

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16895

研究課題名（和文）経口投与可能なTrkB作動薬による新たな内耳治療戦略の構築

研究課題名（英文）Construction of a new inner ear treatment strategy by orally administrable TrkB agonist

研究代表者

木下 淳 (Kinoshita, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：10755648

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）：経口投与可能なTropomyosin-receptor-kinase B (TrkB) 作動薬である7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF) の前庭および蝸牛障害動物モデルに対する治療効果を検証した。GM性前庭障害モデル動物に7,8-DHFを経口投与すると前庭組織において膨大部神経の温存、前庭有毛細胞の自発的再生増加、有毛細胞-膨大部神経間のシナプスリモデリングがみられ、最終的に前庭機能が改善することが明らかとなった。一方、騒音暴露による蝸牛障害モデルにおいては、7,8-DHFによる騒音性難聴の改善効果はみられず、組織学的にも有毛細胞の保護・改善効果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの内耳障害治療は、不可逆的な聴覚・平衡障害をきたす恐れのある内耳局所の侵襲を伴う手法を余儀なくされ、臨床応用への高い障壁となっていた。本研究では神経栄養因子BDNF類似のTrkB作動薬である7,8-DHFの経口投与により、薬剤性前庭障害が改善することを示した。本研究結果は新たな内耳障害の治療戦略として、7,8-DHFの経口投与が薬剤性や加齢性の平衡障害をはじめとする有毛細胞障害、求心性神経障害が病態の一つと考えられる全ての内耳障害の治療に結び付く可能性を示したという臨床応用的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the therapeutic effect of 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF), an orally available tropomyosin-receptor-kinase B (TrkB) agonist, on vestibular and cochlear injury animal models.

Oral administration of 7,8-DHF to gentamicin-induced vestibular disorder model animals showed preservation of ampullary nerves, increased spontaneous regeneration of vestibular hair cells, and synaptic remodeling between hair cells and ampullary nerves, and finally their vestibular function was improved.

On the other hand, in the noise-induced cochlear disorder model with oral administration of 7,8-DHF showed no significant ABR improvement effect and no histological protection or improvement effect on cochlear hair cells was obtained.

研究分野：神経耳科学

キーワード：内耳障害 難聴 めまい BDNF TrkB

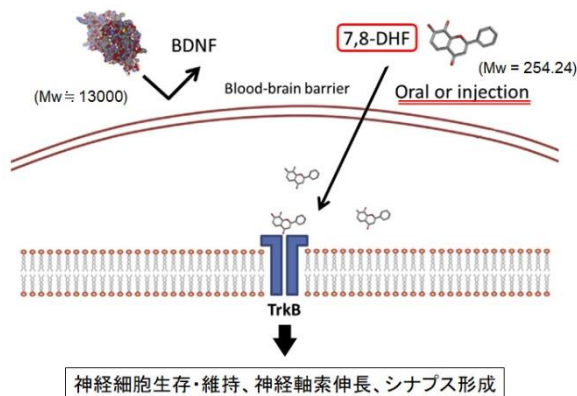
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内耳障害は、薬物、騒音、加齢など様々な原因で生じるが、多くは内耳の感覚有毛細胞障害と引き続く神経軸索の不可逆性障害であり有効な治療手段がない。聴覚系の障害は持続する難聴や耳鳴症状をもたらし、前庭系の障害はめまいやふらつきといった症状をきたすため患者の生活の質は大きく低下する。

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は特異的受容体 **tropomyosin-receptor-kinase B (TrkB)** に結合し、神経細胞の生存・維持、神経軸索および樹状突起成長やシナプス形成など神経発生に不可欠な分子として注目を集めているが、これまでの BDNF を用いた内耳治療の報告^{1,2}は、血液内耳関門が障壁となり侵襲を伴う内耳局所投与を余儀なくされ臨床応用が困難であった。2010 年に TrkB 受容体作動薬である **7, 8-Dihydroxyflavone (7, 8-DHF)** が血液脳関門を通過可能な低分子化合物として開発されて以降、パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症、アルツハイマー病など多くの神経変性疾患に対する治療効果が示されている³。

