

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09335

研究課題名(和文) 耳鳴に対する新規治療法開発と、その大脳辺縁系への影響の解析

研究課題名(英文) Development of new treatments for tinnitus and analysis of its effects on the limbic system

研究代表者

水足 邦雄 (Mizutari, Kunio)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院 耳鼻咽喉科科・講師)

研究者番号：40338140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：耳鳴の発症および増悪を動物モデルにおいて客観的に評価し、その原因を解析することによって、耳鳴の発症・増悪のメカニズムを可視化することを目的に研究を行った。我々は耳鳴が比較的高頻度に出現するモデルとして、衝撃波誘発難聴・耳鳴モデルを作成した。この衝撃波誘発難聴・耳鳴モデルは難聴の程度が軽度であるにも関わらず明らかな耳鳴が出現することが明らかとなった。続いて耳鳴評価を行ったモデル動物に対して、治療遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターを内耳に投与するため、まずレポーター遺伝子を搭載したウイルスベクターの投与を行った。FGF-2を搭載したセンダイウイルスベクターも安全に投与可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根本的な治療法の存在しない耳鳴に対する新しい遺伝子治療を開発し、その治療効果を耳鳴の発生メカニズムに基づき解析を行うことによって、ヒトへの臨床応用が可能な耳鳴に対する新規治療法を確立することを目指した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to visualize the mechanism of tinnitus onset and exacerbation by objectively evaluating the onset and exacerbation of tinnitus in an animal model and analyzing the causes. We created a shock wave-induced deafness / tinnitus model as a model in which tinnitus appears relatively frequently. In this shock wave-induced deafness / tinnitus model, it was clarified that clear tinnitus appeared even though the degree of deafness was mild. Subsequently, in order to administer the Sendai virus vector carrying the therapeutic gene to the inner ear to the model animals evaluated for ear ringing, the virus vector carrying the reporter gene was first administered. The Sendai virus vector carrying FGF-2 could also be safely administered.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：耳鳴 感音難聴 シナプス ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

耳鳴は極めて罹患者数の多い疾患であり、米国や日本の調査でも人口の15%から20%が経験していると言われている(National Health Survey 1988, 厚生労働省国民健康調査2006)。このように耳鳴は「ありふれた」疾患ではあるが、耳鳴発生のメカニズムは依然として明らかで無く、そのため現在のところ根本的な治療法は存在しない。さらに我々の行った地域在住高齢者に対するコホート研究により、耳鳴が抑うつ発症の危険因子であることも判明している(Michikawa, Mizutari et al. Prev Med:333-6, 2013)。また fMRI や PET を用いた脳機能画像による研究では、耳鳴患者において扁桃体や内側膝状体、聴皮質、前頭前野などで異常な神経活動連動がみられる(小川郁、水足邦雄ら、聴覚異常感の病態とその中枢性制御、SPIO 出版2013)。すなわち、耳鳴には聴覚伝導路だけでなく、大脳辺縁系を中心とする情動を司る脳機能の異常亢進が推測されるが、耳鳴と大脳辺縁系の活動の関連についての系統的な研究はほとんど行われていない。なぜなら「主観的」な症状である耳鳴を定量的に評価できる動物モデルが存在しないからであった。

これまでの研究で、耳鳴の発症は様々な末梢聴覚受容体の障害により聴覚中枢への聴覚情報入力不足が引き金になることが知られている(小川郁、水足邦雄ら、聴覚異常感の病態とその中枢性制御、SPIO 出版2013)。そこで、我々は「末梢聴覚受容体の障害初期に適切な介入をすることで、耳鳴の発症・増悪を中枢神経系の変化を抑制して治療できる」という仮説のもと「耳鳴を可視化する」研究計画を作成した。

