

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11204

研究課題名(和文) グルタミン酸イメージングによる加齢性難聴の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiological study of age-related hearing loss by glutamate imaging

研究代表者

鷹合 秀輝 (Takago, Hideki)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 感覚機能系障害研究部・研究室長

研究者番号：70401354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴い感音難聴が生じるが、病態メカニズムは十分に解明されていない。本研究では加齢性難聴モデルとしてC57BL/6Jマウスを用い、パッチクランプ法やグルタミン酸イメージングにより蝸牛・内有毛細胞リボンシナプスの神経伝達機能を若齢群と加齢性難聴モデル群との間で比較し、加齢性難聴の病態を解明することを目指した。パッチクランプ法により内有毛細胞を脱分極刺激すると、電位依存性Caチャンネルが活性化し細胞内へのCa流入が生じるが、加齢性難聴モデル群でCa電流が有意に減少した。また、時間分解能が十分でないものの、若齢マウス・内有毛細胞からの神経伝達物質(グルタミン酸)放出を可視化し得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタミン酸イメージングを活用した本研究により、マウス蝸牛・内有毛細胞において神経伝達物質放出をリアルタイムで計測する道が拓かれた。今後、グルタミン酸イメージングの時間分解能を改善するとともに適用標本を拡大することで、感音難聴の病態解明研究が進展することが期待される。また、疾患特異的有毛細胞様iPS細胞を活用することで、感音難聴患者・児の障害部位の診断が現状よりも正確に行えるようになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify pathophysiological mechanisms for age-related hearing loss (ARHL) using patch-clamp and glutamate imaging techniques to analyze senescent changes in inner hair cell (IHC) ribbon synapse functions of C57BL/6J mice, which are routinely employed as a model for ARHL. Whole-cell patch-clamp recordings from IHCs revealed smaller Ca²⁺ current amplitude in ARHL-model mice than in normal-hearing young mice. Notably, glutamate imaging using a glutamate optical sensor named EOS visualized excitatory neurotransmitter release from IHCs in young mice in real-time, although its temporal resolution remains to be improved to monitor auditory signal transduction in a millisecond time scale. This novel imaging technique might be a useful tool for analyses of synaptic functions of deaf mutant mice as well as differential diagnosis of patients with sensorineural hearing loss using disease-specific hair cell-like iPS cells.

研究分野：聴覚生理学

キーワード：内耳 蝸牛 有毛細胞 シナプス リボン グルタミン酸 イメージング パッチクランプ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴 (Age-related hearing loss, ARHL) は環境因子と遺伝因子の両者の影響を受ける複合的な病態と考えられており、騒音曝露、喫煙、飲酒、糖尿病・高血圧等の合併などにより難聴の進行が早まることが知られている。Schuknecht はヒト側頭骨病理所見に基づいて、加齢性難聴の成因を以下の4種類に分類した (Schuknecht & Gracek, 1993) (図1)。

- (1) 感覚上皮障害 (蝸牛・有毛細胞の喪失)
- (2) 神経障害 (蝸牛神経の喪失)
- (3) 代謝障害 (蝸牛・血管条の委縮)
- (4) 伝音障害 (蝸牛・基底版の弾性低下)

