



Title	Localization of osteopontin in the otoconial organs of adult rats
Author(s)	嶽村, 貞治
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39855
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	たけむら ていじ 嶽村貞治
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12423 号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	Localization of osteopontin in the otoconial organs of adult rats (成獣ラット耳石器におけるオステオポンチンの局在)
論文審査委員	(主査) 教授 久保 武 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 北村 幸彦

論文内容の要旨

【目的】

1989年 Swanson 等により胎生マウス内耳におけるオステオポンチン(以下OPN) mRNAの発現が報告されたが、RI probeを用いた *in situ* hybridizationの結果であった為、内耳の様に特殊化した細胞が細かく存在する組織では発現細胞を同定するには解像度が不十分であった。そこで発現細胞を確実に同定することを目的とし、RIより解像性に優れる non-RI の *in situ* hybridization を行ったところ、血管条の辺縁細胞、ラセン神経節の神経節細胞、半規管の暗細胞、半規管の有毛細胞、耳石器の有毛細胞、内リンパ囊の上皮細胞にオステオポンチンの mRNA を認めた。次に成獣マウスにおいても同様に *in situ* hybridization を行ったところ、成獣となったあとも mRNA を作り続けており、オステオポンチンが内耳のなんらかの機能維持に関与していると思われた。近年、オステオポンチンが腎結石の構成蛋白質の一つであることが明らかにされた。腎結石はカルシウム含有結晶だが、内耳にも耳石というカルシウム含有結晶が存在する。耳石は内耳の耳石器(球形囊、卵形囊)の耳石膜に存在する、平衡覚の重要な構成組織のひとつであり、その重量が重力や慣性力等の直線加速度に対する耳石器の感受性を高め、身体の姿勢保持や体運動及び眼球運動の円滑化に役立っており、一部のめまい症への関与も指摘されている。哺乳類の耳石は炭酸カルシウムと有機成分(蛋白質及び糖質)から構成され、主要な構成蛋白質は生化学的分析により2種類と考えられているが未だ同定はされていない。また耳石の生成部位に関しても未だ定説は無い。耳石と腎結石は生理的結晶と病的結晶の違いはあるものの、生体の形成するカルシウム塩と有機物の複合結晶である点では共通する。またオステオポンチンは一分子あたり約50個のカルシウムと結合する能力があると考えられているカルシウム結合蛋白である。オステオポンチンが腎結石同様カルシウム含有結晶である耳石の構成蛋白質のひとつではないかと考え、本研究では、ラット耳石器にて免疫組織化学を行った。また、その生成部位を同定する為に、*in situ* hybridization 法を用いて OPNmRNA の局在を検討した。

【方法】

成獣SDラットをリン酸緩衝4% paraformaldehyde (PFA) で生体灌流固定後骨迷路を摘出し、同固定液中にて一晚浸漬固定した。20% EDTA (pH7.4) にて14日間脱灰後パラフィン包埋し、5 μm の薄切標本を作成した。同切片を抗ラットOPN抗体を用いてABC法による免疫組織化学を行った。DAB発色、hematoxylin 核染後封入した。また他切片をマウスOPNのcDNAから得られた1.2kb長のDigoxigenin-labelled antisense RNA probe

を用いてDIG SYSTEMによる *in situ* hybridization を行った。NBT発色反応, hematoxylin 核染後封入した。

【成績】

免疫組織化学法にて、球形嚢及び卵形嚢いずれの耳石にも強い発色を認め、OPNは耳石の構成蛋白質のひとつであると考えた。耳石の主要な構成蛋白質は生化学的分析により2種類で、そのうちの1つは分子量約5万のシアル酸に富む糖蛋白質と報告されていたが、オステオポンチンはシアル酸に富む糖蛋白質で、分子量も約5万～6万と考えられていることから、その報告されていた糖蛋白質はオステオポンチンである可能性が高く、オステオポンチンは耳石の主要な構成蛋白質2種類のうちの1つであろうと推察した。辺縁部により強い免疫反応をみるが、耳石は中心部より辺縁部の方がカルシウム濃度が高いという元素分析の報告と併せるとOPNは耳石の辺縁部においてカルシウム(塩)との複合体を形成し、結晶構造形成に関与しているものと思われる。発生期のラット(胎生19日目)の耳石器感覚上皮内腔面及び内リンパ腔内に存在する耳石前駆体と考えられている球状物質のcoreの部分に抗OPN抗体の強い反応がみられることから、感覚上皮(有毛細胞と支持細胞で構成)が耳石の構成蛋白質のOPNを生成分泌しているものと思われる。実際にnon-R I *in situ* hybridization法の結果では、OPNmRNAは感覚上皮のうちの有毛細胞に強く認められた。一方感覚上皮の支持細胞には検出できなかった。即ち耳石器感覚上皮における主なるOPN生成部位は支持細胞ではなく有毛細胞と考えられる。また胎生ラットおよび成獣ラットいずれにおいてもmRNAを認めたことから、有毛細胞は耳石の発生およびturn over両方の生成に関与していると考えられた。従来、電顕や金コロイド法を用いた研究により、耳石は耳石器感覚上皮の支持細胞で作られているという仮説が主であったが、本研究の結果により、有毛細胞はOPNを作ることによって耳石の生成に関与していることが示された。有毛細胞の耳石生成への関与の報告は今迄になく、本報告が初めてである。

【総括】

本研究により、OPNは耳石の構成蛋白質のひとつであり、耳石器感覚上皮の有毛細胞はOPNの産生を通して耳石の生成に関与していることが示された。

論文審査の結果の要旨

嶽村貞治君は内耳の耳石に関して実験を行った。その結果、(1)耳石の構成蛋白質のひとつがオステオポンチンであること、(2)耳石器感覚上皮の感覚有毛細胞はオステオポンチンの産生を通して耳石の生成に関与していること、を明らかにした。耳石は平衡感覚器の重要な構成組織のひとつだが、これまで有機成分は同定されておらず、また耳石の生成部位に関しても不明であった。本研究は耳石の有機成分の一つを同定し、感覚有毛細胞の耳石生成への関与という新しい説を提唱するもので、これは学位論文に値するとおもわれる。