

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18729

研究課題名（和文）音響暴露後のPresynaptic Ribbon変化とセロトニン3A受容体の関連

研究課題名（英文）The relationship between 5-HT3A receptor and the change of presynaptic ribbon after noise exposure

研究代表者

大畠 和也（OHATA, KAZUYA）

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：10778632

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々はセロトニン（5-HT）受容体の一つである5-HT3A受容体と内耳有毛細胞に存在するリボンシナプスの関連に注目し実験を重ねてきた。その結果、5-HT3A受容体が音響外傷後の内耳保護作用に重要な役割を果たしていることを見出した。さらに5-HT3A受容体ノックアウトマウスでは野生型マウスと比べて音響外傷後の内耳障害が増強することが分かった。さらに、薬理学的実験の結果、この受容体が刺激されることにより、音響外傷に対して内耳保護作用が増強し、内耳有毛細胞のリボンシナプスの減少や聴覚閾値上昇という内耳障害を軽減させることが証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

5-HT3A受容体と内耳機能についての報告は本研究が初であり、さらにこの受容体が音響外傷後の内耳保護作用に重要な役割を果たしていることを証明した本研究の学術的意義は大きいと思われる。さらに、受容体刺激薬投与により内耳保護作用が増強することも示したことは、この受容体が音響外傷後の内耳障害に対する治療および予防薬へつながる可能性もある。今までのところ、音響外傷に対して有効な治療法や予防薬はなく、今回の成果はこれにつながる極めて重要な一歩と思われる。今後さらなる検討を行うことで新規製薬にもつながりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the relationship between 5-HT3A receptors and synaptic ribbon of inner hair cells in the cochlear. Our results showed that 5-HT3A receptors were very important for the cochlear protection after noise exposure. Moreover, 5-HT3A receptor deficient mice showed severer cochlear damage after noise exposure than wild-type mice. In addition, we showed that the stimulation of 5-HT3A receptors increased the cochlear protection after noise exposure and weakened the decrease of synaptic ribbon and threshold shift of acoustic functional test through our pharmacological experiments.

研究分野：聴覚

キーワード：セロトニン リボンシナプス

1. 研究開始当初の背景

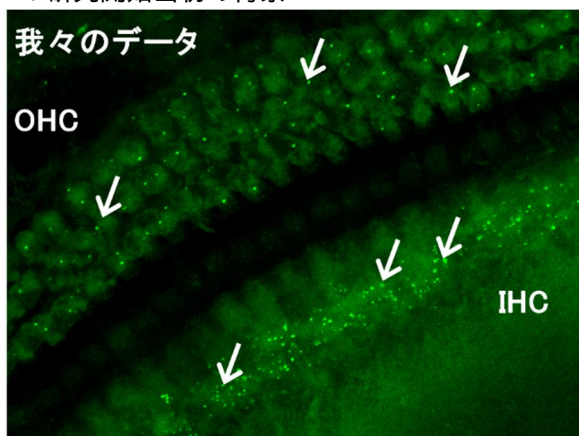


図1
野生型マウスの蝸牛whole mount 標本(免疫染色)
外有毛細胞(OHC)および内有毛細胞(IHC)近傍に
Presynaptic Ribbon(白矢印)が多数見られた。

騒音性難聴は人類における後天性感音難聴の原因の多くを占める疾患の一つである。音響暴露はその性質からしばしば両耳への障害を来すことから、それに伴う難聴は患者のQOLを著しく低下させる。これら騒音性難聴に対する治療法は今現在確立されておらず、対症的なステロイド投与による加療などが行われてきたが、治療効果が高いとは言えず難聴や耳鳴残存などの後遺症を残すことが多い。このように、騒音性難聴は人類の文明発達と密接に関連しているとい

いう歴史があり、それゆえに今まで多くの研究がなされてきた。今までの報告では、音響外傷後すぐに一過性聴覚閾値の上昇(TTS:Temporary Thresholdshift)を認め、その後永続する閾値上昇(PTS:Permanent Thresholdshift)に落ち着くという概念が長く考えられてきた。この一過性聴覚閾値の詳細な分子細胞学的知見については永らく解明されなかったが、近年になりこの閾値上昇が内耳における有毛細胞と求心性神経の間にある Presynaptic Ribbon の脱落によるとの論文が多く報告されている。内耳には一般的に音を伝えるとされる内有毛細胞と音の受容を調整するとされる外有毛細胞の2種類が存在するが、これらの報告の中で論じられている Presynaptic Ribbon はほぼ全てが内有毛細胞側に存在するものである。このように内有毛細胞側の Presynaptic Ribbon と騒音性難聴の関連については明らかになりつつある一方で外有毛細胞側の Presynaptic Ribbon についてはほとんど報告がない。我々は野生型マウス蝸牛において Presynaptic Ribbon の免疫染色に成功しており、内有毛細胞のみならず外有毛細胞の Presynaptic Ribbon についても確認できている(図1)。我々は以前から神経伝達物質であるセロトニン(5-HT)の受容体の1つである5-HT_{3A}受容体に注目し、それが内耳にある外有毛細胞の遠心性神経に発現していることを確認している(後述:図3)。その研究の一連の実験の中でマウス蝸牛において Presynaptic Ribbon の免疫染色に成功するとともに(図1)、騒音暴露後24hの時点で野生型マウスと比して5-HT_{3A}受容体ノックアウトマウスの方が外有毛細胞(OHC)の Presynaptic Ribbon の数が有意に少ないことを確認している(図2)。このことから、音響外傷後に外有毛細胞側の Presynaptic Ribbon の発現や外有毛細胞の機能の変化に5-HT_{3A}受容体が関与している可能性は極めて高いと考えられる。

