

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00546

研究課題名（和文）透明化手法を用いた新規イメージング技術による内耳病態の包括的・網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of inner ear pathology by a new imaging technique using a transparent method

研究代表者

山嵜 達也（Yamasoba, Tatsuya）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：60251302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,400,000円

研究成果の概要（和文）：前庭に近い蝸牛基底回転、前庭、半規管のすべての感覚上皮が三次元的にきれいに描出できる透明化手法を確立した。前庭（球形嚢斑、卵形嚢斑）および前・後・外側の半規管膨大部を処理して免疫染色を行い、イメージング処理技術を用いて、正常感覚細胞のカウント、各感覚上皮の三次元的な形態と感覚上皮間の三次元的関係を解析した。この過程でcrista neglectaを同定した。感覚細胞の障害モデルはゲンタマイシンなどの投与により作成し、感覚細胞・シナプス、神経の変性や再生過程について、また抗酸化物質等の障害予防効果やBDNFによる再生誘導について透明化手法により内耳の各細胞・神経線維について網羅的な解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨と軟部組織を同時にかつ実質の周囲に大きな液体スペースが存在する組織の透明化には高度な技術開発が必要となる。我々は蝸牛の組織透明化に成功していたが、さらに広い範囲の蝸牛基底回転から前庭・半規管まで網羅的に組織観察できる技術を開発できたことにより、有毛細胞から神経線維の発達過程、障害時の受傷状態、再生過程をこれら異なる器官において同時に観察することが可能となり、理解が深まる。また前庭と半規管では有毛細胞の再性能力が異なるとされているが、その差を適切に調べることが可能となり、再生誘導の評価もより確実となるため、新規再生技術の開発で有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Optical tissue clearing technique was established that allows all sensory epithelia of the cochlear basal turn, vestibule, and three semicircular canals to be cleanly delineated in three dimensions. The vestibule (sacculle and utricle) and the anterior, posterior, and lateral semicircular canals were made transparent and immunostained, and imaging processing techniques were used to analyze the number of the sensory hair cells, the three-dimensional morphology of each sensory epithelium, and three-dimensional relationships among these sensory epithelia. In this process, the crista neglecta was discovered. We used gentamycin and other ototoxic drugs to create models of sensory cell damage, and conducted comprehensive analysis of the degeneration and regeneration processes of sensory hair cells, synapses, and nerves. We also analyzed the effects of antioxidants and other substances to prevent these damages and BDNF to induce regeneration of the hair cells and nerve fibers.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：前庭 三半規管 有毛細胞 解剖 組織透明化 病理

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内耳は感覚(有毛)細胞、支持細胞、シナプス、神経節など多彩な組織が複雑に位置する。蝸牛では求心性・遠心性繊維、内・外有毛細胞、前庭ではI型・II型有毛細胞など働きの異なるシステムがあり、蝸牛では部位により感知する周波数が異なる。このような複雑で精巧な解剖学的特性を有するため、種々の病的状態において障害されやすい細胞の種類や障害の程度、二次的に障害される細胞の種類や変性の程度が異なり、また修復・再生の動態も異なることが予想される。このため、難聴や平衡障害における病態の把握には内耳内の全ての組織・細胞の網羅的観察評価が理想的と考えられる。ただ内耳は骨胞に囲まれるという解剖学的特性があり、包括的観察は技術的に不可能とされ、切片やdissectionなどによる断片的な観察しかできていなかった。

2. 研究の目的

内耳骨胞に覆われた蝸牛・前庭・半規管の組織を透明化技術により三次元的に詳細に観察し、免疫染色、in situ hybridizationにより正常な状態における様々な分子の局在(周波数による差なども含む)や相互の関連を明らかにする技術を開発することが目的である。内耳毒性薬剤などによる障害時の蝸牛・前庭・半規管の病的変化について解析を行い、異なる細胞や構造およびその部位の違いによる障害の差や時間経過の相違等を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

蝸牛で開発した内耳透明化技術(modified Sca/eS)(Urata S et al. eLife 2019)を改良して使用した。高濃度糖アルコールを用いて組織内屈折率均一性を調整し、内耳骨包から頭蓋まで透明化した。透明化の過程で抗原の失活が出やすいため免疫染色が困難であったが、modified Sca/eSでの染色条件を調整して汎用されるほとんどの抗体で染色性が得られるようにした。生物試料はあらかじめ蛍光タンパク質を発現させたもの、蛍光化学物質を導入したもの、蛍光標識を使用して染色を行ったものを使用した。