以上のような背景から、7, 8-DHF の経口投与が他の神経変性疾患と同様に、内耳障害の新たな治療戦略となり得ると考えられ、それらの手法を用いた内耳障害の治療効果や詳細な作用機序の解明が求められている。



2. 研究の目的

内耳障害として前庭および蝸牛障害モデル動物を作成し、各々に対して① 7, 8-DHF 経口投与後の治療効果と TrkB 受容体シグナル伝達機構の解析を行い、内耳障害症例の治療応用へと展開するための研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

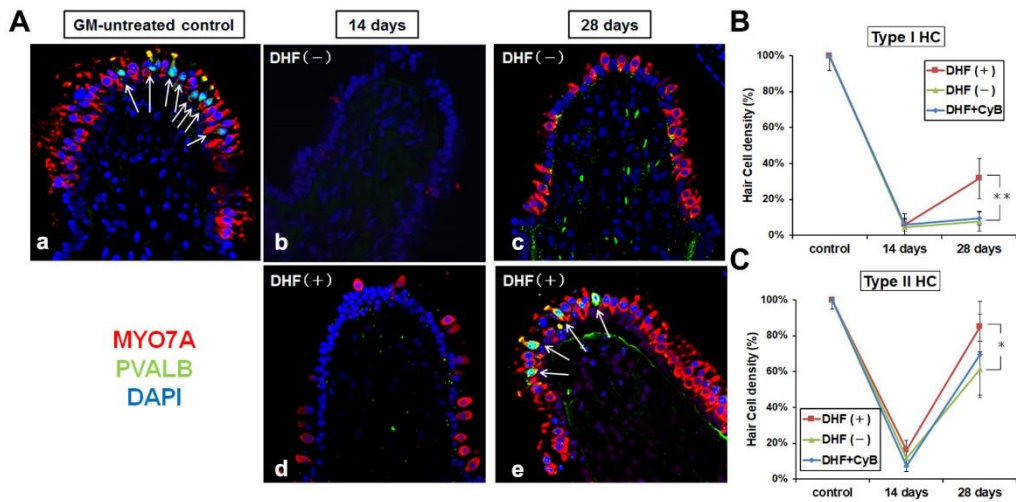
前庭感覚有毛細胞障害モデル動物は生後 4 週齢のハートレーモルモット (雄) の左耳蝸牛にゲンタマイシン (GM) を局所投与にて作製した。前庭障害モデル動物を、A) 7, 8-DHF 連日単独投与、B) Cyclotraxin-B (CyB: TrkB 受容体阻害薬) 連日単独投与、C) 7, 8-DHF + CyB 連日同時投与の 3 群に分け、GM 投与後 7、14、28 日目に前庭を採取し、D) GM 未処置対照群とあわせて凍結切片を作製した。それぞれ有毛細胞、神経線維、前/後シナプスのマーカーとして Myosin7a、NF-200、Ctbp-2/PSD-95 に対する免疫蛍光染色で前庭組織局所での染色性の変化、前庭神経軸索密度、前庭神経節細胞密度、前庭神経-有毛細胞間シナプス形成数を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。前庭採取前の各期間で機能評価として温度眼振検査を行い眼振持続時間計測による半規管麻痺の程度を解析した。

蝸牛感覚有毛細胞障害モデル動物は生後 4 週齢のハートレーモルモット (雄) に、防音室内で 120dB、4-kHz オクターブバンドノイズを 4 時間暴露することで作製した。上記と同様の A)-C) の 3 群において、騒音暴露後 1、7、14、28 日目に蝸牛を採取し、D) 騒音暴露なしの対照群とあわせて、蝸牛組織中の TrkB 受容体シグナル伝達分子の染色性の変化、蝸牛神経軸索密度、ラセン神経節細胞密度、蝸牛神経-有毛細胞間のシナプス形成数の評価、各期間における聴性脳幹反応 (ABR) の閾値変化を解析した。