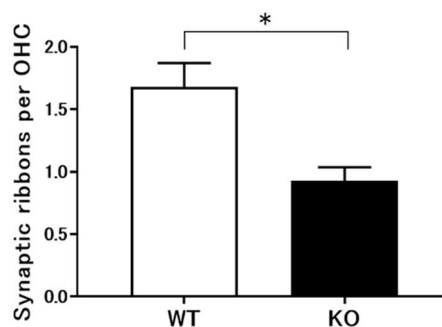


図2
騒音暴露後24hの時点で野生型マウスと比して5-HT_{3A}受容体ノックアウトマウスの方が外有毛細胞(OHC)の Presynaptic Ribbon の数が有意に少なかった。

2. 研究の目的

今回我々が行おうとする研究は上で述べた外有毛細胞側の Presynaptic Ribbon と騒音性難聴の関係を明らかにすることにある。今までその存在については報告されているが、騒音性難聴との関係についてはほとんど報告がなく、極めて独創的な研究といえる。外有毛細胞の求心性神経の機能については不明な所が多く、今回の研究により騒音性難聴との関係を明らかにすることで聴覚機能における役割が解明されることも期待できる。これらの神経が、現在原因が解明されていない耳鳴や聴覚過敏などに関わる可能性もあり、原因解明のみならず画期的な治療法の開発に繋がることも予想される。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス,5-HT3A 受容体ノックアウトマウスの内耳において外有毛細胞の Presynaptic Ribbon を内耳 wholemount 標本を用いて確認する

内耳における Presynaptic Ribbon の形態的および定量的評価には、その部位的特性から通常の内耳形態観察に用いる組織標本では困難である。そのため、蝸牛骨迷路を除去し、感覚上皮を基回転～頂回転部まで連続的に展開し観察する内耳 wholemount 標本の作製が必須と言える。研究代表者はすでにこの標本作成手技を獲得しており、予備実験ですでに野生型マウスにおける Presynaptic Ribbon の観察に成功している。さらに 5-HT3A 受容体ノックアウトマウスにおいても同様の標本を作成し免疫染色で確認する。野生型マウスと 5-HT3A 受容体ノックアウトマウス間での Presynaptic Ribbon の形態的および定量的変化について確認を行う。また並行して通常の内耳凍結切片を作製し、組織形態を観察し両者間で比較する。

(2) 野生型マウス、5-HT3A 受容体ノックアウトマウスにおいて生理実験を用いて聴覚機能を評価する

聴性脳幹反応検査 (ABR) や歪成分耳音響放射 (DPOAE) 等の他覚的聴力検査を用いて 5-HT3A 受容体ノックアウトマウスの聴覚機能を評価し野生型マウスと比較する。歪成分耳音響放射 (DPOAE) とは外耳道内に 2 種類の周波数の刺激音を加えると、その刺激音の周波数に関連した周波数の音が返ってくることを利用した聴力評価方法である。主に外有毛細胞の働きにより、DPOAE が発生することから内耳特に外有毛細胞の働きを周波数特異的に評価が可能である。非侵襲的かつ他覚的聴力検査の一つであるためマウスなどの実験動物の聴力検査にも適しており、本研究において有用と考えられる。

(3) 音響外傷による聴力低下や Presynaptic Ribbon の変化について検討する

先に述べたように音響外傷による内耳障害では内毛細胞の Presynaptic Ribbon の数が減少することが報告されている。我々の予備実験の結果から、音響外傷後に外有毛細胞の Presynaptic Ribbon の数が変化することが予想される。また 5-HT3AR-GFP トランスジェニックマウス (5-HT3A 受容体が発現している細胞に緑色蛍光を発光するように遺伝子を改変したマウス) を用いた我々の研究により外有毛細胞の遠心性神経に 5-HT3A 受容体が存在することが示されており(図 3)、図 2 の結果からも 5-HT3A 受容体がこの Presynaptic Ribbon の減

