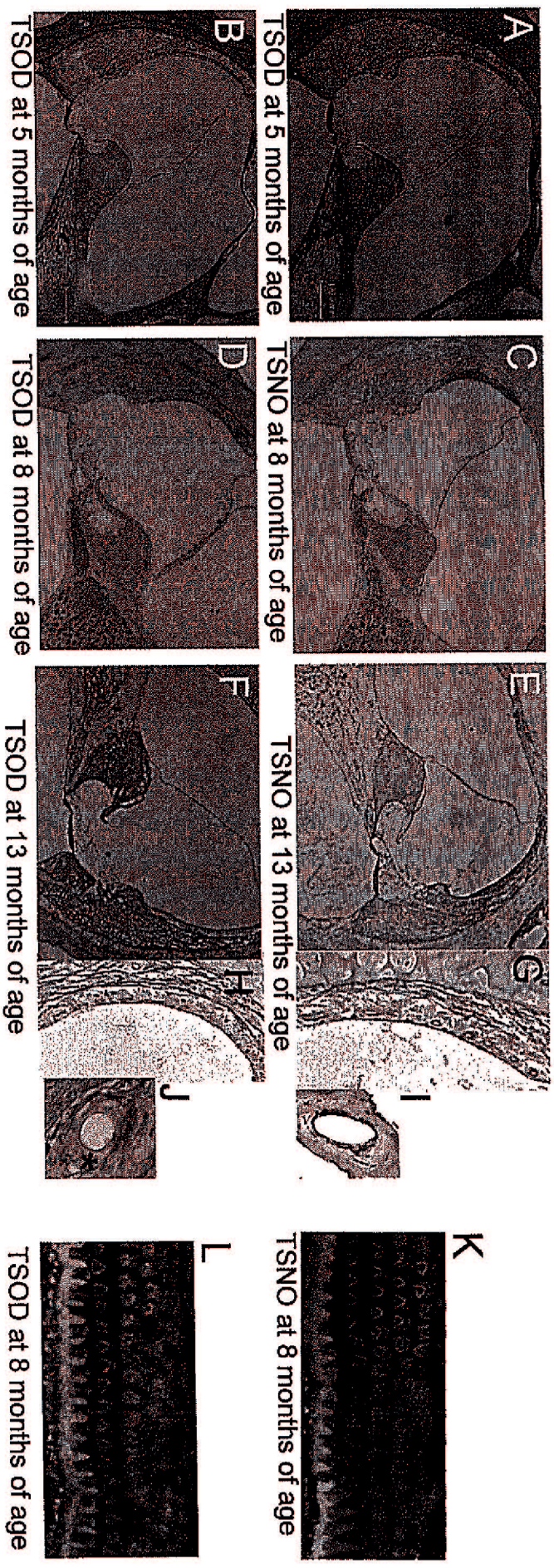


Figure 2



A

Figure 3

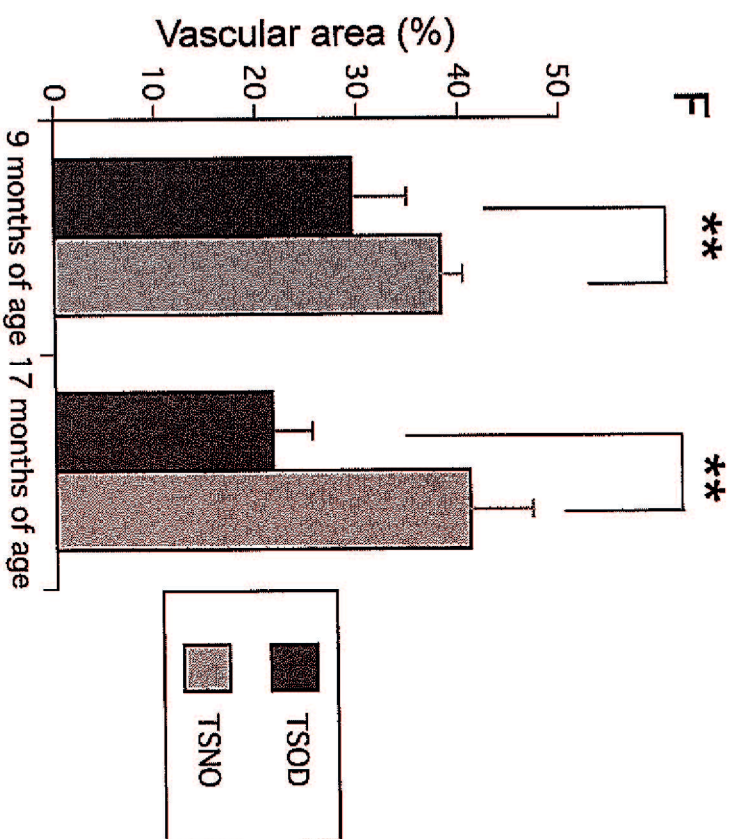
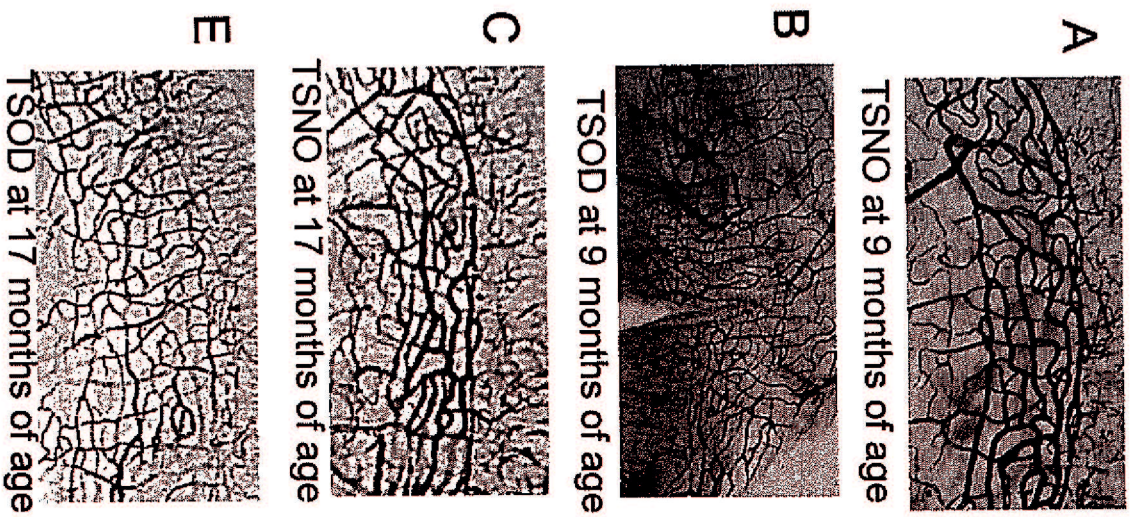