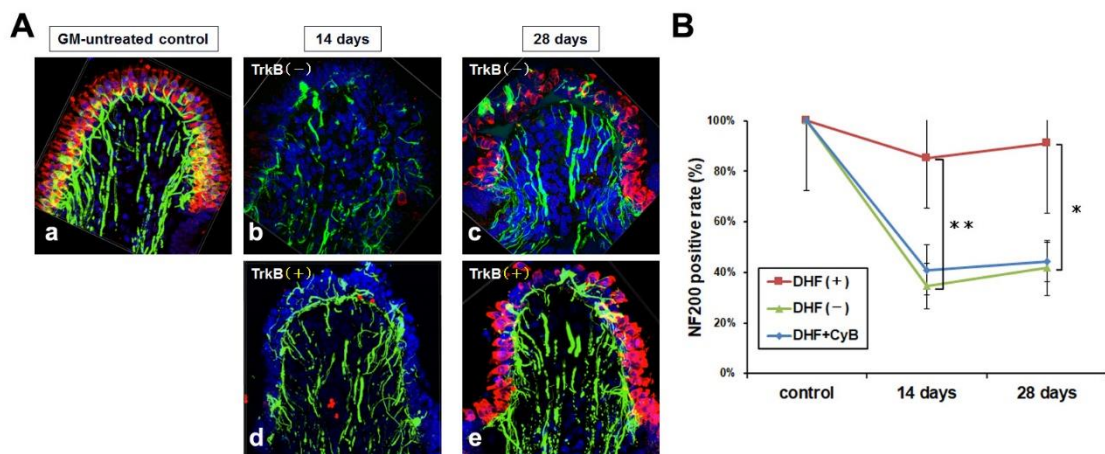
4. 研究成果

1) 薬剤性前庭障害に対する 7, 8-DHF 投与効果

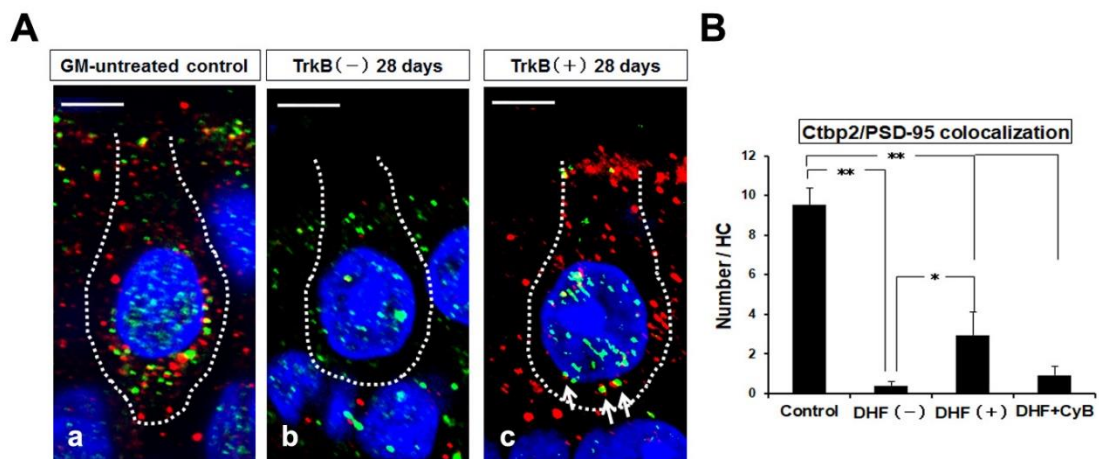
半規管膨大部における I 型、II 型有毛細胞密度の変化について、Day 14 では DHF (+) 群と DHF (-) 群、DHF+CyB 群の有毛細胞はいずれも I 型、II 型ともに消失したが、Day 28 では DHF (+) 群のみ I 型有毛細胞の有意な増加を認めた。II 型 HC は各群で Day14 よりも Day28 で増加を示したが、DHF (+) 群の増加の方が高かった。



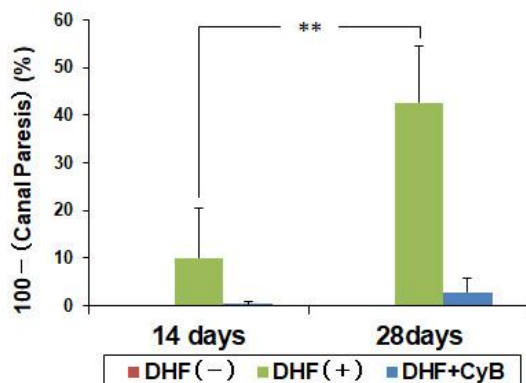
NF200 で標識した膨大部神経の体積は DHF (-) 群および DHF+CyB 群では減少し、DHF (+) 群では Day 14、28 ともに対照群との差を認めなかった。