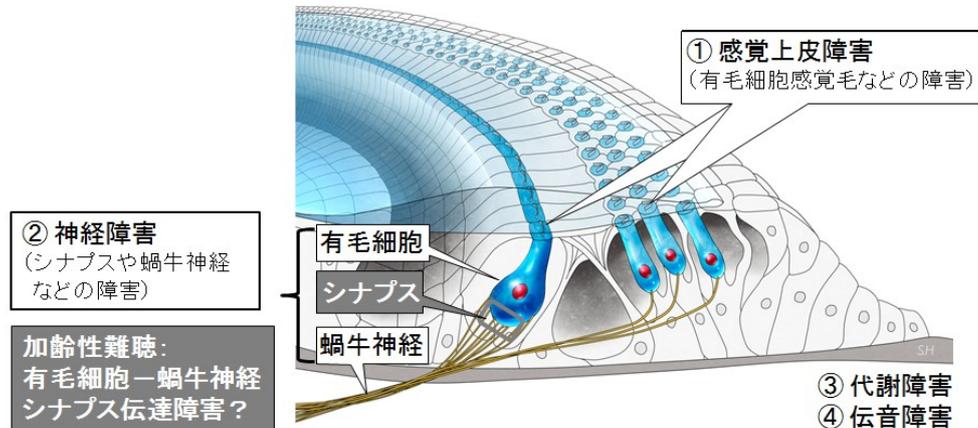


図1. ヒト側頭骨病理所見に基づいた加齢性難聴の成因分類と本研究の位置付け

その後、加齢性難聴罹患者を対象とした臨床研究から候補遺伝子が幾つか挙げられたが、何れも統計学的な優位差が得られなかった (総説として Bowl & Dawson, 2015)。このような状況のため、加齢性難聴の病態解明には動物モデルを用いた研究が必須となる。これまでに19種の近交系マウスが加齢性難聴を呈することが見出されたが、そのうち10種が第10染色体に原因遺伝子座 (ahl) がマップされることが明らかにされた (Johnson et al., 1997)。加齢性難聴モデルとして多用される C57BL/6J や DBA/2J では、ahl 遺伝子座にエンコードされる cadherin 23 が関連して感覚毛の加齢性変化が生じて、難聴を発症すると考えられている。一方、加齢性難聴モデル動物のシナプス伝達機能に関する研究は数少ない。聴覚中枢のうち蝸牛神経核の興奮性シナプスでは神経伝達物質の放出確率が低下し (Wang & Manis, 2005)、抑制性シナプスでも神経伝達物質の放出量が減少する (Xie & Manis, 2013)。しかしながら、内有毛細胞-蝸牛神経間のシナプス伝達機能の加齢性変化に関してはこれまでに報告が無い。

2. 研究の目的

加齢性難聴モデルマウスとして C57BL/6J マウスを用い、パッチクランプ法やグルタミン酸イメージングにより若齢群と加齢性難聴モデル群の内有毛細胞-蝸牛神経間の求心性シナプス (内有毛細胞リボンシナプス、図2) の神経伝達機能を比較し、「加齢に伴い有毛細胞シナプスにおける神経伝達機能が低下する」という仮説を検証する。これにより加齢性難聴の病態を解明し、加齢性難聴に対する創薬やリハビリテーション開発に必要な基盤情報を得ることを目指す。

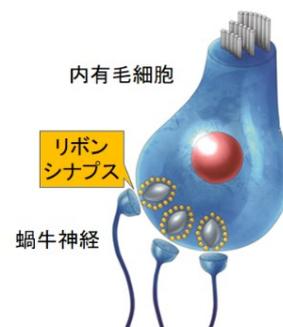


図2. 内有毛細胞リボンシナプス

内有毛細胞と蝸牛神経の間の個々の求心性シナプスで神経伝達物質(グルタミン酸)が放出される。

本研究で用いるグルタミン酸イメージングは廣瀬らのグループが開発した手法であり、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸に結合する蛍光プローブ (Glutamate (E) optical sensor, EOS) を用いて、シナプス前終末から放出されるグルタミン酸を光学的に検出するものである (Namiki et al., 2007; Okubo et al., 2010; Takikawa et al., 2014; Sakamoto et al., 2018)。このグループは、海馬初代培養系において興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を単一シナプスレベルで捉えることに成功している (Takikawa et al., 2014; Sakamoto et al., 2018)。この手法により、蝸牛・内有毛細胞リボンシナプスにおいても同様の空間解像度で神経伝達物質放出を検出することが期待される。従来のパッチクランプ法では時間分解能に優れたものの空間分解能に劣り、個々のシナプスの挙動を同時に観察することが出来ない。一方、グルタミン酸イメージングは空間分解能に優れ、個々のシナプスの神経伝達物質放出を同時測定可能である (図3)。本研究により内有毛細胞リボンシナプスにおけるグルタミン酸イメージングが実用化されれば、聴覚生理学および聴覚医学に大きな発展をもたらす。