Figure 4

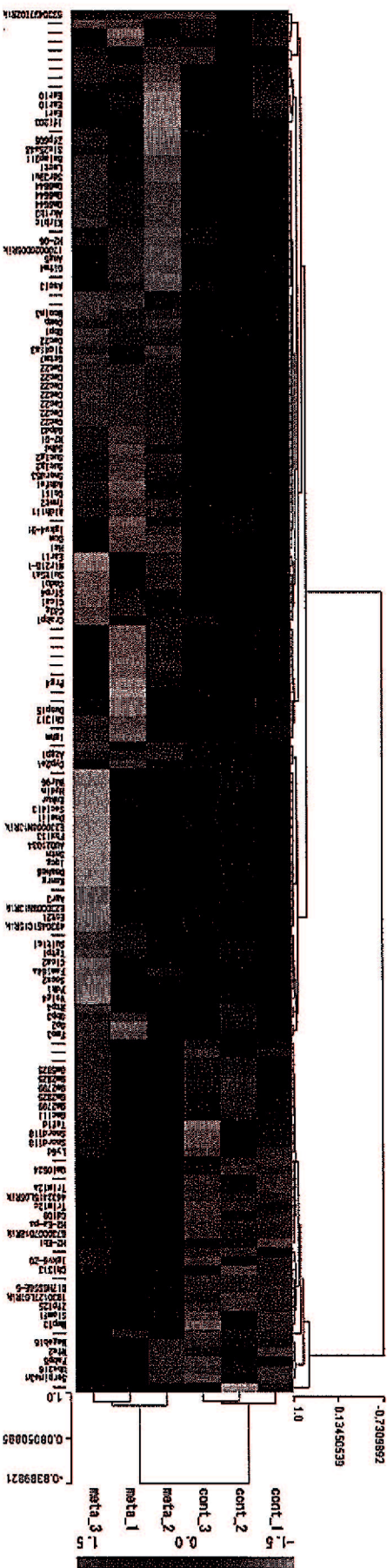


Figure 5

List of selected genes altered in expression of TSOD

| Transcript ID | Gene Symbol | Gene ID | Ratio (TSOD_vs_TSNO) | FC | p-value | Gene |
|-------------------------|-------------|-----------|----------------------|-------|-------------|--|
| Trophic Factors | | | | | | |
| 10365559 | Igf1 | NM_010512 | 0.71 | -1.4 | 0.0113982 | insulin-like growth factor 1 |
| 10427125 | Igfbp6 | NM_008344 | 0.67 | -1.5 | 0.000963831 | insulin-like growth factor binding protein 6 |
| 10360920 | Tgfb2 | NM_009367 | 0.77 | -1.3 | 0.00432765 | transforming growth factor, beta 2 |
| 10568436 | Fgfr2 | NM_010207 | 0.76 | -1.32 | 0.033036 | fibroblast growth factor receptor 2 |
| 10570982 | Fgfr1 | NM_010206 | 0.75 | -1.34 | 0.00358282 | fibroblast growth factor receptor 1 |
| 10362201 | Ctgf | NM_010217 | 0.71 | -1.41 | 0.0150606 | connective tissue growth factor |
| 10475643 | Fgf7 | NM_008008 | 0.7 | -1.44 | 0.000638332 | fibroblast growth factor 7 |
| 10438801 | Fgf12 | NM_183064 | 0.62 | -1.6 | 0.0477323 | fibroblast growth factor 12 |
| Cytokines | | | | | | |
| 10487588 | Il1a | NM_010554 | 1.33 | 1.33 | 0.0235061 | interleukin 1 alpha |
| 10583529 | Icam4 | NM_023892 | 1.46 | 1.46 | 0.0215396 | intercellular adhesion molecule 4 |
| Lipid metabolism | | | | | | |
| 10585699 | Fabp5 | NM_010634 | 2.04 | 2.04 | 0.0482949 | fatty acid binding protein 5, epidermal |
| 10508614 | Fabp3 | NM_010174 | 0.76 | -1.31 | 0.019617 | fatty acid binding protein 3, muscle and heart |

