

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02950

研究課題名（和文）難聴モデル動物の病態解明を志向した内耳ナノ振動の新規計測プラットフォームの構築

研究課題名（英文）Measurement platform of nano-vibration in the cochlea for understanding the pathogenesis in deafness model mice

研究代表者

任 書晃（Nin, Fumiaki）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80644905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：聴覚はヒトの生命活動に必須である。本研究では、その生体内での動態が未だ解明されていない内耳蝸牛の感覚上皮帯振動を測定対象とした。Dual SPMレーザー振動計と呼ばれる、微小振動物体の振幅と位相、さらに位置ずれを計測できる新規振動計測装置を開発し、全身麻酔下のモルモットでこれらの要素を計測した。既知の周波数と音圧の刺激を与えると、位置ずれが観測されただけでなく、蝸牛リンパ液に外有毛細胞機能を修飾する各種薬物を投与して、その機能が外有毛細胞に起因する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他の感覚に比較して極めて聴覚の特性は、感覚上皮帯のナノスケールの微小振動に依拠する。超高齢化社会を迎える我が国で増加している難聴は、患者数が1,000万人を超え、他の感覚疾患や脳卒中の罹患者より段違いに多い。しかし、病因の大部分は不明のため、治療薬や治療法は30年以上もの間、殆ど進歩がなく、その開発は喫緊の課題である。現在原因不明の難聴の多くは蝸牛の異常に起因する。本研究成果は、位置ずれという新しいナノ振動様式の観点から、難聴病態の解明にアクセスできる可能性を示したものであり、今後実際に利用可能な難聴モデル動物の解析を通じて、病態解明と新たな治療方法の提案に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Audition is indispensable for human activity. In this study, we focused on the vibration of sensory epithelium in the cochlea of the inner ear. The vibration behavior in vivo condition is still unknown. We developed a new measurement system called Dual SPM (sinusoidal phase modulation) laser interferometer, which detects baseline shift as well as vibration amplitude and phase. In addition, we recorded these parameters of the epithelial vibration under general anesthesia in live guinea pig. When we applied the sound which is known frequency and intensity, the baseline shift was observed. Moreover, we pharmacologically exhibited the baseline shift attributed from the outer hair cells' function by applying drugs.

研究分野：生理学

キーワード：ナノ振動 感覚上皮帯 in vivo計測

1. 研究開始当初の背景

“聴覚”は、ヒトの生命活動に必須である。ヒトは、3 m 先の蚊の音から真近の飛行機の巨大エンジン音までも知覚できる。また、ピアノを遥かに凌駕する 10 オクターブの可聴域を有する一方、0.0025 オクターブの高さの差も弁別する。他の感覚に比較して極めて鋭敏なこの特性は、音刺激により内耳蝸牛の感覚上皮帯というシート様組織にナノスケールの微小振動が惹起されることに依拠する。超高齢化社会を迎える我が国で増加している難聴は、患者数が 1,000 万人を超え、他の感覚疾患や脳卒中の罹患者より段違いに多い。実際、世界人口の 10% が難聴に罹患しており、近年は若年性難聴が増えている点でも、すでに大きな社会問題である。しかし、病因の大部分は不明のため、治療薬や治療法には、30 年以上もの間、殆ど進歩がなく、その開発は喫緊の課題である。難聴の多くは内耳蝸牛の異常に起因する。従来、これら内耳性難聴の原因検索には上皮帯組織や細胞を対象とした組織学的・形態学的手法が用いられてきたが、今もその 4 分の 1 は原因不明とされ、また細胞の動態に基づく難聴病態は今も未解明である。

2. 研究の目的

ヒト難聴の病態の解明には、モデル動物を題材にした様々な実験手法が活用されてきた。しかし、従来の技術を駆使しても、未だその多くは不明である。この解決のための重要かつ困難な課題は、聴覚の伝達過程を「生きた」動物の内耳蝸牛で調べることである。聴覚成立の契機である基底板上のナノ振動を計測する光学機器は、モデル動物の解析ツールとして海外のグループにより開発と利用が進められてきた。一方、我が国では、現在、この先端技術を利用できる施設がないため、豊富な動物資源が難聴研究に活かされていない。本計画では、基底板上の振動を従来よりも詳細に計測できる生体ナノ振動の画期的な計測基盤を確立する。工学系研究者との協働で、新方式の光学機器をマウスの蝸牛に最適化する。その上で、基板上への影響が予測されるモデルマウスに計測系を順次適用し、振動の差異に着目した難聴の病態理解を進める。成果は、将来的に疾患の新たな診断法や治療法の開発に貢献すると期待される。

3. 研究の方法

(1) 新規干渉計の生体計測への最適化 (レーザー干渉顕微鏡の作製) <平成 30 年度>

過去に作製した新方式レーザー干渉計に対物レンズを導入し、「レーザー干渉顕微鏡」を作製する。なお、対象となる基底板上の反射率は 0.01% と生体内で最も低いことが知られているため、利用するレーザー光の強度もこれに対応して増強する。