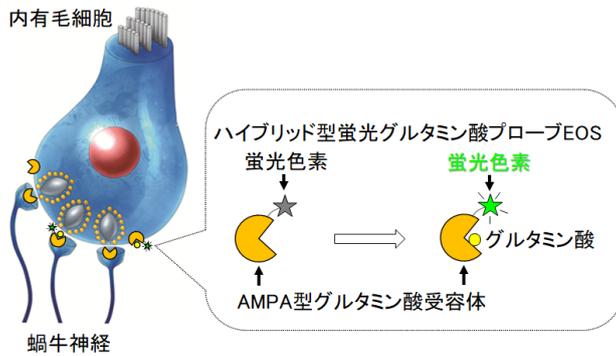


図3. グルタミン酸イメージング
興奮性シナプスの神経伝達物質であるグルタミン酸が蛍光プローブに結合すると、蛍光色素の蛍光強度が増加する。これにより、1個の内毛細胞当たり 10-20 個あるリボン型アクティブゾーンにおける神経伝達物質放出を光学的に検出することが可能である。

3. 研究の方法

早期から加齢性難聴を呈することが知られている C57BL/6J マウスを実験対象とする。以下の方法により正常聴力を有する若齢群（生後 2 週齢）と加齢性難聴モデル群（生後 5-6 月齢）からデータを取得し、それらを比較解析することで「加齢に伴い内毛細胞リボンシナプスにおける神経伝達機能が低下する」という仮説を検証する。

- (1) 若齢マウス・内毛細胞リボンシナプスを用い、蛍光グルタミン酸プローブを最適化する。
- (2) 若齢マウス・内毛細胞リボンシナプスの神経伝達機能をパッチクランプ法やグルタミン酸イメージングにより解析する。
- (3) 加齢性難聴モデルマウス・内毛細胞リボンシナプスの神経伝達機能をパッチクランプ法やグルタミン酸イメージングにより解析する。
- (4) 若齢群と加齢性難聴モデル群のデータを比較し、内毛細胞リボンシナプスにおける加齢性難聴の病態を解明する。

4. 研究成果

- (1) 若齢マウス・内毛細胞リボンシナプスにおける蛍光グルタミン酸プローブの最適化

野生型マウス（C57BL/6J, 生後 1-2 週齢）の蝸牛基底回転よりコルチ器を摘出した後、細胞外液（人工内リンパ液）で満たされた正立顕微鏡のステージ上に移した。このコルチ器急性標本に対して、クリーニング用ガラス電極を操作して蓋膜、外有毛細胞、内・外柱細胞の順に除去、内毛細胞と蝸牛神経を露出した。続いて、蛍光グルタミン酸プローブ EOS を細胞外液（人工外リンパ液）に混合したところ、内毛細胞ならびに蝸牛神経に EOS による蛍光シグナルを認めた（図 4）。

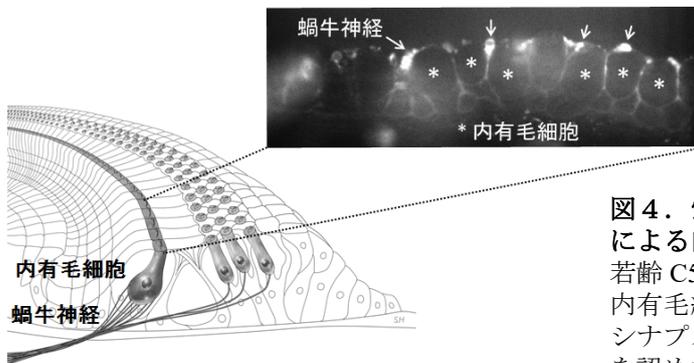


図4. 蛍光グルタミン酸プローブ EOS による内毛細胞、蝸牛神経の蛍光標識
若齢 C57BL/6J マウス（生後 14 日齢）の内毛細胞（*）と蝸牛神経（矢印）のシナプス部位に EOS による蛍光シグナルを認めた。

- (2) 若齢マウス・内毛細胞リボンシナプスの機能解析

(1)で記述した蛍光グルタミン酸プローブ EOS を内毛細胞、蝸牛神経に結合させたコルチ器標本に対して、標本還流用の人工外リンパ液の塩化カリウム濃度を 5.8 mM から 15 mM に切り替えることにより内毛細胞を脱分極刺激したところ、内毛細胞リボンシナプス部近傍において EOS の蛍光強度が上昇した（図 5）。蛍光シグナルの S/N 比が十分でなく聴覚伝達の精微な解析に必要なミリ秒単位の時間解像度を得られなかったものの、この結果は蛍光グルタミン酸プローブにより内毛細胞からの神経伝達物質放出を検出し得たことを意味する。先行研究のパッチクランプ記録にて、げっ歯類内毛細胞リボンシナプスからの神経伝達物質がグルタミン酸であることが示されていたが（Glowatzki & Fuchs, 2002）、本研究にて使用したグルタミン酸に特異的に検出する蛍光プローブにより改めて示された。