Ctbp2 で標識された HC の前シナプスはいずれの群においても若干の減少傾向を示したが対照群との差は認めなかった。一方、PSD-95 で標識された後シナプスについては DHF (-) 群および DHF+CyB 群が対照群と DHF (+) 群と比較して有意に低下し、Ctbp2 と PSD-95 の共局在も同様に DHF (-) 群および DHF+CyB 群で有意に低下していた。DHF (+) 群における Ctbp2 と PSD-95 の共局在は対照よりは低値であったが、DHF (-) 群との比較では高値を示した。



温度眼振検査は Day 14 で各群無反応となったが、DHF (+) 群の Day 28 では半規管麻痺が 60%程度に改善した。

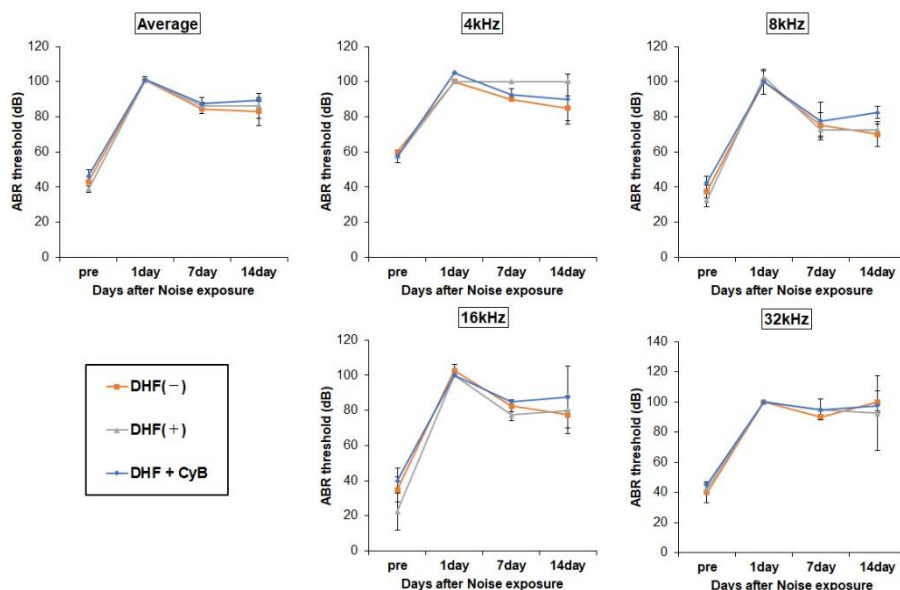


GM 性前庭障害モデル動物に 7,8-DHF を経口投与すると前庭組織において膨大部神経の温存、前庭有毛細胞の自発的再生増加、有毛細胞-膨大部神経間のシナプスリモデリングがみられ、最終的に前庭機能が改善することを明らかにした。

この結果は経口投与した 7,8-DHF が前庭組織に到達し、DHF 受容体を介して前庭障害改善効果が生じたことを示唆する。

2) 蝸牛障害に対する 7,8-DHF 投与後の DHF シグナル伝達機構の解明

蝸牛障害モデルに対して騒音暴露の 2 時間後から 14 日間 7,8-DHF を経口投与し、聴性脳幹反応を測定した。しかしながら、7,8-DHF による騒音性難聴の改善効果はみられず、組織学的検討においても騒音暴露のみの群と比較して蝸牛組織における DHF 下流シグナルの活性化や有毛細胞の保護・改善効果は得られなかった。