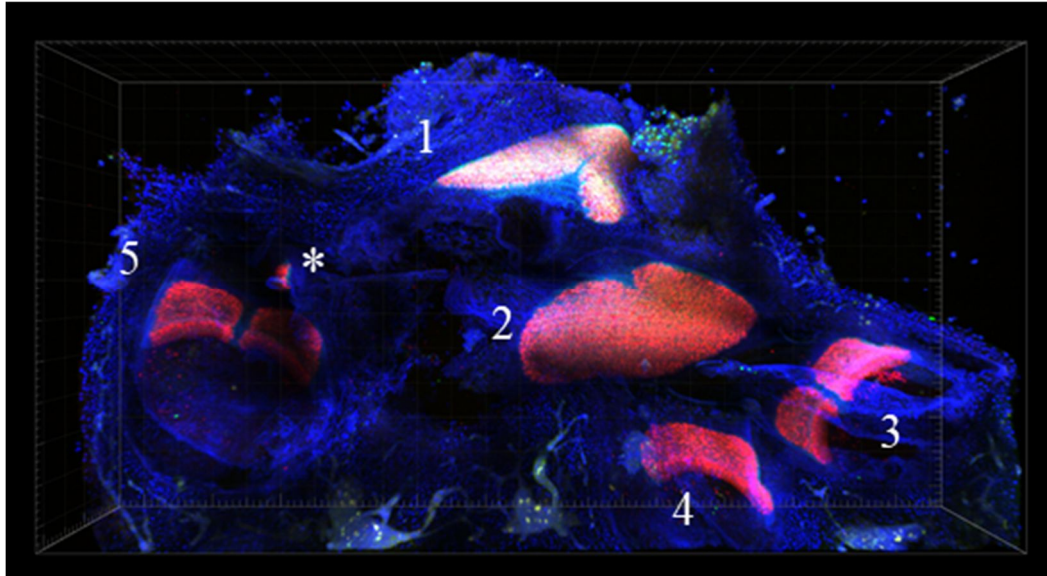
障害モデルはモルモットとマウスを用い、ゲンタマイシンによる耳毒性モデル、音響外傷モデル(ノイズボックス使用)、ゲルマニウム摂取によるミトコンドリア障害モデル、加齢モデルなどを用いた。聴覚は聴性脳幹反応ABRと歪耳音響放射DPOAEを用いて調べた。

また透明化手法で得られた病態仮説に対しては、蝸牛コルチ器・ラセン神経節細胞のdissection、HEI-0C1蝸牛細胞株を用い、H2O2の添加などのストレスを与えてミトコンドリア代謝機能の変化などを検討した。

細胞カウントは自動カウントソフトを導入してカウントし、感覚上皮の彎曲や各感覚の三次元的関係について形態の近似値を計算する数式(Levenberg Marquardt アルゴリズム)を用いて解析した。

4. 研究成果

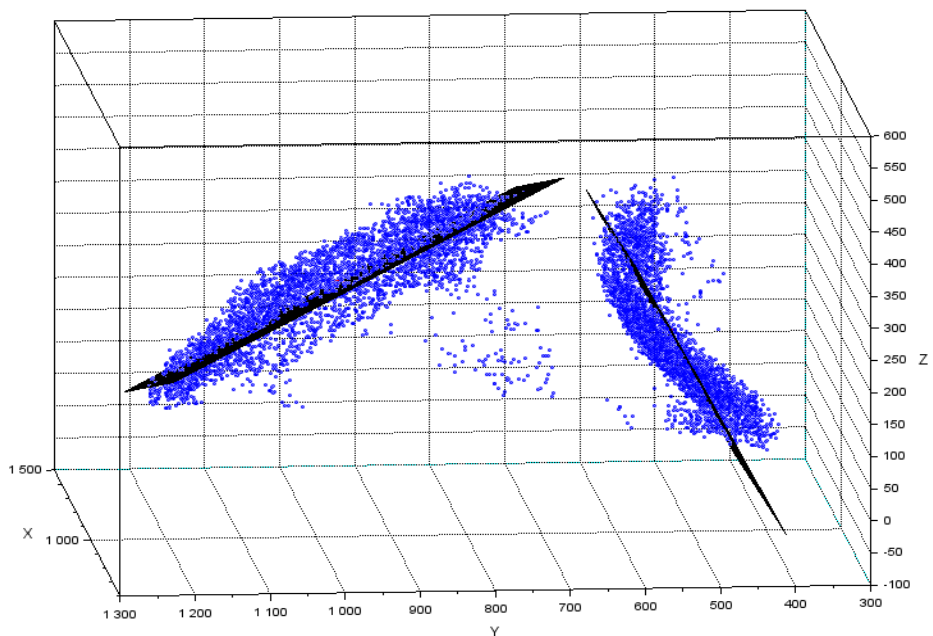
前庭に近い蝸牛基底回転、前庭、半規管を、骨胞を透明化して、すべての感覚上皮がコンタミネーションなくきれいに描出できる手法を確立した。前庭の二つの感覚上皮(球形囊斑、卵形囊斑)および三つ(前・後・外側)の半規管膨大部を同時に描出し、核染色(DAPI)、有毛細胞(ミオシン7a)、細胞骨格(ファロイジン)、神経線維(NF200)などの免疫染色を行い、イメージング処理技術を用いて、正常例の感覚細胞の細胞カウント、各感覚上皮の三次元的形態、それぞれの感覚上皮の三次元的関係について解析した。この過程でcrista neglecta(下図*)も同定した。