2. 研究の目的

本研究は独自に開発した新規技術を駆使することによって、耳鳴の発症および増悪を動物モデルにおいて客観的に評価し、その原因を末梢聴覚受容体のみならず大脳辺縁系の神経機能を含めて解析することによって、これまで病態が不明であった耳鳴の発症・増悪のメカニズムを可視化した上で、新規遺伝子治療の効果を明らかにする極めて野心的な研究である。これまでに、モデル動物に対する耳鳴治療の研究はほとんど行われておらず、それが臨床における耳鳴に対する新規治療法を開発できない最も大きな要因となっていた。我々の開発した様々な技術を駆使することによって、これまで不可能であった実験動物における耳鳴の治療効果を定量化することが可能となる。さらには、耳鳴の有無のみでなく大脳辺縁系でのニューロンの可塑性を定量化することによって、耳鳴のよって生じる抑うつに対しても直接的な評価が行える独創的な実験系である。

3. 研究の方法

耳鳴動物モデルの作成、治療遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターの安全な内耳への投与方法の確立、耳鳴の行動実験である gap detection test の条件決定を行い、FGF-2 導入による治療実験を開始する。治療効果は gap detection test および内耳の詳細な組織学的検討により行い、導入遺伝子の再検討や投与量の調整を行い治療効率の最適化を行う。2年目以降には、決定した治療方法で大脳辺縁系への影響を凍結脳連続切片を用いて検討する。亜急性期にも神経活動の変化を鋭敏に捉えることのできる Arc により大脳辺縁系における耳鳴治療の影響を評価する。

はじめに、本研究で用いるマウス難聴・耳鳴モデルを作成する。齧歯類の難聴モデルは様々な存在するが、耳鳴が比較的高頻度に出現するモデルとして本研究では、強音暴露による音響外傷モデルおよび我々の開発した衝撃波誘発難聴・耳鳴モデル(Niwa, Mizutari, et al., Scientific Reports 6:31754, 2016)の2種類を作成する。音響外傷モデルは、国内外で多くの研究が行われており、高頻度に耳鳴が生じることが基礎・臨床の両面で知られている。

モデル動物作成後、聴覚機能評価として聴性脳幹反応(ABR)および歪音耳音響放射(DPOAE)による内耳機能測定を行う。ABRでは threshold (閾値)、波における amplitude (振幅) および latency (潜時) の記録を行う。この amplitude および latency はらせん神経節の細胞数および synaptic ribbon の数と正の相関を示す(Kujawa et al., J Neurosci, 2009)。さらに詳細な内耳機能の評価のために歪成分耳音響放射(DPOAE)を用いて、特に入力音の増幅・抑制に重要な役割を果たす外有毛細胞の機能を評価し、耳鳴発症における外有毛細胞の役割を明らかにする。続いてモデル動物における耳鳴の定量評価を gap detection test を用いて行う。

上記の生理学的検討が終了したのち、末梢内耳の詳細な組織学的評価を行う。蝸牛においては、音響刺激の受容体である蝸牛有毛細胞および一次ニューロンであるラセン神経節、さらには両者を結合するシナプス、特に感覚受容細胞に特異的に発現している synaptic ribbon について詳細な定量評価を行う。

上述の方法で作成および評価を行ったモデル動物に対して、治療遺伝子(FGF-2)を搭載したセンダイウイルスベクターを内耳に投与することで治療実験を行う。

ここまでの研究で、耳鳴あるいは聴覚機能に対する治療効果が確認した後、耳鳴が蝸牛以降

の聴覚伝導路および大脳辺縁系にどのような影響を与えているかを検討する。そのために、長期的な可塑性のマーカーである Arc を用いた脳連続切片を用いた免疫組織学的検討を行う。

4. 研究成果

耳鳴動物モデルマウスの作成を行った。我々は耳鳴が比較的高頻度に出現するモデルとして、衝撃波誘発難聴・耳鳴モデルを作成した。この衝撃波誘発難聴・耳鳴モデルは難聴の程度が軽度であるにも関わらず明らかな耳鳴が出現することが明らかとなった。このような軽度難聴に伴う耳鳴は、臨床でしばしば難治性であり治療に難渋することが多く、より臨床像に近い動物モデルである。難聴のレベルは、最も臨床で耳鳴を合併することの多い 60dB 程度の中等度感音難聴に設定した。上述の方法で作成および評価を行ったモデル動物に対して、治療遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターを内耳に投与するため、まずレポーター遺伝子を搭載したウイルスベクターの投与を行った。センダイウイルスはヒトに対して毒性を持たない RNA ウィルスで、細胞内に侵入したウイルスは細胞質内のみで転写、増殖を行い、宿主の核内ヘインテグレーションを起こさない特性を持っている。レポーター遺伝子(GFP)を搭載したセンダイウイルスベクターを蝸牛正円窓から効率よく投与する方法を考案し効率的な内耳への遺伝子導入が確認できた。また、レポーター遺伝子だけで無く治療因子である FGF-2 を搭載したセンダイウイルスベクターも安全に投与可能であった。

