

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10761

研究課題名(和文) オプトジェネティクスによる蝸牛血管条機能の操作と聴覚平衡覚変化

研究課題名(英文) Control of stria vascularis function and changes of auditory and vestibular function induced by optogenetic stimulation

研究代表者

増田 正次 (Masuda, Masatsugu)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：20317225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：変動性内耳障害の原因を解明することを最終目的とした研究である。本研究では蝸牛外側壁の血管条を研究対象とし、研究者が任意のタイミングで可逆的、非可逆的難聴を再現可能な動物モデルを確立させた。餌への抗生剤の添加または除去という容易な方法で緩徐に血管条細胞のイオントランスポーターの発現と抑制をコントロール可能なマウスと、オプトジェネティクスを応用して急速に血管条細胞に摂動を与えることが可能なマウスを作成した。両マウスを用いて変動性難聴のメカニズムを詳細に分析可能であることを確認した。いずれの方法でも蝸牛外側壁は可逆性、非可逆性、変動性難聴の病態に関わっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The goal of the present study is to reveal mechanisms that cause variable inner ear dysfunction. We focused on the role of the stria vascularis of the cochlea, and we generated two animal models for which hearing can be repeatedly controlled at will to model variable hearing loss. One transgenic mouse line is the line that demonstrates inducible and reversible specific gene knockdown of an ion transporter by antibiotic administration and disadministration. Another transgenic mouse line is the line of which stria vascularis function is disturbed quickly using optogenetics. We demonstrated that these transgenic mice lines provided mouse models for the study of variable hearing loss and that the stria vascularis is involved in the mechanisms of variable hearing loss.

研究分野：神経耳科学

キーワード：オプトジェネティクス 蝸牛 血管条 聴力 変動性難聴 外側壁 イオンチャンネル 遺伝子操作

1. 研究開始当初の背景

内耳の蝸牛は聴覚を担う末梢感覚器である。蝸牛に急性の障害が生じると急性感音難聴を発症する。急性感音難聴には非可逆的に難聴が固定し回復しないもの、ある程度は回復するが完全には回復しないもの、難聴の反復や変動を生じるものがある。これらの症状は、突発性難聴、メニール病、低音障害型感音難聴などの症状として日常臨床でよく遭遇する疾患で見られる。非可逆性の難聴においては、蝸牛の感覚細胞や神経細胞が障害されて難聴状態が固定していると推測できる。一方で、ある程度だけ聴力が回復する症例、変動または反復性難聴を生じる症例（一部回復、変動、反復性難聴をまとめて変動性難聴と記載する）では蝸牛に何が生じているかわかっていない。このような症状を生じる責任部位は蝸牛の外側壁ではないかと、過去の外側壁に関する報告から推測はできるものの、いまだに詳細な変動性難聴の機序は解明されていない。その原因の一つとして変動性難聴を再現できる動物モデルがほとんど存在しなかったからである。例えば、研究対象としたい遺伝子の機能を消失させたノックアウトマウスでは、生まれながらに難聴のままの先天性難聴しか再現できず、一時的な難聴は再現できない。蝸牛の機能を一時的に低下させる薬剤の投与は、急性に一過性の難聴を再現できるものの、薬剤は様々な分子に作用するため、特定の分子に特化した正確な機能解析を行うことができない。また、亜急性に難聴状態を維持させるため持続的な薬剤投与をすると、非特異的作用の影響はさらに大きくなってしまう。本研究ではこれまでに難聴研究の分野で開発されていなかった、次項に記載したような動物モデルを確立すると共に、変動性難聴の機序を解明することを目指した。

2. 研究の目的

研究の目的は変動性感音難聴の発症機序を解明することである。そのために(1)研究者が対象とした分子、または細胞のみに対して、(2)研究者が意図したタイミングと期間に限り機能の攪乱(以下、摂動と記載)を与え、難聴を生じ、(3)研究者が意図した時点で摂動を解除することにより難聴が完全にまたは一部回復する、といった動物モデルを確立することも研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Actin-tTS::Nkcc1^{tet0/tet0}* トランスジェニックマウスによる検討

蝸牛外側壁の中でも血管条と言われる部分は蝸牛内の様々なイオンや分子の恒常性維持を担い、正常聴力維持に必須の機能を有する。この部位の細胞に存在する細胞、分子に摂動を与えることで変動性の難聴を再現できるか確認するため、まずは比較的簡単な操作で外側壁中の特定分子に摂動を与えるこ

