

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06466

研究課題名(和文)内耳外有毛細胞の自発的再生機構の解明

研究課題名(英文) Spontaneous regeneration mechanism of inner ear outer hair cells

研究代表者

松岡 邦枝 (MATSUOKA, Kunie)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・研究員

研究者番号：40291158

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)：我々はマウスを用いて内耳外有毛細胞(OHC)破壊後の遺伝子発現変動を解析する過程で、OHCが自発的に再生する可能性を見出した。細胞の再生過程は、分化・成熟過程を辿ると考えられることから、コルチ器の形成期にOHCの破壊により顕著に発現が減少する遺伝子を探索した結果、Agr3を同定した。AGR3はダイテルス細胞に強く発現しており、OHCの形成にダイテルス細胞が密接に関わっていることが裏付けられた。一方、OHCを破壊した成熟マウスにWntシグナル阻害剤RPI-724を週3回12週間腹腔投与を行った結果、聴力の改善傾向が認められ、Wntシグナルの阻害がOHCの再生を促すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳外有毛細胞(OHC)は鋭敏な聴覚を得るために極めて重要である。OHCは加齢・騒音・感染・アミノグリコシド系抗生剤の投与等によって損傷を受け、哺乳類では一度失われると再生しないとされてきたが、我々はOHCが急激に破壊されるとOHCの自発的な再生が誘導される可能性を見出した。現在、難聴の根本的な治療法はなく、補聴器や人工内耳の装用により聴力を補わざるを得ないが、OHCの自発的な再生のメカニズムが明らかになれば、再生を促進させるための創薬や治療法の確立に向けて極めて重要な情報を提供することとなる。

研究成果の概要(英文)：We obtained traces of spontaneous OHC regeneration after abrupt destruction using Prestin-hDTR mice. Regeneration seemed to mimic the natural process of development. We found that Agr3 whose function in hearing was unknown, were remarkably downregulated by OHC-depletion at a neonatal stage. Immunohistochemical studies revealed that AGR3 was not expressed in OHCs but in Deiters' cells which are the supporting cells of OHCs. Our finding in this study suggested that there are close crosstalk processes between OHCs and Deiters' cells in OHC development. In contrast, we assayed the effects of Wnt signaling inhibitor RPI-724 on OHC regeneration. We observed recovery of hearing by administration of the RPI-724 three times a week for 12 weeks to adult OHC-depleted mice. It was suggested that inhibition of Wnt/  $\beta$ -catenin/CBP signaling promotes regeneration of OHCs.

研究分野：実験動物学

キーワード：難聴 外有毛細胞 再生 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

空気の振動である音刺激の電気刺激への変換には、内耳蝸牛内のコルチ器に整列して存在する内毛細胞 (IHC) および外毛細胞 (OHC) が重要な役割を果たしている。有毛細胞の上端には感覚毛が存在し、音刺激により感覚毛が屈曲すると、IHC ではイオンチャンネルが開いて陽イオンが流入し、細胞内電位の上昇により聴神経が刺激され、この信号が脳へ伝達されて音を認識する。一方、OHC は IHC と同様に細胞内電位が変化するが、この電位変化によって OHC は伸縮運動してコルチ器の振動を増幅し、微弱な音を増大させ、逆に過大に強い音刺激は抑制的に音を伝達する。ヒトが鋭敏な聴力を得られるのはこのためである。

蝸牛における OHC の増幅機構は「聞こえの調節」に極めて重要であり、OHC の機能異常は難聴の発症に直結する。一般的に OHC の方が IHC よりも弱く、先に障害を受けることが多い。細菌やウイルスの感染、騒音への曝露、アミノグリコシド系抗生剤の投与等によって OHC は損傷を受けるが、OHC は一度失われると再生しないとされている。また、加齢によってもその数は減少する。高齢者に難聴患者が多いのはそのためであるが、加齢性難聴の根本的な治療法はなく、補聴器や人工内耳の装用により聴力を補わざるを得ない。加齢性難聴は人類で最も多い慢性疾患の一つであり、OHC の機能を明らかにすることが難聴の予防や治療法の開発の基礎となると期待される。