一般に哺乳類における内耳有毛細胞は前庭では多少の自発的再生が認められ、蝸牛では再生は起こらないとされている。これまで、前庭組織においては有毛細胞の自発的再生は認めるものの、求心性神経とのシナプス伝達が回復しないことが問題であった。今回、GM による前庭障害後に 7, 8-DHF を投与した申請者の実験では有毛細胞の保護効果は認められず、一度大幅に消退した後に再生した有毛細胞と 7, 8-DHF 投与により保護または伸展した膨大部神経との間で新たにシナプス形成が促されたことが前庭機能改善に帰結したと考察される。蝸牛においては有毛細胞を障害しない程度の騒音曝露によりモデル動物を作成したが、7,8-DHF の経口投与による有意な聴力改善は得られず、組織学的にも明らかな差は認めなかった。今後更なる検証が必要である。

<引用文献>

- 1 Kopke, R. D. *et al.* Growth factor treatment enhances vestibular hair cell renewal and results in improved vestibular function. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5886-5891, doi:10.1073/pnas.101120898 (2001).
- 2 Lopez, I. *et al.* The protective effect of brain-derived neurotrophic factor after gentamicin ototoxicity. *Am J Otol* **20**, 317-324 (1999).
- 3 Liu, C., Chan, C. B. & Ye, K. 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular DHF agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders. *Transl Neurodegener* **5**, 2, doi:10.1186/s40035-015-0048-7 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kinoshita Makoto, Fujimoto Chisato, Iwasaki Shinichi, Kashio Akinori, Kikkawa Yayoi S., Kondo Kenji, Okano Hideyuki, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Alteration of Musashi1 Intra-cellular Distribution During Regeneration Following Gentamicin-Induced Hair Cell Loss in the Guinea Pig Crista Ampullaris	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00481	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 -
1. 著者名 Fujimoto Chisato, Kinoshita Makoto, Kamogashira Teru, Egami Naoya, Kawahara Takuya, Uemura Yukari, Yamamoto Yoshiharu, Yamasoba Tatsuya, Iwasaki Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Noisy galvanic vestibular stimulation has a greater ameliorating effect on posture in unstable subjects: a feasibility study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53834-7	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 -
1. 著者名 Ichijo Kentaro, Kinoshita Makoto, Fujimoto Chisato, Uranaka Tsukasa, Kikkawa Yayoi S., Sugawara Keiko, Yamasoba Tatsuya, Iwasaki Shinichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Acute bilateral vestibulopathy with simultaneous involvement of both superior and inferior vestibular nerves	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.07.007	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 -
1. 著者名 Inoue Aki, Iwasaki Shinichi, Fujimoto Chisato, Kinoshita Makoto, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 40
2. 論文標題 Progression of Peripheral Vestibular Dysfunctions in Patients With a Mitochondrial A3243G Mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 359 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002091	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 Kamogashira Teru, Fujimoto Chisato, Kinoshita Makoto, Kikkawa Yayoi, Yamasoba Tatsuya, Iwasaki Shinichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Prediction of Vestibular Dysfunction by Applying Machine Learning Algorithms to Postural Instability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2020.00007	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 -

1. 著者名 岩崎真一	4. 巻 121
2. 論文標題 両側前庭障害に対する治療: 基礎研究と臨床研究の最前線	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho	6. 最初と最後の頁 14~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3950/jibiinkoka.121.14	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木下淳、岩崎真一、竹内成夫、藤本千里、吉川弥生、菅澤恵子、山岨達也
2. 発表標題 メニエール病と遅発性内リンパ水腫における気導cVEMPの周波数特性についての検討
3. 学会等名 第78回めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一條研太郎、木下淳、藤本千里、浦中司、吉川弥生、菅澤恵子、岩崎真一、山岨達也
2. 発表標題 両側上下前庭神経系機能の同時障害を認めた急性両側前庭機能障害の一例
3. 学会等名 第29回日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gao Ying, Makoto Kinoshita, Shinichi Iwasaki, Akinori Kashio, Yayoi S Kikkawa, Tatsuya Yamasoba.
2. 発表標題 The Contribution of Necroptosis in Gentamicin-induced Hair Cells death in Mice Cochlear Organotypic Cultures
3. 学会等名 第29回日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山美咲、木下淳、堀切教平、岸本めぐみ、菊田周、近藤健二、山岨達也
2. 発表標題 指圧マッサージ施行後にPott's puffy tumorを呈した1例
3. 学会等名 第58回日本鼻科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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