内毛細胞求心性シナプスにおけるグルタミン酸イメージングの時間解像度の改善を図るためには、多数の標本を用意して蛍光グルタミン酸プローブの見直しを行う必要があると考えられたが、蝸牛からコルチ器標本を得るのに時間を要するため効率面で限界がある。このため、蝸牛と同様のリボンシナプス構造を有し多数の単離細胞を得る方法が確立されている網膜双極細胞を用いて蛍光グルタミン酸プローブを再設計し、そこから得られたノウハウを蝸牛の実験に還元する方策を取った。

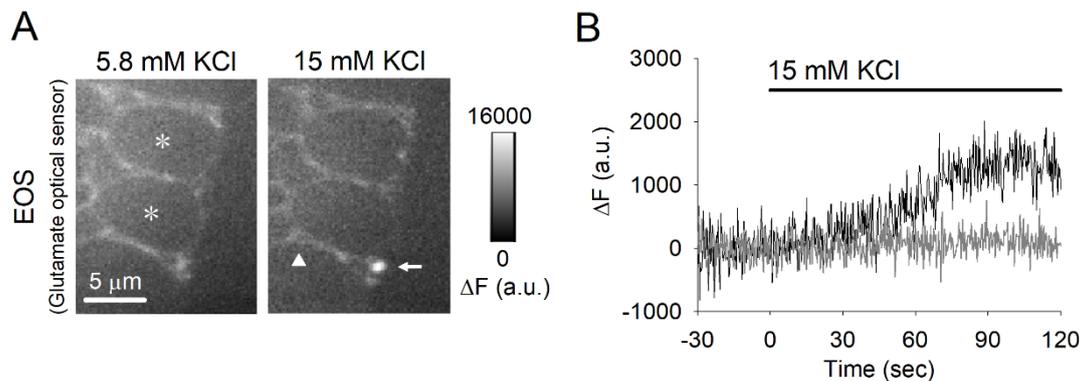


図5. 蛍光グルタミン酸プローブ EOS による内毛細胞リボンシナプスの機能評価

- (A) 若齢 C57BL/6J マウス (生後 14 日齢)・内毛細胞 (*) の求心性シナプス近傍 (矢印) において、細胞外還流液 (人工外リンパ) の塩化カリウム濃度を 5.8 mM (左) から 15 mM (右) に切り替えることにより内毛細胞に対して脱分極刺激を行うと、EOS の蛍光強度が上昇した。画像取得: 3 フレーム/秒、蛍光退色補正前のデータ。
- (B) 15 mM 塩化カリウムによる脱分極刺激に対する内毛細胞求心性シナプス近傍 (パネル A 矢印) のグルタミン酸シグナル (ΔF) の経時変化 (黒)。シナプス以外の部位 (パネル A 矢印) では、蛍光強度は変化していない (灰色)。蛍光退色補正後のデータ。

キンギョ網膜双極細胞への結合性を高めるよう再設計された蛍光プローブ (Bipolar cell-specific eEOS, BC-eEOS) を用いて、パッチクランプ法により -60 mV に膜電位固定した後に 100 ミリ秒間 -10 mV への脱分極刺激を与えたところ、CtBP 結合ペプチドにより蛍光標識されたシナプスリボンの近傍で BC-eEOS の蛍光強度変化が上昇した (毎秒 50-200 フレームでの画像取得)。これにより、感覚器リボンシナプスにおいてミリ秒単位の時間分解能で神経伝達物質放出を解析する道が拓かれた (2019 年 9 月の国際学会 Ribbon Synapses Symposium 2019 にてポスター受賞)。今後、この再設計された蛍光グルタミン酸プローブを内毛細胞リボンシナプスに適用し、ミリ秒単位の高時間分解能にて機能解析を行っていく計画である。

