

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19713

研究課題名(和文)有毛細胞と聴神経繊維のシナプスをターゲットとする新規内耳再生治療への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to development of new regenerative therapy targeting synapses between hair cells and auditory nerve fibers

研究代表者

欠畑 誠治(Kakehata, Seiji)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90261619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では蝸牛器官培養系を用いて聴神経障害モデルを作製し聴神経の再生を試みた。Wangらの報告をもとに神経障害モデルを作製し、聴神経線維および聴神経-有毛細胞間シナプスが障害され、聴神経の胞体および内外有毛細胞が残存している状態を再現できた。本モデルに、神経・シナプス保護効果および再生作用が報告されているRho kinase(ROCK)阻害薬を作用させることで、一度障害された聴神経が伸長し、減少した後シナプスマーカーPSD95の発現が増加している可能性が示された。さらに、PCRによるRho-ROCK経路の発現変化の確認を行い、障害後にmRNA発現量が増加していることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴覚障害に対する治療研究の中でも、内耳再生は極めて困難であると同時に、最も注目されているテーマの一つである。本研究ではprimary neural degenerationおよびcochlear synaptopathyという新しい病態概念に基づき、聴神経-有毛細胞間シナプスをターゲットとした画期的な新規治療法の開発に挑戦した。本研究で用いたROCK阻害薬は、すでに臨床応用されている薬剤であり、臨床応用へのハードルも決して高くはないと考えられるため、これまで有効な治療法が存在しなかった感音難聴に対する画期的な治療方法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Inner ear regeneration is one of the unsolved themes in therapeutic research for hearing impairment. In this study, we challenged the development of a new therapeutic method targeting auditory nerve-inner hair cell synapses based on the new pathological concepts of primary neural degeneration and cochlear synaptopathy.

Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) inhibitors has been reported to have neuroprotective and regenerative effects on synaptic pathways. Therefore, we analyzed the effect of ROCK inhibitions in a model of peripheral axonal damage in the spiral ganglion neurons induced by the glutamate agonists, N-methyl-D-aspartate (NMDA) and kainic acid in the explanted cochlea. This study suggested that ROCK inhibitors would be a potentially therapeutic candidate for the regeneration of peripheral axons and synaptic reformation in the cochlea.

研究分野：聴覚再生

キーワード：内耳 聴神経 有毛細胞 シナプス 再生 神経 再生医学 ROCK阻害薬

### 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は難聴のうちでもっとも大きな割合を占めている、極めて罹患率の高い、いわゆる「ありふれた」疾患であるが、その根本的治療法は確立していない。内耳蝸牛内では内・外有毛細胞と、有毛細胞とシナプス形成している聴神経が存在し、中枢に音信号を伝えている。これまでの報告から、内耳障害では有毛細胞が主に障害されると考えられていた (Johnsson LG. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1974.)。しかしながら、2009年に Kujawa らは、一過性の音響障害では有毛細胞は脱落せず、聴神経と有毛細胞とのシナプスのみが消失していることを報告した (J Neurosci. 2009)。その後、このような現象は加齢性難聴でも確認され (Sergeyenko Y et al. J Neurosci. 2013)、primary neural degeneration と表現されるとともに、感音難聴の成因而として cochlear synaptopathy という病態概念が新たに提唱された (Kujawa SG and Liberman MC. Hear Res. 2015)。これまで提唱されていた有毛細胞障害が感音難聴の主な成因而であるという説も、primary neural degeneration がより進行した結果と考えても矛盾はなく、感音難聴の成因而として聴神経および有毛細胞-聴神経間のシナプスが重要であると考えられる (図 1)。

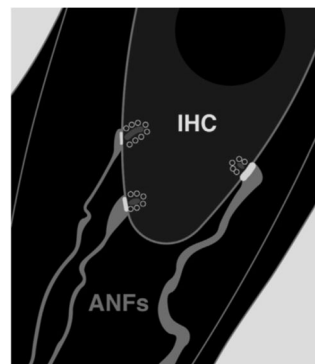


図 1 有毛細胞-聴神経間のシナプスのシェーマ (Kujawa SG and Liberman MC. Hear Res. 2015)  
ANFs:聴神経繊維、IHC:内毛細胞  
矢印:有毛細胞-聴神経間シナプス

