

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18767

研究課題名(和文) In Vivoリプログラミングによる蝸牛神経の機能的再生

研究課題名(英文) Regeneration of primary auditory neurons by in vivo reprogramming

研究代表者

西村 幸司 (Nishimura, Koji)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：20405765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛神経をin vivo分化転換により再生させて、蝸牛神経を刺激して聴覚機能を検証し、高度感音難聴者に対する新規治療法の開発を目指し実験を行った。マウス、モルモットを用いてin vivoで有毛細胞には障害を与えずラセン神経節を強心配糖体のウアバインやジゴキシンで特異的に障害させることに成功した。内耳組織解析の過程で、当初予定していなかった前庭神経節細胞の障害についても詳細に検討した。一方で、in vivo分化転換を目指して接種したAAV2, Anc80はラセン神経近傍のシュワン細胞での効率良い発現が得られず、AAVの血清型やプロモーターの更なる検討が課題として残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工内耳手術を受ける高度感音難聴者の蝸牛神経が健聴者と同程度に再生され、蝸牛有毛細胞の機能により近似した人工内耳が開発されれば、人工内耳装用者も健聴者と同程度の聴覚の質が担保されると考えられる。in vivoでのラセン神経節の障害モデルの作製および遺伝子導入法の確立は一度変性したラセン神経を再生させる方法の開発に必要である。同時に、前庭神経節内の易障害性神経節細胞やシュワン細胞の解析は加齢性および薬剤性の平衡障害メカニズムの解明や治療に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to regenerate primary auditory neurons in vivo by direct reprogramming and to develop a novel method for curing patients with profound sensorineural hearing loss whose primary auditory neurons are severely affected. We injected cardiac glycosides such as ouabain and digoxin into the inner ear of mice and guinea pigs, and we performed histological and electrophysiological assessment of degeneration of primary auditory neurons as well as primary vestibular neurons. Neurogenic genes of interest were not efficiently introduced into Schwann cells in the spiral ganglia by AAV2 or Anc80 serotypes, and we need to test other serotypes of AAV and promoters that drive the expression of neurogenic transcription factors.

研究分野：聴覚医学、分子細胞生物学

キーワード：リプログラミング 蝸牛神経 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

日本の難聴者（治療できない感音難聴者）の状況は、36万人の身体障害認定高度難聴者65歳以上の難聴者は1500万人 生まれてくる赤ちゃんの1000人に1~2人は両側高度感音難聴（ほとんど聞こえない高度難聴）である。感音難聴（特に高度感音難聴）は治療不可であったが人工内耳の臨床応用されるに至り、世界中でこれまで40万人以上の高度感音難聴患者が人工内耳の恩恵を受けている。人工内耳のしくみは、音をスピーチプロセッサで電気信号に変換し、内耳（蝸牛）に挿入した刺激電極により蝸牛神経を直接刺激するものである。人工内耳は確かに優れた機器ではあるが、人工内耳を装着しても正常な聴力を獲得できるわけではない。以下人工内耳における聞き取りの面の問題点を挙げる。人工内耳を装着しても軽度～中等度難聴は残存する。人工内耳は多人数での会話、騒音下での会話に難がある。音楽の聞き取りは困難である。これらの問題点が生じる主な理由は、内耳の感覚細胞は1万個以上あるが、人工内耳刺激電極は約20個であり、これで1万個以上の細胞の役割を担うのには困難である。人工内耳は蝸牛神経を直接刺激する機器であるが、感音難聴者の多くは有毛細胞の傷害だけでなく、蝸牛神経も傷害を受けていることが多い。に関しては、根本的な解決方法は蝸牛有毛細胞再生しかなく、これは現時点では困難である。に関しては「蝸牛神経の再生」が可能になれば人工内耳を併用しての聞き取りの向上が期待される。人工内耳電極、そのコンピューター部分（スピーチプロセッサなど）には現在も改良が加え続けられているが、人工内耳装用者のパフォーマンス（言葉のききとりなど）はほぼプラトーに達している。この限界を打破する手段の1つとして、人工内耳手術を受ける高度感音難聴者の蝸牛神経が健聴者と同程度に再生され、蝸牛有毛細胞の機能により近似した人工内耳が開発されれば、人工内耳装用者も健聴者と同程度の聴覚の質が担保されると考えられる。したがって蝸牛神経の再生が、人工内耳と組み合わせた高度感音難聴者に対する新規難聴治療方法の開発に必須と考えられる。