また、蝸牛における聴覚情報伝達の一連のプロセス、すなわち、(i) 内毛細胞感覚毛刺激、(ii) 受容器電位発生、(iii) 電位依存性カルシウムチャネル活性化に伴う細胞内への Ca^{2+} イオン流入、(iv) カルシウムセンサー (Otoferlin) 活性化、(v) 神経伝達物質放出、(vi) 蝸牛神経樹状突起における興奮性シナプス後電位発生、(vii) 蝸牛神経軸索起始部における活動電位発生のうち、(iii) 電位依存性カルシウムチャネル活性化に伴う細胞内への Ca^{2+} イオン流入をパッチクランプ法により測定した。若齢マウス・内毛細胞 (膜電位固定: -80 mV) に -10 mV への脱分極刺激を 100 ミリ秒間与えると、 162 ± 8.2 pA ($n = 7$) の振幅を有する Ca^{2+} 電流を得た (図 6)。

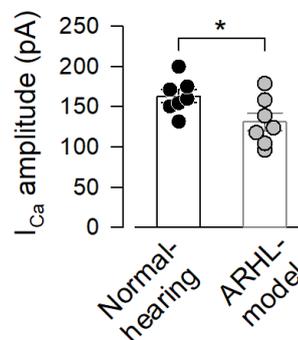


図6. 若齢群と加齢性難聴モデル群の内毛細胞の Ca^{2+} 電流振幅
若齢群 (Normal-hearing) と比較して、加齢性難聴モデル群 (ARHL-model) の内毛細胞の Ca^{2+} 電流振幅 (I_{Ca} amplitude) が有意に減少した ($p < 0.05$)。

- (3) 加齢性難聴モデルマウス・内毛細胞リボンシナプスの機能解析

若齢マウスと同様にして (もしくは内毛細胞を単離して)、パッチクランプ法により電位依存性カルシウムチャネル活性化に伴う内毛細胞内への Ca^{2+} イオン流入を測定した。加齢性難聴モデルマウス・内毛細胞 (膜電位固定: -80 mV) に -10 mV への脱分極刺激を 100 ミリ秒間与えると、 130.9 ± 11.1 pA ($n = 7$) の振幅を有する Ca^{2+} 電流を得た (図 6)。

- (4) 若齢群と加齢性難聴モデル群との間でのデータの比較

脱分極誘発性の Ca^{2+} 電流振幅を若齢群 (2) と加齢性難聴モデル群 (3) との間で t 検定により比較すると、有意差 ($p = 0.041$) が認められた (図 6)。これより、「加齢に伴い有毛細胞シナプスにおける神経伝達機能が低下する」という仮説が支持された。

- (5) 難聴遺伝子 Otoferlin の機能解析

遺伝性難聴 DFNB9 の責任分子であり且つ蝸牛特異的なカルシウムセンサーである Otoferlin が、幼若マウス (生後 8-11 日齢) の内毛細胞リボンシナプスにおいて神経伝達物質放出のモードを制御するという新規知見を得て、原著論文として国際誌に発表した (Takago et al., 2019)。この機能が加齢に伴い障害されるのか興味深いところであり、今後の検討課題である。

本研究により、脱分極に伴う内有毛細胞への Ca^{2+} 流入が加齢により減少することが示唆された。パッチクランプ法により得られる脱分極誘発性の Ca^{2+} 電流は、1つの内有毛細胞の中に数10個あるリボン型アクティブゾーンにて生じる Ca^{2+} 電流の総和であるため、(i) 個々のリボン型アクティブゾーンにて生じる Ca^{2+} 電流には変化がないものの、シナプスリボンの総数が減少する、

(ii) 個々のリボン型アクティブゾーンにて生じる Ca^{2+} 電流が減少し、リボン型アクティブゾーンの総数は変化しない、(iii) それらの両者が起こる、以上の可能性が考えられる。免疫組織化学法を用いた先行研究により、シナプスリボンの総数(リボン型アクティブゾーンの総数と等価)が加齢により減少することが示されており (Sergeyenko et al., 2013)、(ii)の可能性は否定される。

(i) (iii) の鑑別については、個々のリボン型アクティブゾーンにおける Ca^{2+} 流入の計測が必要となるが、パッチクランプ法では解決困難である。今後、若齢および加齢性難聴モデルマウスの単一内有毛細胞の中の個々のリボン型アクティブゾーンに対してカルシウムイメージングとグルタミン酸イメージングを行い、加齢に伴い内有毛細胞求心性シナプスにおける神経伝達機能が低下するメカニズムを更に追求していく必要がある。