### 2. 研究の目的

感音難聴の治療法開発については、これまでは有毛細胞を対象とした研究が主流であった。しかしながら、cochlear synaptopathy という病態概念に基づくと、実際には聴神経-有毛細胞間シナプスこそが最も重要性の高いターゲットである可能性が示唆される。そこで本研究では聴神経-有毛細胞間シナプスをターゲットとした新しい内耳再生治療法の開発を試みた。中枢・末梢神経系の基礎研究を参考として候補薬剤を渉猟した結果、神経・シナプス再生作用などの多面的な効果を持つとされる ROCK (Rho associated coiled-coil containing protein kinase) 阻害薬に着目した。内耳蝸牛領域においても ROCK 阻害薬による聴神経線維の伸長促進などの重要な知見が示されており (Lie M et al. Neuroscience. 2010)、内耳障害における有毛細胞-聴神経間のシナプス再形成に関してもその効果を発現する可能性が期待される (図 2)。

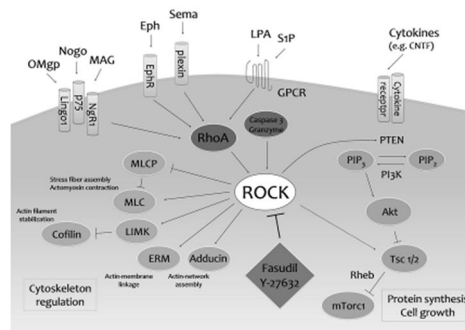


図 2 神経の生存と再生における ROCK シグナル経路 (Tönges L et al, Front Mol Neurosci. 2011)

### 3. 研究の方法

#### 実験動物および材料

実験材料として生後 4-6 日目のマウス (C57BL/6J) を用いた。マウスは氷上での低体温麻酔を行った上で断頭した。マウス側頭骨より内耳を採取し、実体顕微鏡下に PBS 内で感覚上皮を単離した。

#### 蝸牛器官培養

単離した蝸牛組織を使用し器官培養を行った。培養液の組成は以下の通りである。DMEM/F12 (gibco)、10 % FBS (SIGMA)、25 mM HEPES (gibco)、N-2 Supplement (gibco)、B-27 Supplement (gibco)、100 U/l penicillin G (WAKO)。37°C、5% CO<sub>2</sub> で最長 72 時間まで培養を行った。聴神経障害モデル作製には glutamate 受容体アゴニストである N-Methyl-D-aspartic Acid (Tocris Bioscience) と Kainic Acid (Tocris Bioscience) を使用した。ROCK 阻害薬は Y-27632 (Wako 257-00511) を使用した。

#### 蝸牛器官培養神経障害モデルの作製

神経障害モデル作製は Wang らの報告 (J Neurosci. 2011) に基づき、原法と同じ条件の NMDA 0.5 mM + Kainic acid 0.5 mM、2 時間の条件で行った。

#### 神経障害モデルに対する ROCK 阻害薬の効果についての検討

蝸牛器官培養神経障害モデルに対する ROCK 阻害薬の影響について、以下の 3 群の条件を設

定し比較検討した。 control 群、 NK 処理群 (NMDA 0.5 mM + Kainic acid 0.5 mM、 2 時間後、洗淨して培養継続)、 ROCK 阻害薬作用群 (NK 処理後に洗淨して、培養液中に 10  $\mu$ M Y27632 を添加)。 培養後 24 時間、 72 時間で免疫組織化学的な形態評価を行った。

### 免疫組織化学

組織は PBS で洗淨後、4%パラホルムアルデヒド / PBS にて室温で 1 時間反応させ固定した。 PBS で洗淨したのち、0.3% TritonX / 5% BSA / PBS にて室温で 1 時間ブロッキングをおこなった。 1 次抗体は、有毛細胞マーカー-Rabbit anti- Myo7a (1:1000 Sigma: N4142)、聴神経マーカー-Rabbit anti-NF200 (1:1000 Sigma: N4142) 、Chicken anti-NF200 (1:1000 chemicon: AB5539)、前シナプスマーカー-Mouse (IgG1) anti-CtBP2 (1:1000 BD biosciences: 612044)、後シナプスマーカー-Mouse (IgG2a) anti-PSD95 (1:5000 abcam: ab2723) を使用した。すべての抗体において 4°C で 16 時間反応させた。 PBS で洗淨後、2 次抗体として 500 倍希釈した Alexa405 Goat anti-Rabbit IgG (Invitrogen: A31556)、Alexa488 Donkey anti-Rabbit IgG (Invitrogen: A21206)、Alexa488 Goat anti-Chicken IgG (Invitrogen: A11039)、Alexa 488 Goat anti-Mouse IgG2a (Invitrogen: A21131)、Alexa 568 Goat anti-Mouse IgG1 (Invitrogen: A-21124) を用いて室温で 2 時間反応させた。 PBS 洗淨し、グリセロールで封入し観察した。

