

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09727

研究課題名（和文）デルタ型グルタミン酸受容体の異常による内耳synaptopathyの病態解明

研究課題名（英文）The Role of medial olivocochlear-outer hair cell synapse in age-related hearing loss: Insights from Cbln1 knockout mice

研究代表者

藤川 太郎 (Fujikawa, Taro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60401402

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）：蝸牛におけるcerebellin-1 (Cbln1) の局在と機能を明らかにした。Cbln1は内耳保護機構を担う外有毛細胞遠心性シナプスのシナプス間隙に局在した。Cbln1の欠損でシナプス終末の萎縮と高音域の難聴を認めた。また一過性閾値上昇の条件において不可逆的な外有毛細胞機能の低下と蝸牛シナプス病の増悪による永続的閾値上昇を生じた。外因性Cbln1を内耳に発現させると、Cbln1欠損マウスで閾値上昇が軽減し、野生型マウスで蝸牛シナプス病が減弱した。Cbln1は内耳のシナプス形成因子であり、その欠損は過剰音響刺激に対する脆弱性を引き起こす。Cbln1は加齢性難聴に対する遺伝子治療の候補となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化人口の増加と共に加齢性難聴が健康寿命にかかわる大きな問題となっている。加齢性難聴の病態に蝸牛シナプス病があるがその分子機構は不明な点が多い。Cerebellin-1 (Cbln1) は中枢神経系の強力なシナプス形成因子であることが知られているが、本研究からCbln1が蝸牛遠心性シナプスの形成に重要であり、その不全により過剰音響刺激に対する脆弱性が増し蝸牛シナプス病を増悪させることがわかった。蝸牛シナプス病のメカニズムの一端を分子レベルで明らかにしたのは本研究が初めてである。外因性Cblnによる難聴の遺伝子治療や予防などへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study elucidated localization and function of cerebellin-1 (Cbln1) in the mouse cochlea. Cbln1 expressed in synaptic clefts of the medial olivocochlear/outer hair cell (MOC/OHC) synapses, which form a negative-feedback gain-control system in the cochlea. Cbln1-deficient (Cbln1^{-/-}) mice had immature MOC/OHC synapses and progressive high-frequency hearing loss. Under noise-induced transient threshold shift condition, Cbln1^{-/-} mice showed permanent threshold shifts due to irreversible OHC dysfunction and exacerbation of cochlear synaptopathy. Remarkably, adeno-associated virus-mediated Cbln1 transduction in the cochlea resulted in attenuated threshold shifts in Cbln1^{-/-} mice and reduced synaptopathy in wild-type mice. The findings suggest that Cbln1 is a synaptic organizer in the cochlea and the deficiency causes vulnerability to noise exposure and exacerbation of cochlear synaptopathy. Cbln1 can be a new target of gene therapy for noise-induced or age-related hearing loss.

研究分野：Otolaryngology

キーワード：Age-related hearing loss Cochlear synaptopathy Outer hair cell Cerebellin-1

1. 研究開始当初の背景

デルタ型グルタミン酸受容体は内耳を含めて神経系に広く発現している。近年、デルタ型受容体は強力な synaptic organizer であり、シナプス可塑性にも関与することがわかり、グルタミン酸受容体の新しい機能として注目されている。さらにデルタ型受容体の異常による synaptopathy が多くの神経変性疾患と関連付けられている。研究代表者は前研究 (Takeda, et al., 2020) で、デルタ型受容体の GluD1 と GluD2 が蝸牛・前庭に発現していて代償関係にあること、その異常が外有毛細胞遠心性シナプスの変性による進行性の高音障害型難聴を引き起こす可能性を報告した。本研究は他領域との横断的な研究を進めることで、内耳におけるデルタ型受容体の synaptic organizer としての機能を明らかにしようというものである。そして外有毛細胞 synaptopathy という新しい疾患概念を構築し、内耳障害の治療の新しいアプローチを開発することを目標にする。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的はデルタ型受容体が有毛細胞の synaptic organizer であることを証明し、難聴や平衡障害の新たな病態モデルを構築することである。

3. 研究の方法

GluD1 欠損マウスの表現型解析および形態学的評価を行う。表現型解析としては聴性脳幹反応 (ABR) と歪成分耳音響放射 (DPOAE) を用いて定量的・経時的な聴覚評価を行う。平衡機能評価として VsEP を測定する。形態学的評価としては蝸牛ホールマウントおよび内耳切片標本の免疫組織化学染色を行い、GluD1 とその関連分子の局在解析、およびシナプスの形状や数の変化の定量を行う。