Figure 6

9. 図表の説明

Figure 1: TSOD および TSNO マウスにおける体重と血糖値の変化

A: 縦軸に体重(g)、横軸に月齢を示す。TSOD マウスでは2カ月齢より著しい体重増加を認め、5~10カ月齢で60gを超える重度の肥満を呈した。TSOD マウスでは、いずれの月齢でもTSNOマウスと比較して有意な体重増加を認めた。

B: 縦軸に血糖値(mg/dℓ)、横軸に月齢を示す。TSOD マウスでは2カ月齢より200 mg/dℓ以上の血糖値を示し、10カ月齢まで高血糖は持続し、その後減少傾向を示し13カ月齢では明らかな血糖値の異常は認めなかった。

Error bar \pm 1S.E.M. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Figure 2: TSOD および TSNO マウスにおける ABR 閾値

2,4,8 kHz の測定周波数毎の ABR 閾値を示す。縦軸に閾値dB SPL、横軸に月齢を示す。3 から 5 カ月齢までは両群における閾値に有意な差は認められなかったが、8 カ月齢より 2 kHz と 4 kHz で TSOD マウスにおいて有意な閾値上昇を認め、さらに 10 カ月齢より 8 kHz で有意な閾値上昇を認めた。

Error bar \pm 1S.E.M. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Figure 3: 5 カ月齢、8 カ月齢、13 カ月齢における蝸牛外側壁の評価

(A-D) 5 カ月齢および 8 カ月齢における TSNO と TSOD の側頭骨の組織学的検査では蝸牛血管条やコルチ器、らせん神経節に明らかな差は認められなかった。

(E-J)13 カ月齢における側頭骨の PAS 染色による組織学的検査では蝸牛血管条の委縮や変性は認めなかったが、TSOD マウスでは比較して血管条毛細血管の内腔の狭小化を認めた。ラセン靭帯やラセン神経節細胞に差は認められなかった。蝸牛軸の血管を比較すると TSOD では一部の血管壁内にPAS陽性となる無構造の物質の沈着を認めた。

(K,L)8 カ月齢における TSNO および TSOD マウスの蝸牛コルチ器の外有毛細胞に明らかな差は認めなかった。

Figure 4:TSNO および TSOD マウスの India ink を用いた蝸牛の血管染色による蝸牛外側壁の血管面積の評価

9 カ月齢と 17 カ月齢で蝸牛外側壁の血管条における毛細血管を血管染色により観察したところ、TSOD マウスでは血管条毛細血管の血管密度の低下を認めた。画像処理ソフト ImageJ を用いて血管面積を評価したところ、いずれの月齢でも TSOD マウスは TSNO マウスに比較して有意に血管面積の縮小を認めた。

** $p < 0.01$

Figure 5: TSODマウスとTSNOマウスの内耳の遺伝子発現の比較統計解析

発現比 >2 (= $\text{Log}_2 \text{ ratio} > 1$)および発現比 <0.5 (= $\text{Log}_2 \text{ ratio} < -1$)の条件下で、TSODではTSNOマウスに比較して39の遺伝子が発現増加しており、114の遺伝子が発現低下していた。

Figure 6: TSODマウスにおける発現変動遺伝子

免疫や炎症に関与する遺伝子の変異を多く認めた。TSODマウスでは多くの成長因子の発現低下を示し、また炎症性サイトカインの発現増加および脂質代謝関連遺伝子の変動を示した。