### 蛍光観察

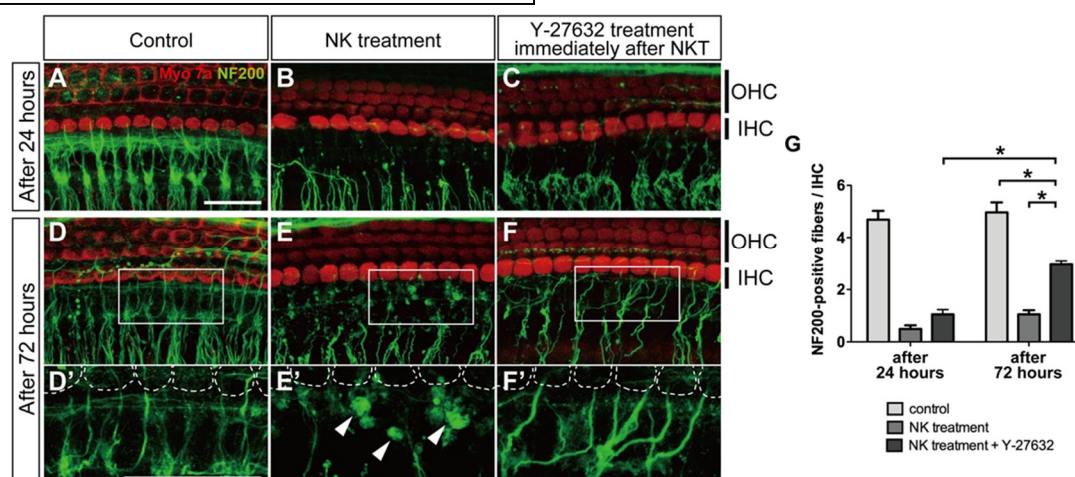
共焦点レーザー顕微鏡 LSM-700 (Carl Zeiss) を用いて観察を行った。聴神経線維数の解析は Z-series での解析を行った。 Myo7a 陽性内有毛細胞に接する NF200 陽性の聴神経繊維を計測し、1 内有毛細胞あたりの聴神経線維数として算出した。シナプス数は Maximum intensity projection (MIP: 最大値投映法) での解析を行った。画像解析ソフト imageJ を用いて、Myo7a 陽性内有毛細胞上での CtBP2 および PSD95 陽性シグナルの数を計測し、1 内有毛細胞あたりのシグナルの数を算出した。統計学的解析には、Kruskal-Wallis 法による一元配置分散分析および Dann-Bonferroni 法による多重比較検定を行った。

## 4. 研究成果

### 蝸牛器官培養神経障害モデルの作製と ROCK 阻害薬による神経線維数の変化

NMDA 0.5 mM + Kainic acid 0.5 mM、2 時間の条件で NK 処理を行ったところ、培養後 24 時間、72 時間の時点で、1 内有毛細胞あたりの聴神経線維数は対照群と比較して有意な減少を示した(図 3. A,B,D,E,G)。本研究で採用した障害モデルにおいて、報告通りに聴神経障害が惹起されることが確認できた。内有毛細胞および外有毛細胞の形態学的な障害も認めず、観察に支障がないことも確認できた(not shown)。引き続き ROCK 阻害薬を作用させて検討を行った。培養 24 時間後の ROCK 阻害薬作用群では聴神経線維数が NK 処理群と比較してやや多い傾向はあったが有意差は認めなかった(図 3. C,G)。一方、培養 72 時間後では ROCK 阻害薬で NK 処理群と比較して有意に多くの聴神経線維数を確認できた(図 3. F,G)。ROCK 阻害薬作用群でも内有毛細胞および外有毛細胞の減少は認めなかった(not shown)。