本研究の遂行に必要な GluD1 欠損マウスや GluD2 欠損マウス、HA-Cbln1 マウスなどは共同研究者である慶応義塾大学生理学の柚崎研究室より分与いただく。

また本研究を通じて、東京医科歯科大学耳鼻咽喉科および慶応義塾大学柚崎研究室の大学院生の研究指導を行う。

4. 研究成果

(1) ABR 測定系の完成

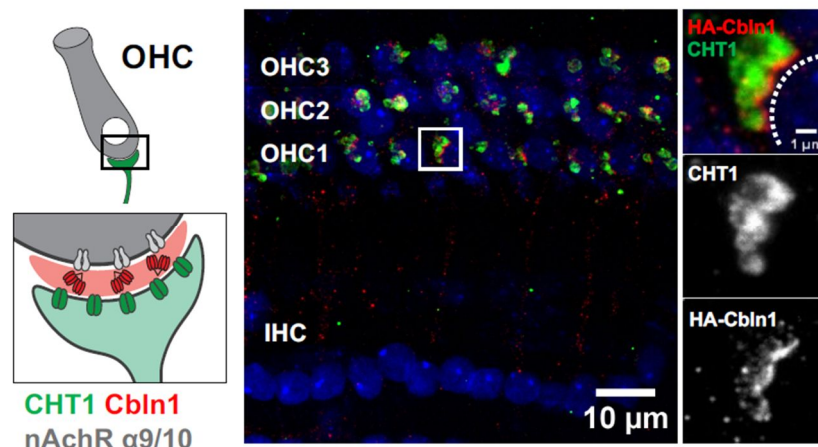
本研究室は当初より、マウスの聴平衡機能の測定系の老朽化が問題であった。PowerLab 2/26 を導入して広い周波数域にわたり正確な聴力評価が可能となった。さらに耳石器機能の評価手段である VsEP が測定可能となった。

(2) GluD1 の局在解析は困難であった

過去の文献 (Safieddine & Wenthold, 1997; Gao, et al., 2007) および前研究 (Takeda, et al., 2020) から GluD1 が蝸牛に発現していることは明らかだが、その局在の同定は困難を極めた。入手可能なあらゆる抗体と染色方法を試した結果、唯一、Glyoxal 固定のホールマウント染色で遠心性内側オリブ蝸牛束-外有毛細胞 (MOC-OHC) シナプス終末に不明瞭な染色が得られた。さらに HA で標識した GluD1 マウスを生成して蝸牛内の GluD1 の局在を調べたが、結局、GluD の局在と起源を同定するに至らなかった (Fujikawa, et al., 2022)。そのため研究の方向性を大きく変更する必要性を迫られた。過去の研究から中枢神経系でのシナプス形成において GluD1 の共役の相手である Cerebellin-1 (Cbln1) に注目し、その蝸牛における局在と機能を調べることにした。

(3) Cbln1 は遠心性 MOC-OHC シナプス間隙に発現する

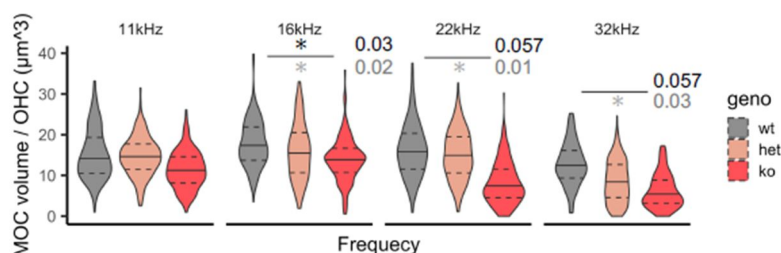
前研究 (Takeda, et al., 2020) から Cbln1 は MOC-OHC シナプス間隙に発現することが形態学的解析でわかっていた (図 1)。Flp/FRT システムを用いて、発生過程で Cbln1 を発現する細胞特異的に FP635 と StayGold を発現するマウスを作成し、蝸牛および脳幹での Cbln1 の発現を



解析した。その結果、蝸牛内で MOC-OHC の軸索とシナプス間隙に強い発現がみられ、前研究と矛盾しない結果が得られた。高音域で少数のシグナル陰性終末がみられたが、StayGold でその割合が少なかったことから発現効率によるものだと考えられた。一方、脳幹ではアセチルコリン (ChAT)陽性の外側オリブ核(外側オリブ蝸牛束の起始核)と台形体腹側核(MOCの起始核)の一部にシグナルがみられた。さらに ChAT-Cre/flox マウスでコリン作動性ニューロン特異的に Cbln1 の発現を抑制すると MOC-OHC シナプス終末の Cbln1 が消失した。以上から、Cbln1 はおそらく蝸牛遠心性線維の起始核である上オリブ核が起源だと考えられた。