我々は、OHC の分子メカニズムを解明するためのツールとして、ジフテリア毒素 (DT) の投与により任意の時期に OHC を誘導的に破壊可能なマウスモデル (*Prestin-hDTR* マウス) を開発した。*Prestin-hDTR* マウスでは、DT 投与 7 日後には OHC の細胞数が 5% 以下に減少するが、コルチ器に存在する IHC や支持細胞は数や形態に全く影響を受けない。OHC 破壊マウスおよび非破壊マウスの蝸牛における遺伝子発現をマイクロアレイ解析により網羅的に比較した結果、*Myo15*、*Strc*、*Slc26a5* (*prestin*)、*Chrna10*、*Chrna9*、*Ocm* 等聴覚関連遺伝子が OHC 破壊マウスで著しく減少していることが明らかとなった (Matsuoka et al., *Sci. Rep.*, 2019)。一方、DT 投与 7 日後と 35 日後の蝸牛における遺伝子発現を比較した結果、驚くべきことに *Myo15*、*Strc*、*Chrna9*、*Chrna10* の発現量が 35 日後で増加していることが判明し、この結果は qRT-PCR によっても実証された。*Myo15* および *Strc* は OHC の上端に存在する感覚毛に発現する難聴原因遺伝子であり、*Chrna9* および *Chrna10* は神経伝達に重要なコリン受容体をコードする。この結果は、OHC が急激に破壊されたことによって、OHC の自発的な再生が誘導されたことを強く示唆していた。

## 2. 研究の目的

難聴の克服を目的とした内耳有毛細胞の再生への取り組みは以前より行われてきた。先行研究で、支持細胞に OHC 特異的転写因子である *Atoh1* を発現させる (Liu et al., *J. Neurosci.*, 2012) あるいは音響曝露により OHC を傷害した後に Notch 情報伝達系阻害剤を投与する (Mizutani et al., *Neuron*, 2013) ことで支持細胞から有毛細胞に分化させたという報告があり、OHC の再生には支持細胞を脱分化させて新たな有毛細胞を生じさせるという方法が有力視されている。本研究では、まだ明らかになっていない OHC の自発的な再生の可能性を探り、そのメカニズムを解明することを目的として、独自に開発した *Prestin-hDTR* マウスを用いて OHC 破壊後の遺伝子発現および聴力の変化を詳細に観察した。OHC の自発的な再生のメカニズムが明らかになれば、再生を促進させるための創薬や治療法の確立に向けて極めて重要な情報を提供することとなる。

## 3. 研究の方法

### (1) OHC の分化に重要な遺伝子の同定

細胞の再生過程は、分化・成熟過程を辿ると考えられることから、コルチ器の形成期に OHC の分化に重要な遺伝子を探索した。すなわち、生後 1 日の *Prestin-hDTR* マウスに 50 µg/kg DT を投与し、7 日後の遺伝子発現を DT 非投与 *Prestin-hDTR* マウス、DT 投与 / 非投与 WT マウスと比較した。DT 投与 *Prestin-hDTR* マウスで著しく発現が減少する遺伝子について、免疫組織科学的な解析を行った。

### (2) OHC の再生における Wnt シグナル阻害剤の効果

Wnt 情報伝達系が OHC の分化に重要とされていることから、OHC 破壊マウスに Wnt シグナル阻害剤である RPI-724 を投与し、OHC の自発的な再生の促進効果を *in vivo* で検討した。5 週齢の *Prestin-hDTR* マウスに 50 µg/kg DT を投与して OHC を破壊後、RPI-724 を週 3 回 12 週投与し、聴力の指標である聴性脳幹反応 (ABR) および歪成分耳音響放射 (DPOAE) の変化を測定した。

#### 4. 研究成果

新生仔期に OHC を破壊することにより発現が著しく減少する遺伝子として *Agr3* (anterior gradient 3) を同定した。これまでに AGR3 が聴覚において機能することは知られていない。抗 AGR3 抗体を用いてコルチ器における発現を詳細に調べた結果、AGR3 は生後 1 日齢から基底回転から中回転におけるダイテルス細胞およびヘンゼン細胞に発現が認められ、生後 4 日齢で全ての領域で明瞭な発現が観察された(図 1)。AGR3 のダイテルス細胞における発現は生後 35 日齢で消失したが、ヘンゼン細胞における発現は持続していた。一方、OHC の破壊の過程において、AGR3 の発現は OHC の破壊が進行するに従ってダイテルス細胞から減弱した。これらの結果は、AGR3 が OHC の分化・成熟に重要であり、OHC が損傷した際に OHC の再生に関与する可能性のあることを示唆している。