(2) 正常マウスを用いた生体計測 <平成 31 年度>

レーザー干渉計を生体計測へ最適化後、マウス蝸牛の基板上振動の *in vivo* 測定を任・太田が実行し、日比野が指導する。任がモルモットで習熟した手術法をマウスに応用する。透明な正円窓を介してレーザー光を基板上に照射することで、蝸牛に対し非侵襲的に振動を計測する。また、実験中の動物の聴覚閾値は、聴性脳幹反応 (ABR) によりモニタリングする。その上で、マウス可聴域の周波数 (~60 kHz) と音圧 (~100 dB SPL) での振動データを蓄積する。

(3) 難聴モデル動物を用いたナノ振動計測 <平成 32 年度>

任・太田・日比野が確立したマウス基板上振動の計測系を、様々な難聴モデルマウスに適用し、正常動物の振動との差を抽出する。用いる難聴モデルマウスとして、*Cdh23^{c.753A/A}* マウス、共同研究者の吉川が作製した Leucine rich repeat containing 30 (*Lrrc30*) ノックアウト (KO) マウス、の 2 種類の難聴モデルマウスを活用する。Cadherin23 は有毛細胞の感覚毛をつなぐチップリンクの構成タンパクの一種である。したがって、*Cdh23^{c.753A/A}* マウスが早期に呈する高音障害型難聴

は、感覚毛の変性に起因すると推察されているが、その詳細なメカニズムは未解明である [Miyasaka et al., *Hum Mol Gen* 2016/業績 19]。また、有毛細胞に局在するタンパク質 *Lrrc30* の KO マウスの計測も計画する。低音部の難聴を示すこのマウスは、有毛細胞に形態学的異常がなく、難聴の原因は不明である。両系統ともに、基底板の振動は未計測である。これらのモデルマウスから得られた振動波形を分析することで、基底板振動を支える未知の組織や細胞を洗い出し、難聴病態の解明に寄与する。

4. 研究成果

実際の研究では、レーザー干渉顕微鏡の作製中に、新しい方式のレーザー干渉顕微鏡装置のアイデアを着想した。その内容は以下の通りである。一般に、物体が振動する際、その中心基準点が移動することがある。「位置ずれ」と呼ばれるこの移動が感覚上皮帯にも発生し、振動現象の制御に深く関わることが想定されている。しかし、生きた動物の体内で「位置ずれ」計測は実現されおらず、振動「振幅」との連関や生理的役割は未解明である。現在市販・汎用されているレーザー振動計では、

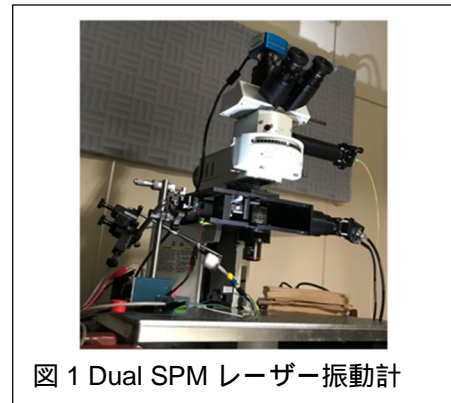


図 1 Dual SPM レーザー振動計

ドップラー解析法を採用しており、「振幅」を高精度に捉えるが、「位置ずれ」を検知できない。そこで、市販品ではほとんど普及していない Sinusoidal Phase Modulation 法 (SPM 法) を改良した。SPM 法は、Khanna らが標本の「交流的な振動の振幅」を定量する方法として記述している。一方で、Sasaki らは、「直流的な位置ずれ」の計測法として報告している。本研究では、両者を参考に新しい解析手法として Dual SPM 法 (二重正弦波位相変調法) を開発し、点計測用のレーザー振動計に搭載した「Dual SPM レーザー振動計」を作製した (図 1)。今まで観察できなかった「振動」と「位置ずれ」を非侵襲かつナノスケールで同時計測可能となった。

さらに、この装置を生体計測へ最適化し、生理的環境下における内耳ナノ振動を追跡した。Dual SPM レーザー振動計により、モルモットの感覚上皮帯の振動振幅および位置ずれを調べた (図 2)。刺激は、音圧 60~90 dB・周波数 21 kHz とした。生存時では、70 dB 以上の強大音の時にのみ、数 nm の上方への位置ずれが同定された (図 2B 右)。一方で、振幅は音圧増加に対して非線形に増強した (図 2B 左)。死後、音圧に対する振幅の応答は線形化し、位置ずれは観察されなかった。