そこで、耳鳴動物モデルマウスに対して 1 日後に ABR を測定した後、治療遺伝子導入を実施した。その結果、ABR 閾値、I 波振幅が高周波数帯を中心に回復を認め、組織学的には内毛細胞の求心性神経終末の後シナプス受容体の増加がみられた。また、gap detection test にて耳鳴反応の減少が認められ、FGF-2 による遺伝子治療が難聴・耳鳴の新規治療の有望な候補である事が明らかとなった。さらに中枢の解析により FGF-2 による治療を行った耳鳴の存在するラットにおいて記憶や認知行動に関与している扁桃体基底核での神経可塑性が無治療のラットに比べ著明に変化しており、FGF-2 治療により耳鳴発生に関与する辺縁系の働きに影響を与えらる事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koizumi Y, Ito T, Mizutari K, Kakehata S.	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 Front. Cell. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 572434
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 -
1. 著者名 Niwa K, Mizutari K, Matsui T, Kawauchi S, Sato S, Shiotani A, Kobayashi Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Tinnitus rat model generated by laser-induced shock wave; a platform for analyzing the central nervous system after tinnitus generation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 82-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2020.07.019.	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 Takahata S, Mizutari K, Morita I, Matsuo H, Nakayama A, Shimizu S, Ueno M, Ito T, Shinomiya N, Shiotani A.	4. 巻 47
2. 論文標題 The influence of a noisy environment on hearing impairment and tinnitus: The hearing outcomes of 50-year-old male Japan ground self-defense force personnel.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 931-937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2020.05.010	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 Mizutari K	4. 巻 27(5)
2. 論文標題 Update on treatment options for blast-induced hearing loss.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.	6. 最初と最後の頁 376-380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/M00.0000000000000563.	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 Kimura A, Takahashi Y, Mizutari K, Tsujimoto H, Nakanishi K, Shiotani A.	4. 巻 15(2)
2. 論文標題 A Case of Gastric Meningeal Carcinomatosis Involving Bilateral Hearing Loss: The Difference between Clinical Images and Autopsy Findings.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Int Adv Otol.	6. 最初と最後の頁 333-336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5152/iao.2019.6080	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 Mizutari K.	4. 巻 20(2)
2. 論文標題 Blast-induced hearing loss.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Zhejiang Univ Sci B.	6. 最初と最後の頁 111-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1631/jzus.B1700051	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6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kunio Mizutari, Eiko Kimura, Saki Takihata, and Akihiro Shiotani
2. 発表標題 The technique of opening anterior ventilation route under ossicular chain preservation
3. 学会等名 3rd World Congress on Endoscopic Ear Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kunio Mizutari, Eiko Kimura, Katsuki Niwa, Yasushi Satoh, Shun-ichi Sato, and Akihiro Shiotani
2. 発表標題 Pathophysiological differences of hearing impairment between two types of blast induced hearing loss
3. 学会等名 15th Meeting of the International Otopathology Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Cochlear synaptopathyと耳鳴発生メカニズムの解明
2. 発表標題 【シンポジウム】 騒音性聴覚障害研究の新展開 病態の最新知見と治療法開発にむけて
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水足邦雄
2. 発表標題 補聴器適合に役立つ検査 実耳測定とワイドバンドティンパノメトリ -
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水足邦雄
2. 発表標題 爆傷による中耳・内耳障害の実態 臨床と基礎研究の最前線
3. 学会等名 第67回聴覚生理研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiko Harada, Kunio Mizutari
2. 発表標題 Cochlear histopathology after shock wave exposure.
3. 学会等名 42th ARO 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------