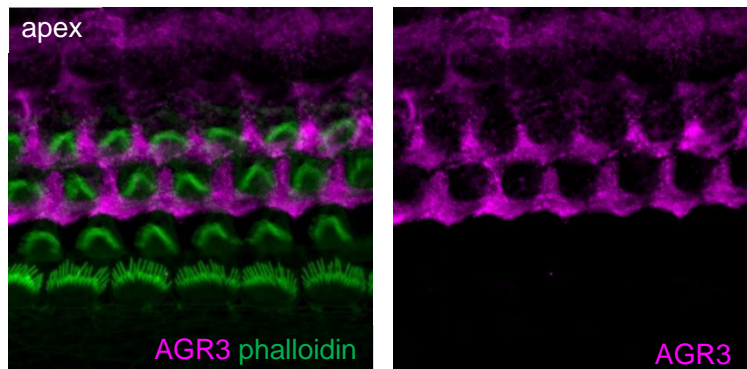


図 1 生後 8 日の WT マウスコルチ器における AGR3 の発現

OHC 破壊後に RPI-724 を投与することによって、非投与マウスに比較して ABR 閾値の低下および DPOAE の上昇が認められた。すなわち、Wnt/ $\beta$ -catenin/CBP シグナルの阻害により、OHC の自発的再生が促進されたことが示唆される。今後、OHC の自発的再生メカニズムが明らかになれば、難聴の再生医療に向けての創薬や治療法の確立への発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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<br>Yasuda SP, Miyasaka Y, Hou X, Obara Y, Shitara H, Seki Y, Matsuoka K, Takahashi A, Wakai E, Hibino H, Takada T, Shiroishi T, Kominami R, Kikkawa Y | 4. 巻<br>10         |
| 2. 論文標題<br>Two loci contribute to age-related hearing loss resistance in the Japanese wild-derived inbred MSM/Ms mice  | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>Biomedicines   | 6. 最初と最後の頁<br>2221 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/biomedicines10092221  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Yasuda SP, Seki Y, Suzuki S, Ohshiba Y, Hou X, Matsuoka K, Wada K, Shitara H, Miyasaka Y, Kikkawa Y                                     | 4. 巻<br>389     |
| 2. 論文標題<br>c.753A>G genome editing of a Cdh23ahl allele delays age-related hearing loss and degeneration of cochlear hair cells in C57BL/6J mice. | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Hearing Research  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.heares.2020.107926   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kikkawa Y, Yasuda SP, Takahashi A, Mao T, Prakhongcheep O, Seki Y, Shitara H, Matsuoka K        |
| 2. 発表標題<br>Functional analysis of downregulated genes after specific depletion of outer hair cells in mice |
| 3. 学会等名<br>36th International Mammalian Genome Conference（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yasuda SP, Miyasaka Y, Hou X, Obara Y, Shitara H, Seki Y, Matsuoka K, Takahashi A, Wakai E, Hibino H, Takada T, Shiroishi T, Kominami R, Kikkawa Y |
| 2. 発表標題<br>Two loci, ah13 and ah110, contribute to age-related hearing loss resistance in Japanese wild-derived inbred MSM/Ms mice                            |
| 3. 学会等名<br>36th International Mammalian Genome Conference（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>安田俊平, 宮坂勇輝, 侯雪含, 小原央, 設楽浩志, 関優太, 松岡邦枝, 高橋あい, 若井恵里, 日比野浩, 高田豊行, 城石俊彦, 木南凌, 吉川欣亮 |
| 2. 発表標題<br>ah13およびah110遺伝子座は日本産野生マウス由来MSM系統の加齢性難聴抵抗性に関与する                                 |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会第94回大会   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>安田俊平, 関優太, 松岡邦枝, 侯雪含, 吉川欣亮             |
| 2. 発表標題<br>C57BL/6マウスの高周波音域の加齢性難聴発症を抑制する新規遺伝子座の同定 |
| 3. 学会等名<br>第31回日本耳科学会総会・学術講演会                     |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉川欣亮, 安田俊平, 松岡邦枝                   |
| 2. 発表標題<br>選択的外有毛細胞破壊によって誘導された支持細胞発現遺伝子群の発現減少 |
| 3. 学会等名<br>第31回日本耳科学会総会・学術講演会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松岡邦枝, 安田俊平, 関優太, 吉川欣亮       |
| 2. 発表標題<br>TRECK法による出生直後のマウス内耳外有毛細胞の破壊 |
| 3. 学会等名<br>第43回日本分子生物学会年会              |
| 4. 発表年<br>2020年                        |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人東京都医学総合研究所 難聴プロジェクト  
<https://www.igakuken.or.jp/mammal/>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                   | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 和田 健太<br><br>(WADA Kenta)<br><br>(20508113) | 東京農業大学・生物産業学部・教授<br><br><br><br>(32658) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|