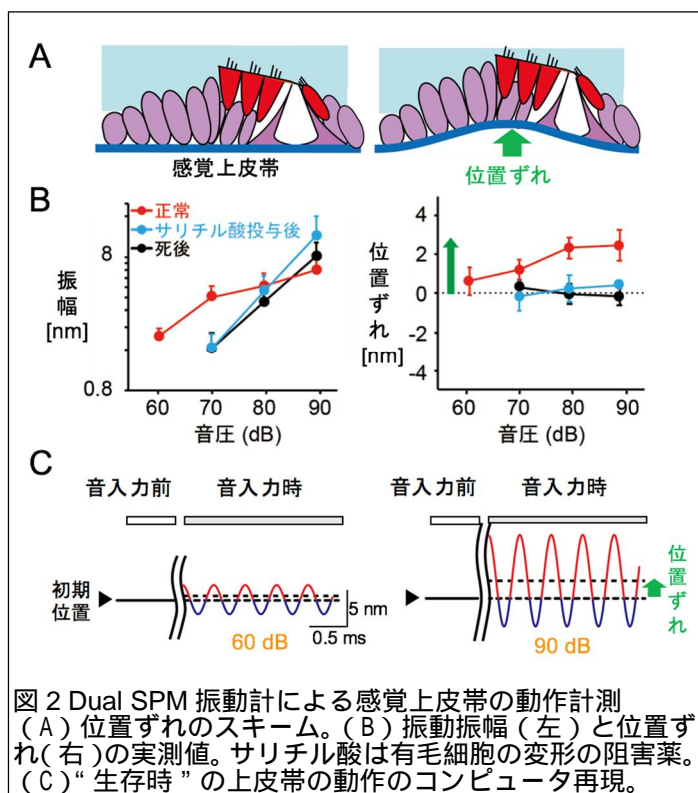


図 2 Dual SPM 振動計による感覚上皮帯の動作計測 (A) 位置ずれのスキーム。(B) 振動振幅 (左) と位置ずれ (右) の実測値。サリチル酸は有毛細胞の変形の阻害薬。(C) “生存時” の上皮帯の動作のコンピュータ再現。

平成 3 2 年度は、難聴モデル動物を対象にした計測を行う予定であったが、位置ずれの発生機構に関し

て、薬物投与実験による検証を行う必要性が出てきたことから、生動物を用いた薬物投与実験へと計画を変更した。有毛細胞は音により電気興奮すると変形する。この事象は、小さな音刺激時

に見られる振動振幅の増幅に直結する。有毛細胞の変形の阻害薬(サリチル酸)を上皮帯に投与したところ、振幅の増加は死後同様の線形化を認め(図 2B 左)位置ずれも消失した(図 2B 右)。このことから、位置ずれは有毛細胞機能に起因する生命現象であることが初めて実験により明らかになった。

新しい装置を含む本実験プラットフォームは、引き続き他臓器にも応用していくことで、生体の多彩な動的事象の同定とその意義の理解を進め、医学・生物学を大きく展開させていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 太田 岳、任 書晃、日比野 浩	4. 巻 37
2. 論文標題 内耳感覚上皮帯のナノ振動	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1479-1480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 任 書晃、太田 岳、日比野 浩	4. 巻 36
2. 論文標題 感音難聴治療のための聴覚生理の新知見	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 10-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 任 書晃	4. 巻 48
2. 論文標題 内耳蝸牛の感覚上皮帯におけるナノ振動計測を志向したOCT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 160-163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Ota T, Nin F, Choi S, Muramatsu S, Sawamura S, Ogata G, Sato MP, Doi K, Tsuji T, Kawano S, Reichenbach T, Hibino H.	4. 巻 472
2. 論文標題 Characterisation of the static offset in the traveling wave in the cochlear basal turn.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv	6. 最初と最後の頁 625, 635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-020-02373-6	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 任 書晃、太田 岳、崔 森悦、日比野 浩
2. 発表標題 内耳の感覚上皮帯を構成する有毛細胞のナノ動態の同定日本薬理学会北部会
3. 学会等名 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張 奇、任 書晃、吉田 崇正、太田 岳、日比野 浩
2. 発表標題 Contribution of nonexcitable epithelial tissue in the inner ear to an electrical response used for clinical diagnosis of hearing disorders.
3. 学会等名 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 任 書晃、太田 岳、崔 森悦、日比野 浩
2. 発表標題 内耳の感覚上皮帯を構成する外有毛細胞のナノ動態の同定
3. 学会等名 中部日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 岳、崔 森悦、任 書晃、日比野 浩
2. 発表標題 改良型レーザー干渉計による内耳蝸牛の感覚上皮帯ナノ振動測定
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 太田 岳、任 書晃、崔 森悦、日比野 浩
2. 発表標題 内耳の感覚上皮帯に生じるナノ振動の抽出とその調節機構の検討
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Ota T, Nin F, Choi S, Hibino H.
2. 発表標題 Detection of an atypical motion in cochlear sensory epithelium.
3. 学会等名 9th FAOPS Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. (国際学会)
4. 発表年 2018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	吉川 欣亮 (Kikkawa Yosiaki) (20280787)	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー (82609)	
研究分担者	太田 岳 (Ota Takeru) (30790571)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	崔 森悦 (Choi Samuel) (60568418)	新潟大学・自然科学系・研究准教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	日比野 浩 (Hibino Hiroshi) (70314317)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

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