とが可能なトランスジェニックマウスを用いて検討した。このマウスは *Actin-tTS::Nkcc1^{tet0/tet0}* と記載されるトランスジェニックマウスである。このマウスにおいては、飼料に抗菌薬ドキシサイクリン(DOX)を添加しているうちは普通のマウスと同様に、血管条の辺縁細胞に存在するイオン輸送分子 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (遺伝子名 *Nkcc1* と略。) が発現しているが、飼料から DOX を除去すると *Nkcc1* の発現が抑制される。特筆すべきは、研究者の任意の時期に DOX 除去による *Nkcc1* 発現抑制を開始できる上に、一度 DOX を除去し *Nkcc1* の発現を抑制しても、再度 DOX を与えれば、*Nkcc1* の発現を再度生じさせることが可能なことである。つまり、特定の遺伝子に対して、研究者の任意のタイミングで、DOX を飼料に混ぜるか否かという簡単な方法で、発現、停止、再発現させることが可能である。このマウスを用いて、生後すぐに DOX を飼料から除去し(これにより難聴が生じることを想定し) 生後 5 週したら再び DOX 添加飼料を与え、難聴が回復するかを分析した。このマウスの分析結果から、血管条に摂動を与えることが可能な動物が変動性難聴の研究に使えることを確認できたため、次項 3-2 に記載の研究へと進んだ。

(2) オプトジェネティクスを利用したマウスによる検討

Actin-tTS::Nkcc1^{tet0/tet0} マウスは容易な方法で血管条への摂動が変動性難聴に関わるか検討可能であるが、遺伝子発現のオン、オフのスピードは緩徐である(数日~数週と推定される)。しかし、オプトジェネティクスという方法を用いれば、ミリ秒(ms)の単位で鋭敏に研究対象とする細胞に摂動を与えることが可能である。今回は、血管条の中間細胞に光活性化陽イオンチャンネル(channel rhodopsin-2, ChR2 と略)を発現させたトランスジェニックマウスを用いた。このマウスの血管条に青色光を照射すると直ちに ChR2 を通して細胞内に陽イオンが流入し中間細胞に摂動が生じる。そして緑色光を照射すると直ちに ChR2 が閉鎖し、中間細胞の摂動が中止できる。このマウスを用いて、蝸牛の分子生物学的、生理学的変化を詳細に分析した。

4. 研究成果

(1) 血管条の特異的遺伝子の発現調節による変動性難聴の再現が可能

飼料への DOX の添加、除去だけで、*Nkcc1* の発現維持、抑制が可能であった。また DOX 除去により一度抑制した *Nkcc1* の発現が、再度の DOX 添加により元の発現レベルに回復した。以下、数値と共に詳述する。生後当日から飼料の DOX を除去(21 日齢までは親の飼料から DOX を削除し、DOX を含まない母乳を経口摂取している。その後は DOX 除去飼料を自力で摂取する。)すると、35 日齢時点で蝸牛内の

Nkcc1 の発現は、コントロールマウスに較べ30%まで抑制された。一方で他のイオン輸送に関わる遺伝子の発現は抑制されていなかった。こうして35日齢までDOX除去により*Nkcc1*発現抑制を誘導したマウスに35日齢以降はDOX添加飼料を与えた。すると、49日齢時点で蝸牛内*Nkcc1*の発現はコントロールマウスと同等にまで回復していた。

この*Nkcc1*の発現量変化に同調して、聴力が変化するか調べた。*Nkcc1*発現が抑制されている35日齢の時点でマウスは低音から高音までいずれの周波数でも難聴を生じていた。しかし*Nkcc1*を再発現上昇させた49日齢においては、高音域において35日齢から有意な聴力改善を認めた。

以上により、特定の分子のみをターゲットとして、研究者の任意のタイミングで、血管条に摂動を与えることで、変動性難聴の再現が可能であること、またこのような動物モデルが作成可能であることが分かった。

(2) オプトジェネティクスを用いることで鋭敏に血管条障害による蝸牛生理機能の変化を分析可能

青色光照射で血管条細胞の中でも中間細胞のみの電位が変化し、緑色光照射で電位が元に戻ることが観察できた。つまり、オプトジェネティクスを用いることで血管条の中間細胞に摂動が生じることが確認できた。