## 2. 研究の目的

従来の蝸牛神経の再生研究は、神経栄養因子の投与により生存している蝸牛神経突起の伸張を目指した研究 (Rejali, 2007; Pigsty, 2017)は報告されているが、死滅した蝸牛神経に対する再生（無から有）を目指した研究は多くはない。世界中で様々な研究者が細胞移植による内耳再生を試みているが細胞移植により、蝸牛に整然と並んだ有毛細胞を再生させることは非常にハードルが高く、これまで誰も達成できていない。細胞移植とは異なる生物学的再生アプローチとして、内在性のグリア細胞から神経細胞を分化転換させる In vivo ダイレクトリプログラミング（分化転換）によるアプローチがあげられる。研究代表者の西村は生後の内耳からラセン神経節細胞を in vitro で初めてダイレクトリプログラミングした

(Nishimura 2014)。本研究課題では、蝸牛神経を分化転換により再生させたあと ABR により聴覚機能を検証し、高度感音難聴者に対する新規治療法の開発を目指す。

### 3 . 研究の方法

実験動物は B/6 マウス 8 週齢およびハートレー系モルモット 4 週齢を用いた。ラセン神経節細胞の障害方法として、マウスは後半規管から強心配糖体のウアバイン 1 mM, 1 ul をマイクロインジェクターで注入した。モルモットは正円窓から強心配糖体のウアバイン 1 mM, 1 ul をマイクロインジェクターで注入した。ウアバイン注入後 1 週後に ABR による聴覚機能解析と内耳および脳幹の組織解析を行った。分化転換を促す神経誘導ベクターとして AAV2 CAG-Ascl1-2A-NeuroD1 を用いた。ベクターは nano-injector を用いて蝸牛窓経由で蝸牛神経近傍のグリア細胞に感染させた。組織解析、聴覚機能解析、陰性対照は分化転換前の蝸牛神経近傍グリア細胞(リプログラミングのソース細胞)とした。組織解析は内耳の凍結切片を作製し、免疫組織学的手法を用いた。聴覚機能は ABR により解析した。

### 4 . 研究成果

マウス、モルモットを用いて *in vivo* で有毛細胞には障害を与えずラセン神経節を強心配糖体のウアバインやジゴキシンで特異的に障害させることに成功した。内耳組織の解析では有毛細胞は障害されず、ラセン神経節細胞のみが障害された。ABR では I 波以下波形が消失した。内耳組織解析の過程で、当初予定していなかった前庭神経節細胞の障害についても詳細に検討した。上前庭神経節のシュワン細胞の Na, K, ATPase alpha subunit の isotype は alpha1 優位である一方で、下前庭神経節のシュワン細胞の Na, K, ATPase alpha subunit の isotype は alpha2 優位であることを見出した。ラセン神経節は外有毛細胞に結合するタイプ 2 ラセン神経節細胞を除いて、内有毛細胞に結合するタイプ 1 ラセン神経節細胞はほぼ全て障害された一方で、前庭神経節細胞の障害はより緩徐であった。また生存した前庭神経節細胞は転写因子 Gata3 の発現が上昇しており、Gata3 の前庭神経節細胞生存に対する役割が示唆された。*in vivo* 分化転換を目指して接種した AAV2, Anc80 はラセン神経近傍のシュワン細胞での効率良い発現が得られず、AAV の血清型やプロモーターの更なる検討が課題として残された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 西村幸司	4. 巻 125
2. 論文標題 耳科学の進歩 蝸牛神経の基礎研究：隠れ難聴の病態解明と再生研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会会報	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） 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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西村幸司
2. 発表標題 マウス後半規管經由ウアパイン局所投与による前庭神経節への影響
3. 学会等名 第79回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村幸司
2. 発表標題 Cochlear Implants Meet Regeneration of Primary Auditory Neurons
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishimura K, Ogita H, Meas SJ, Taura A, Ito J
2. 発表標題 Generation of a mouse model of unilateral vestibular dysfunction.
3. 学会等名 The 42nd annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishimura K, Yasumoto A, Meas SJ, Ogita H, Taura A, Ito J, Omori K
2. 発表標題 Pharmacological Ablation of Vestibular Hair Cells or Ganglion Neurons to Generate a Model of Unilateral Vestibular dysfunction.
3. 学会等名 Symposium & 56th Inner Ear Biology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村幸司、康本明吉、扇田秀章、田浦晶子、伊藤壽一、大森孝一
2. 発表標題 一側性前庭障害モデルマウスの作製
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 西村幸司
2. 発表標題 蝸牛神経の基礎研究 隠れ難聴の病態解明と再生研究.
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会・学術講演会(招待講演)
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
---------	---------