

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20240

研究課題名(和文) 蝸牛組織特異的マクロファージの機能解析と感音難聴発症メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Research on the functional analysis of tissue-specific macrophages in the cochlea and the etiology of sensorineural hearing loss

研究代表者

林 裕史 (HAYASHI, Yushi)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・政策医療企画研究部・研究員

研究者番号：40715166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛のウイルス感染モデルとして、生後2日目のマウス蝸牛感覚上皮を摘出し、培養、タイラー脳脊髄炎ウイルス(TMEV)を感染させたところ、有毛細胞周囲の支持細胞にウイルスが感染し、有毛細胞側への遊走開始が認められた。免疫組織染色、マイクロアレイ・定量的RT-PCRを用いた解析にてこれらの支持細胞がウイルス感染によりマクロファージ化していること、そしてインターフェロンを初めとするサイトカインを分泌してウイルス感染から有毛細胞を保護していることを突き止めた。またノックアウトマウスを用いた解析からマクロファージを司る転写因子であるIRF5を介して支持細胞がマクロファージへと分化転換することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
突発性難聴の原因については循環障害、ウイルス感染など諸説挙げられているが、そのメカニズムは明らかではなく、よって決定的な治療法は存在しない。本研究ではウイルス感染説に基づき、ウイルスが蝸牛に感染した際に実際に何が起きているのか観察し、将来的な根治治療の開発へと結びつけることを目的としている。上皮系の細胞であると考えられてきた有毛細胞周囲に存在する支持細胞がウイルス感染に伴い中胚葉由来の免疫細胞であるマクロファージの形質を獲得、有毛細胞へと遊走、I型インターフェロン等サイトカインを分泌してウイルス感染から有毛細胞を保護することを見出した。またその分化転換がIRF5により制御されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Mouse cochlear sensory epithelia were dissected out at postnatal day 2 and cultivated in medium, then Theiler's encephalomyelitis virus (TMEV) was administered to the epithelia to establish virus infection model. Supporting cells around hair cells were infected with TMEV and the supporting cells started to migrate towards the hair cells. Molecular profiling with immunohistochemistry, microarray, and qRT-PCR revealed that the virus-infected supporting cells possess character of macrophages and protect the hair cells by secreting cytokines such as type I IFNs that have anti-virus function. Moreover it was unveiled that supporting cells are transdifferentiating into macrophages via IRF5 that is a transcription factor to control macrophages.

研究分野：耳科学・細胞生物学・分子生物学

キーワード：感音難聴 蝸牛 マクロファージ ウイルス感染 免疫組織染色 マイクロアレイ・定量的RT-PCR 有毛細胞・支持細胞 突発性難聴

## 1. 研究開始当初の背景

突発性難聴、メニエール病、先天性難聴などウイルス感染症の関与が示唆される内耳性難聴の病態はいまだ明らかではなく、ゆえに決定的な治療法もない。我々はこれまでの研究において、免疫特権部位と呼ばれる強い免疫抑制環境をもつとされてきた臓器である蝸牛において、音の知覚を司る有毛細胞の外側に位置する支持細胞であるヘンゼン細胞・クラウディウス細胞が、ウイルス感染時にウイルスの genome RNA を認識する細胞内受容体である retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) like receptor (RLR) family のシグナル伝達経路を介して抗ウイルス作用を持つ type I interferon (IFN) を発現することを示し、支持細胞が蝸牛における免疫担当細胞であることを世界に先駆けて論文発表した。また引き続き行った研究において、ウイルス感染に伴い組織障害性のある M1 型マクロファージの marker、及び組織修復・リモデリングに関与する M2 型マクロファージの marker の発現が共に有意に増加することを突き止めている。これらの preliminary data より、ウイルス感染時に支持細胞であるヘンゼン細胞・クラウディウス細胞が M1 型マクロファージ、及び M2 型マクロファージとして機能すると仮説を立てた。本研究によりウイルスをはじめとした微生物感染時の蝸牛感覚上皮免疫応答を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

支持細胞がウイルス感染時に蝸牛組織特異的マクロファージとして機能することを証明し、さらにその性質を解析、どのような挙動を示すのか検討し、蝸牛感覚上皮免疫応答を明らかにする。

## 3. 研究の方法

生後2日目のマウス蝸牛感覚上皮の器官培養系を用いた。顕微鏡下で蝸牛感覚上皮を摘出、培養液中にて培養を開始し、マウスの神経系統に効率よく感染させることのできるタイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) を感染させた。ウイルス感染開始後各時間にて、免疫染色・電子顕微鏡を用いてウイルス感染した蝸牛の組織解析を行った。また、total RNA を抽出してマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析、定量的 RT-PCR を行い、TMEV に感染した蝸牛での遺伝子発現の変化を調べ、前述の組織解析で認められた現象のメカニズムを考察した。

## 4. 研究成果

TMEV を蝸牛感覚上皮に投与しても有毛細胞への感染はほとんど見られず、有毛細胞周囲に存在する支持細胞であるヘンゼン細胞・クラウディウス細胞、Greater epithelial ridge 細胞 (GER 細胞) に感染が認められた。TMEV に感染した支持細胞は本来細胞接着因子にて強固に固定され動くことはできないはずであるが、有毛細胞側へと遊走を開始し、時間と共に有毛細胞を覆いつくした。前述の通りこれらの支持細胞は RLR を介して I 型 IFN を分泌するため、この I 型 IFN の受容体である Ifnar1 (有毛細胞・支持細胞に発現) をノックアウトした蝸牛感覚上皮を用いて TMEV を感染させると有意に有毛細胞への TMEV 感染増加が認められ、ウイルス感染した支持細胞が I 型 IFN を分泌することによりウイルス感染から有毛細胞を保護していることが示された。