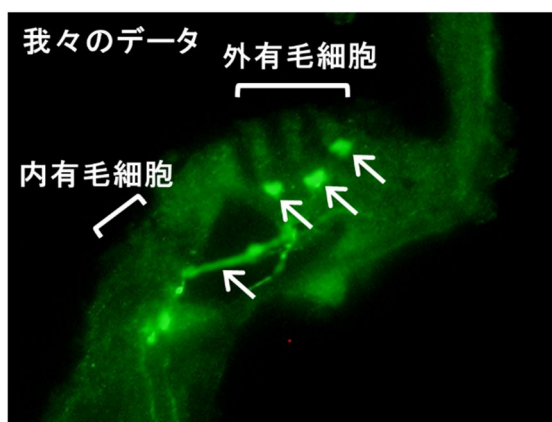


図3 免疫染色 (5-HT3AR-GFP transgenic mouse)
外有毛細胞の遠心性神経に5-HT3A受容体の発現が認められる(矢印)。

少に関わっている可能性が高いと考えられる。このことに注目し、音響外傷後に聴性脳幹反応 (ABR) 検査および歪成分耳音響放射 (DPOAE) を行い、5-HT3A 受容体ノックアウトマウスと野生型マウスで差があるか検討する。また、免疫染色を行って音響外傷による Presynaptic Ribbon の変化に関して両者を比較し検討する。

(4) 音響外傷後の外有毛細胞の求心性神経について検討する

音響外傷後に Presynaptic Ribbon の減少が見られることは先に述べたが、これとシナプスを形成する求心性神経自体の変性が進行性に生じることが報告されている。外有毛細胞の求心性神経自体の機能については分かっていないことが多いが、こちらについても Presynaptic Ribbon と関連して形態的变化が生じる可能性があると考えられる。具体的には求心性神経の細胞体はらせん神経節に存在することから、免疫染色を用いて音響外傷後のらせん神経節細胞の変性について形態的および定量的に評価する。

(5) 5-HT3A 受容体の刺激、阻害での効果を検証し薬理的にも検討する

音響外傷後の Presynaptic Ribbon の変化と 5-HT3A 受容体の関与が示された後には 5-HT3A 受容体に対する刺激薬および阻害薬を用いた実験を予定している。具体的には刺激薬または阻害薬をマウスに事前投与後に音響暴露させ Presynaptic Ribbon の変化を形態的および定量的に評価する。5-HT3 受容体の阻害薬は腸管領域ではすでに制吐剤として塩酸グラニセトロン(カイトリル)、オンダンセトロン(ゾフラン)などは臨床応用され効果も実証されている。5-HT3 受容体の刺激薬については臨床応用されていないが、我々はマウスに投与可能な 5-HT3 受容体アゴニストを準備できておりそちらを使用する予定である。また、まずはマウスに対して腹腔投与で投薬を行う予定であるが、内耳での効率的かつ有効なデリバリーシステム(鼓室内投与など)の検討も必要になるであろう。

4. 研究成果

我々は当初、前実験の段階でセロトニン(5-HT)受容体の一つである 5-HT3A 受容体に注目しており、5-HT3A 受容体ノックアウトマウスでは野生型マウスと比べて音響外傷後の Presynaptic ribbon が有意に減少していることを見出していたが、今回さらなる検討を加えることでこの受容体が Presynaptic ribbon のみならず、音響外傷後の聴覚障害予防に深く関与していることを証明できたことが最大の成果と言える。すなわち、検討前は外有毛細胞の Presynaptic ribbon と音響外傷の関連について注目し実験を行ってきた。なぜなら、この 5-HT3A が蝸牛における遠心性フィードバック機構に関わる MOC ニューロンに特異的に発現していることを確認していたためである。しかしながら、我々の実験の結果から、この受容体を介して音響暴露後 MOC ニューロンの神経活動活動が亢進することで、内耳保護作用が働くことが分かった。つまり、この受容体が刺激されることにより、音響外傷に対して内耳保護作用が増強し、その結果として内毛細胞の Presynaptic ribbon の減少や聴覚閾値上昇という内耳障害を軽減させることが、薬理学的実験によっても証明できたのである。

今までのところ、音響外傷に対して有効な治療法や予防薬はなく、今回の成果はこれにつながる極めて重要な一歩と思われる。今後さらなる検討を行うことで新規製薬にもつながりうると思われる。

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 Kazuya Ohata, Makoto Kondo, Yoshiyuki Ozono, Yukiko Hanada, Takashi Sato, Hidenori Inohara, Shoichi Shimada	4. 巻 35
2. 論文標題 Cochlear protection against noise exposure requires serotonin type 3A receptor via the medial olivocochlear system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB journal	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） 10.1096/fj.202002383R	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大島 和也
2. 発表標題 Medial olivocochlear (MOC) を介した強大音暴露に対する蝸牛保護にはセロトニン3A受容体が必要である
3. 学会等名 Medial olivocochlear (MOC) を介した強大音暴露に対する蝸牛保護にはセロトニン3A受容体が必要である
4. 発表年 2021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
---------	---------