中間細胞の摂動が、正常聴力維持に必須の蝸牛内リンパ電位に影響を及ぼしているか分析した。すると、蝸牛に青色光照射後直ちに内リンパ電位が変化することが測定できた。この変化も、青色光の照射を停止することで元の正常レベルに回復した。

細胞・蝸牛内電気生理レベルの変化が、聴力の変化として捉えられるか分析した。トランスジェニックマウスの蝸牛に青色光を当てると直ちに22dBの聴性脳幹反応(ABR)閾値上昇(つまり難聴)が生じた。この難聴は青色光照射停止後数分で元に戻った。

以上の結果からオプトジェネティクスを利用することで、*Actin-tTS::Nkcc1^{tet0/tet0}*トランスジェニックマウスよりも鋭敏な変動性聴力を表現、分析可能な動物モデル作成可能であることが分かった。

(3) 変動性難聴発症機序解明へ向けて

これらのマウスを作成、分析したことにより、蝸牛の血管条が変動性難聴に関わっていることが確認できた。しかも、たった1種の分子、細胞の変調で変動性難聴が生じ、難聴の可逆性の程度に関しては周波数ごとに違うことが分かった。自在に蝸牛内分子、細胞の機能を操ることが可能な動物モデルを用いた研究により、変動性難聴の機序解明、治療法開発へ多大な貢献ができることを示せた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件、いずれも査読あり)

1. Watabe T, Xu M, Watanabe M, Nabekura J, Higuchi T, Hori K, Sato MP, Nin F, Hibino H, Ogawa K, Masuda M (Corresponding author), Tanaka KF. Time-controllable *Nkcc1* knockdown replicates reversible hearing loss in postnatal mice. **Sci Rep.** 2017;7(1):13605.

2. Sato MP, Higuchi T, Nin F, Ogata G, Sawamura S, Yoshida T, Ota T, Hori K, Komune S, Uetsuka S, Choi S, Masuda M, Watabe T, Kanzaki S, Ogawa K, Inohara H, Sakamoto S, Takebayashi H, Doi K, Tanaka KF, Hibino H. Hearing Loss Controlled by Optogenetic Stimulation of Nonexcitable Nonglial Cells in the Cochlea of the Inner Ear. **Front Mol Neurosci.** 2017;10300.

[学会発表](計5件)

1. 渡部高久, 増田正次, 小川郁. *Nkcc1*の可逆的発現調節による蝸牛形態と機能変化の分析. 第27回耳科学会学術講演会. 2017.

2. 佐藤満雄, 樋口大河, 任書晃, 吉田崇正, 緒方元気, 上塚学, 増田正次, 渡部高久, 神崎晶, 小川郁, 竹林浩秀, 土井勝美, 田中謙二, 日比野浩. 会議録 光遺伝学を駆使した難聴モデルマウスの作成. 第93回日本生理学会大会. 2016.

3. Sato M, in F, Taiga H, Uetsuka S, Yoshida T, Masuda M, Watabe T, Kanzaki S, Ogawa K, Doi K, Takebayashi H, Tanaka KF, Hibino H. Transient Induction of Deafness by Optogenesis Targeting the Endocochlear Potential in the Inner Ear. **THE 39TH ANNUAL MIDWINTER MEETING OF THE ARO, USA.** 2016.

4. Watabe T, Masuda M, Ogawa K. The Hearing Level Change of the Versatile Gene Modulation Mouse (NKCC1-tetO mouse), Poster. **The 38th Annual MidWinter Research Meeting of the ARO (Association for Research in Otolaryngology), USA.** 2015.

5. 渡部高久, 増田正次, 大石直樹, 神崎晶, 小川郁. 口演 NKCC1多機能遺伝子改変マウスを用いた内耳機能の評価. 第24回日本耳科学会学術講演会. 2014.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
なし

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 正次 (MASUDA, Masatsugu)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号：20317225

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

田中 謙二 (TANAKA, Kenji F)
慶應義塾大学・医学部・准教授

渡部 高久 (WATABE, Takahisa)
慶應義塾大学・医学部・助教 (研究当時)

いずれの研究も新潟大学分子生理学教室の
協力をいただいた。