図 3. ROCK 阻害薬による神経線維数の変化

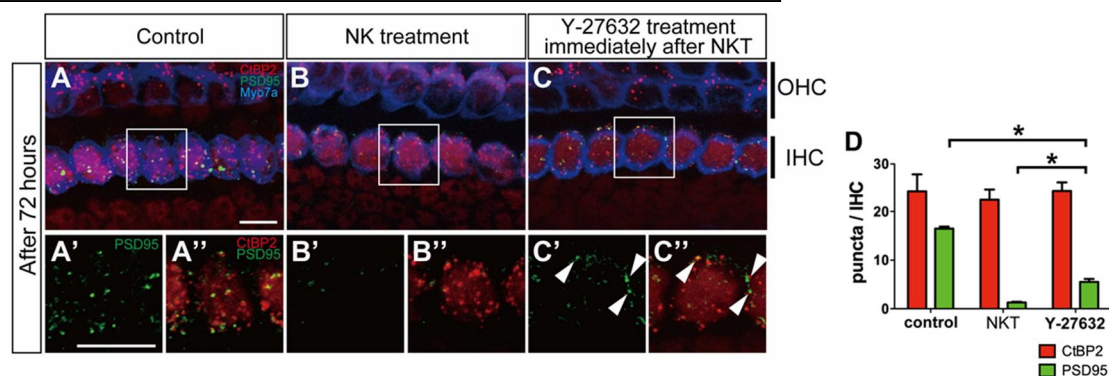


### ROCK 阻害薬による後シナプスマーカーの発現変化

前シナプスマーカーである CtBP2 は、NK 処理により障害されないことが報告されている。一

方、後シナプスマーカーである PSD95 は NK 処理により消失する。本研究では ROCK 阻害薬の聴神経-有毛細胞シナプスへの影響を確認する目的で、PSD95 の陽性シグナル数変化に着目して検討した。培養 72 時間後において、PSD95 の陽性シグナル数は NK 処理群で著明に減少していることが確認できた (図 4. B', D)。一方、ROCK 阻害薬作用群では PSD95 の陽性シグナル数増加を確認できた (図 4. C', D)。画像解析ソフトによる解析では control 群で  $16.49 \pm 1.06$ 、NK 処理群で  $1.30 \pm 0.36$  と PSD95 陽性シグナルの減少を認め ( $p < 0.01$ )、ROCK 阻害薬作用群では  $5.52 \pm 1.50$  と NK 処理群と比較して PSD95 陽性シグナルの増加を確認できた (図 4. J,  $p < 0.01$ )。

図 4. ROCK 阻害薬添加による後シナプスマーカーの発現変化



聴覚障害に対する治療研究の中でも、内耳再生は極めて困難であると同時に、最も注目されているテーマの一つである。本研究では primary neural degeneration および cochlear synaptopathy という新しい病態概念に基づき、聴神経-有毛細胞間シナプスをターゲットした画期的な新規治療法の開発に挑戦した。蝸牛器官培養系を用い、聴神経障害モデルに対する ROCK 阻害薬の効果を検討した結果、NK 処理のみを行った蝸牛組織と比較して ROCK 阻害薬である Y-27632 で追加処理した蝸牛組織では、有毛細胞へ投射している聴神経線維数およびシナプス数に有意な差が確認され、ROCK 阻害薬の聴神経障害に対する有効性が示唆された。ROCK 阻害薬はすでに臨床応用されている薬剤であり、臨床応用へのハードルも決して高くはないと考えられるため、これまで有効な治療法が存在しなかった感音難聴に対する画期的な治療方法となることが期待される。引き続き、関連するシグナル伝達経路について解析を行うとともに、*in vivo* 実験系での検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koizumi Yutaka, Ito Tsukasa, Mizutari Kunio, Kakehata Seiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Regenerative Effect of a ROCK Inhibitor, Y-27632, on Excitotoxic Trauma in an Organotypic Culture of the Cochlea	5. 発行年 2020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.2020.572434	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小泉優, 伊藤史, 欠畑誠治
2. 発表標題 蝸牛器官培養聴神経障害モデルにおけるROCK阻害薬の効果の検討
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉優, 伊藤史, 欠畑誠治
2. 発表標題 蝸牛器官培養聴神経障害モデルを用いた聴神経の再生
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会東北地方連合学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉優, 伊藤史, 欠畑誠治
2. 発表標題 蝸牛器官培養聴神経障害モデルを用いた聴神経の再生
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yutaka Koizumi, Tsukasa Ito, Seiji Kakehata
2. 発表標題 ROCK inhibitor Y-27632 accelerates auditory nerve fiber growth and synapse formation after excitotoxic trauma in organotypic culture of cochlea
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 42nd Annual MidWinter Meeting (国際学会)
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
研究分担者	伊藤 吏 (Ito Tsukasa)  (50344809)	山形大学・医学部・准教授  (11501)	
研究分担者	杉山 元康 (Sugiyama Motoyasu)  (60637255)	山形大学・医学部・医員  (11501)	
研究分担者	小泉 優 (Koizumi Yutaka)  (80723585)	山形大学・医学部・非常勤講師  (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------