マイクロアレイ・定量的 RT-PCR・免疫染色を用いてこれらのウイルス感染した支持細胞の遺伝子発現プロファイルを調べたところ、前述の I 型 IFN だけでなく、IL-6、IL-1 $\beta$  など様々なサイトカインを分泌しており、かつヘンゼン細胞・クラウディウス細胞は M1 型マクロファージ marker、M2 型マクロファ

ージ marker 共に陽性であり、M1, M2 両方の性質を併せ持つマクロファージとしての形質を、また GER 細胞は M1 型マクロファージ marker 陰性、M2 型マクロファージ marker 陽性であり、M2 型マクロファージとしての形質を獲得していることが明らかとなった。さらにウイルス感染蝸牛に酵母である Zymosan A を投与したところ、ヘンゼン細胞・クラウディウス細胞、GER 細胞いずれも酵母を貪食することが確認された（貪食能はマクロファージとしての形質の一つである）。

ところがウイルスの代わりに細菌である大腸菌を蝸牛に感染させたところ、ヘンゼン細胞・クラウディウス細胞は同じくマクロファージ marker を発現し、貪食能を獲得したが、遊走は見られなかった。そこでウイルス感染時に RLR の下流にて活性化する IPS-1（細菌感染時には活性化されない）を支持細胞へと遺伝子導入すると遺伝子導入された支持細胞の遊走が観察され、ウイルス感染時に IPS-1 がこの遊走現象の鍵となっていることが明らかとなった。

さらに M1 型マクロファージ marker でありウイルス感染ヘンゼン細胞・クラウディウス細胞での発現上昇の見られた IRF5 をノックアウトさせた蝸牛感覚上皮を用いて TMEV を感染させるとヘンゼン細胞・クラウディウス細胞のマクロファージ化が観察されなかった。このことから IRF5 がヘンゼン細胞・クラウディウス細胞のマクロファージ化を制御していることが明らかとなった。

以上より、

ウイルス感染により支持細胞のマクロファージ化・有毛細胞側への遊走・貪食能獲得が観察され（IRF5、IPS-1 が制御）、支持細胞が蝸牛組織特異的マクロファージであることが明らかとなった。

このマクロファージ化した支持細胞は有

毛細胞をウイルス感染から保護する。

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 4 件)

1. Cochlear supporting cells function as macrophage-like cells and protect audiosensory receptor hair cells from pathogens.

Yushi Hayashi, Hidenori Suzuki, Wataru Nakajima, Ikuno Uehara, Atsuko Tanimura, Toshiki Himeda, Satoshi Koike, Tatsuya Katsuno, Shin-ichiro Kitajiri, Naoto Koyanagi, Yasushi Kawaguchi, Koji Onomoto, Hiroki Kato, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Nobuyuki Tanaka.

Scientific Reports. 2020; 10(1):1-13.

2. Activation of IGF1 Signaling in the Cochlea Induces the Transcription of Its Mediators During the Protection of Cochlear Hair Cells Against Aminoglycoside.

Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Omori K, Ito J.

Otol Neurotol. 2017; 38(2):278-282.

3. Is otolithic vertigo accompanied by hearing loss caused by sacculocochlear endolymphatic hydrops?

Murofushi T, Komiyama S, Hayashi Y, Yoshimura E.

Acta Otolaryngol. 2016; 136(1):38-42.

4. Frequency preference in cervical vestibular evoked myogenic potential of

idiopathic otolithic vertigo patients. Does it reflect otolithic endolymphatic hydrops?

Murofushi T, Komiyama S, Hayashi Y, Yoshimura E.

Acta Otolaryngol. 2015; 135(10):995-9.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. IFN/IFNAR1 SIGNALING IS CRUCIAL IN THE CONTROL OF VIRAL INFECTION IN THE COCHLEAR SENSORY EPITHELIUM. Yushi Hayashi, Koji Onomoto, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Nobuyuki Tanaka. Inner Ear Biology Workshop 2015. 12-15 Sep 2015. Rome, Italy.

2. ウイルス感染時に支持細胞において発現する type I interferon が蝸牛感覚上皮に与える影響

林裕史

第 25 回日本耳科学会総会、10 月 7 日-10 日、長崎

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：内耳疾患治療剤  
発明者：田中信之、林裕史、鈴木英紀、中嶋亘、上原郁野  
権利者：学校法人日本医科大学  
種類：生活必需品  
番号：特願 2016-232704、特開 2018-090497  
出願年月日：平成 28 年 11 月 30 日  
国内外の別：国内

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

林 裕史 (HAYASHI, Yushi)  
東京医療センター (臨床研究センター)・  
政策医療企画研究部・医師  
研究者番号：40715166

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

田中信之 (TANAKA, Nobuyuki)  
日本医科大学・先端医学研究所・教授  
研究者番号：80222115

### (4) 研究協力者

藤田尚志 (FUJITA, Takashi)  
京都大学・ウイルス研究所・教授  
研究者番号：10156870

米山光俊 (YONEYAMA, Mitsutoshi)  
千葉大学・真菌医学研究センター・教授  
研究者番号：40260335