1: 球形嚢 2: 卵形嚢 3:前半規管 4: 外側半規管 5: 後半規管

マウスにおける球形嚢と卵形嚢の角度は平均 74 度（下図）で、前半規管と後半規管の距離は $1,489 \pm 170 \mu\text{m}$ 、前半規管と外側半規管との距離は $960 \pm 587 \mu\text{m}$ など、解剖学的に計測を行った。

また、障害モデルについてはゲンタマイシン投与マウスモデルを作成し、感覚細胞・シナプス、神経の変性および再生過程について経時的に観察を行った。蝸牛については二酸化ゲルマニウムによるミトコンドリア障害マウスを作成し、蝸牛障害の詳細について DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析、聴覚と組織変化の解析を行い、抗酸化物質として水素水、CoenzymeQ10、タウリンの障害予防効果について検討し報告した。さらにこのモデルを用いて、透明化による蝸牛・前庭の各種細胞の網羅的解析を行い、その障害および障害予防効果の感覚上皮間の差について解析している。またマウスの音響外傷および老人性難聴の予備実験として、ピロロキノリンキノン (PQQ) の予防効果につき、ABR による機能解析、感覚細胞、シナプス、蝸牛神経、ラセン神経節、血管条の形態学的解析を行い、その有効性を確認した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Gao Y, Kamogashira T, Fujimoto C, Iwasaki S, Yamasoba T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of pyrroloquinoline quinone on noise-induced and age-related hearing loss in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15911
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19842-w	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
1. 著者名 Gao Y, Kamogashira T, Fujimoto C, Iwasaki S, Yamasoba T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Beneficial effects of time-restricted feeding on gentamicin cytotoxicity in mouse cochlea and vestibular organs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investig Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 530-539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lio2.748	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 Kashio A, Yamada C, Yasuhara K, Kamogashira T, Someya S, Yamasoba T.	4. 巻 428
2. 論文標題 Taurine, Coenzyme Q10, and Hydrogen Water Prevents Germanium Dioxide-Induced Mitochondrial Dysfunction and Associated Sensorineural Hearing Loss in mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 108678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heares.2022.108678	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 Ying Gao, Teru Kamogashira, Chisato Fujimoto, Tatsuya Yamasoba	4. 巻 8
2. 論文標題 Pyrroloquinoline quinone (PQQ) protects mitochondrial function of HEI-OC1 cells under premature senescence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Aging	6. 最初と最後の頁 3 (1-17)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41514-022-00083-0	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

1. 著者名 Kinoshita M, Fujimoto C, Iwasaki S, Kondo K, Yamasoba T.	4. 巻 15(2)
2. 論文標題 Oral Administration of TrkB Agonist, 7, 8-Dihydroxyflavone Regenerates Hair Cells and Restores Function after Gentamicin-Induced Vestibular Injury in Guinea Pig	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics.	6. 最初と最後の頁 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics15020493	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yamasoba T, Kamogashira T, Fujimoto C, Gao Y, Iwasaki S.
2. 発表標題 Pyrrroquinoline quinone, a useful therapeutic agent for the treatment and prevention of noise-induced and age-related hearing loss.
3. 学会等名 Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum, (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kamogashira T, Lin SY, Urata S, Yamasoba T.
2. 発表標題 Numerical analysis of vestibular specimens with optical clearing method.
3. 学会等名 Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum, (国際学会)
4. 発表年 2023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	岩崎 真一 (Iwasaki Shinichi) (10359606)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

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	木下 淳 (Kinoshita Makoto) (10755648)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	榎尾 明憲 (Kashio Akinori) (20451809)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究分担者	鴨頭 輝 (Kamogashira Teru) (30807152)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	近藤 健二 (Kondo Kenji) (40334370)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究分担者	藤本 千里 (Fujimoto Chisato) (60581882)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	浦田 真次 (Urata Shinji) (60849404)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	松本 有 (Matsumoto Yu) (80548553)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	削除：2021年12月9日

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