【参考文献】

1. Schuknecht HF, Gacek MR. (1993) Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 102(1 Pt 2):1-16. doi: 10.1177/00034894931020S101.
2. Bowl MR, Dawson SJ (2015) The mouse as a model for age-related hearing loss - a mini-review. *Gerontology.* 61(2):149-157. doi: 10.1159/000368399.
3. Johnson KR, Erway LC, Cook SA, Willott JF, Zheng QY. (1997) A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res.* 114(1-2):83-92. doi: 10.1016/s0378-5955(97)00155-x.
4. Wang Y, Manis PB. (2005) Synaptic transmission at the cochlear nucleus endbulb Synapse during age-related hearing loss in mice. *J Neurophysiol.* 94(3):1814-1824. doi: 10.1152/jn.00374.2005.
5. Xie R, Manis PB. (2013) Glycinergic synaptic transmission in the cochlear nucleus of mice with normal hearing and age-related hearing loss. *J Neurophysiol.* 110(8):1848-1859. doi: 10.1152/jn.00151.2013.
6. Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Iino M, Hirose K. (2007) *Eur J Neurosci.* 25(8):2249-2259. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05511.x.
7. Okubo Y, Sekiya H, Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Yamasaki M, Watanabe M, Hirose K, Iino M. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(14):6526-6531. doi: 10.1073/pnas.0913154107.
8. Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Hirose K. (2014) *Angew Chem Int Ed Engl.* 53(49):13439-12343. doi: 10.1002/anie.201407181.
9. Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Hirose K. (2018) *Nat Neurosci.* 21(1):41-49. doi: 10.1038/s41593-017-0041-9.
10. Glowatzki E, Fuchs PA. (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci.* 5(2):147-154. doi: 10.1038/nn796.
11. Takago H, Oshima-Takago T, Moser T. (2019) Disruption of otoferlin alters the mode of exocytosis at the mouse inner hair cell ribbon synapse. *Front Mol Neurosci.* 11:492. doi: 10.3389/fnmol.2018.00492.
12. Sergeyenko Y, Lall K, Liberman MC, Kujawa SG. (2013) "Age-related cochlear synaptopathy: An early-onset contributor to auditory functional decline," *J Neurosci.* 33(34):13686-13694. doi:10.1523/JNEUROSCI.1783-13.2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hideki Takago, Tomoko Oshima-Takago, Tobias Moser	4. 巻 11
2. 論文標題 Disruption of otoferlin alters the mode of exocytosis at the mouse inner hair cell ribbon synapse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2018.00492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takago Hideki, Oshima-Takago Tomoko	4. 巻 362
2. 論文標題 Pre- and postsynaptic ionotropic glutamate receptors in the auditory system of mammals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 1～13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heares.2018.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshima-Takago Tomoko, Takago Hideki	4. 巻 7
2. 論文標題 NMDA receptor-dependent presynaptic inhibition at the calyx of Held synapse of rat pups	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 170032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.170032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鷹合秀輝
2. 発表標題 Bassoon and Otoferlin-dependent regulation of glutamate release at the inner hair cell ribbon synapse
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Oshima-Takago, Hideki Takago
2. 発表標題 Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptor inhibits Ca ²⁺ currents at a rat central glutamatergic synapse
3. 学会等名 6th Mediterranean Neuroscience Society Conference 2017 MALTA MNS2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鷹合秀輝, 大島知子
2. 発表標題 聴覚中枢におけるNMDA受容体によるシナプス前抑制
3. 学会等名 第62回日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鷹合秀輝
2. 発表標題 ラット聴覚中枢におけるシナプス前部NMDA受容体による神経伝達物質放出の抑制
3. 学会等名 第27回日本耳科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鷹合秀輝, 大島知子
2. 発表標題 中枢神経系のグルタミン酸作動性シナプスにおいてシナプス前NMDA受容体は電位依存性カルシウムチャンネルを抑制する
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大島知子, 鷹合秀輝
2. 発表標題 若齡ラットcalyx of HeldシナプスにおけるNMDA受容体依存性シナプス前抑制
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大島知子, 鷹合秀輝
2. 発表標題 幼若ラットcalyx of HeldシナプスにおけるNMDA受容体依存性シナプス前抑制
3. 学会等名 生理学研究所シナプス研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立障害者リハビリテーションセンター・研究所・感覚機能系障害研究部・感覚認知障害研究室 http://www.rehab.go.jp/ri/departj/kankaku/465/
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大島 知子 (Oshima-Takago Tomoko) (50731783)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員 (12601)	