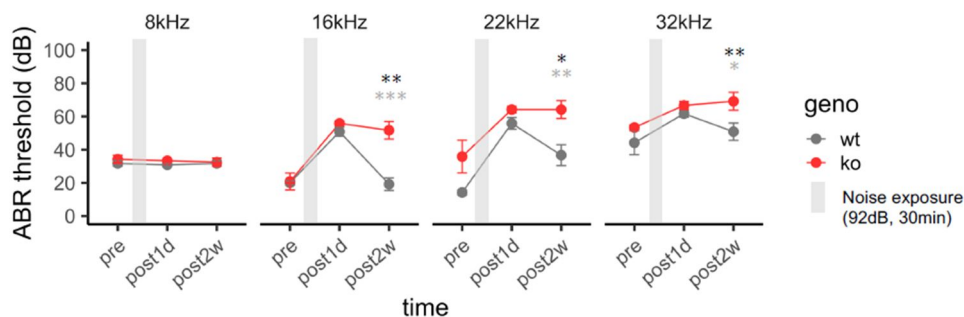
(4) Cbln1 欠損マウスは高音域の難聴と外有毛細胞障害を示す

3 か月齢の Cbln1 欠損マウスの聴覚を、求心性聴覚路の活動性を反映した ABR と外有毛細胞の機能検査である DPOAE で評価した。16kHz 以上の高音域で ABR と DPOAE の閾値上昇と DPOAE の振幅低下を認めた。また外有毛細胞数は 45kHz でやや減少を認める程度であったが、MOC-OHC シナプス終末のサイズは 16kHz 以上で減少を認めた(図2)。一方、求心路については内毛細胞-らせん神経節シナプス機能の指標である ABR の I 波の振幅と潜時は野生型と同等で、リボンシナプス数にも変化はみられなかった。以上から Cbln1 欠損マウスの難聴は外有毛細胞の機能障害による聴覚路の活動性の低下が主な原因であり、MOC-OHC シナプスの機能不全が関連していることが示唆された。



(5) Cbln1 欠損マウスは過剰音響刺激に対して脆弱である

MOC-OHC シナプスはコリン作動性に外有毛細胞の自動能 (electromotility) を抑制し、過大な音響刺激に対して内耳保護的にはたらく。最近、MOC-OHC シナプスの機能不全が求心性聴覚路のグルタミン毒性である蝸牛シナプス病 (cochlear synaptopathy) を誘導し、騒音性難聴や加齢性難聴の発症と関連することが報告されている (Maison, et al., 2013; Liberman, et al., 2014; Boero, et al., 2018; Boero, et al., 2020)。Cbln1 と cochlear synaptopathy の関連を調べるために一過性閾値上昇 (TTS) の実験系を新たに立ち上げ、Cbln1 欠損マウスの評価を行った。予備実験から 3 か月齢のマウスに対する TTS 条件を 8-16kHz のバンドノイズで 92dB SPL の 30 分刺激と設定した。負荷翌日に野生型と Cbln1 欠損マウスの両方で 16kHz 以上での ABR 閾値の上昇がみられたが、2 週間後には野生型が閾値の回復を示す一方で、Cbln1 欠損マウスは 16kHz 以上で有意な閾値上昇が持続した(図3)。また 2 週間後の I 波振幅の回復も Cbln1 欠損マウスは野生型と比較して 22kHz 以上で不良だった。DPOAE 振幅は負荷翌日に 12kHz 以上で減弱がみられ、2 週間後に野生型マウスでは回復した一方で、Cbln1 欠損マウスではむしろ増悪した。さらに内毛細胞のリボンシナプス数の減少は Cbln1 欠損マウスで有意に多かった。これらの結果から、TTS 条件で Cbln1 欠損マウスでは不可逆的な外有毛細胞機能の低下による永続的な閾値上昇 (PTS) が生じて、cochlear synaptopathy が増悪することがわかった。これは Cbln1 の欠損により MOC-OHC シナプスの抑制性入力が増弱し、過剰音響刺激に対する内耳の脆弱性が高まることを示唆する。



(6) Cbln1 の蝸牛内強制発現の効果 Cbln1 欠損マウスでの検討

AAV を用いて外側半規管経路で 3 か月齢の Cbln1 欠損マウスの内耳に Cbln1 を発現させ、Cbln1 補充の効果調べた。Cbln1 の代わりに EGFP を発現させた Cbln1 欠損マウスをコントロールとして TTS と MOC-OHC シナプス終末のサイズを比較した。AAV 注入 2 週間後に MOC-OHC シナプス間隙に Cbln1 の発現を確かめた。音響負荷翌日に両者とも 16kHz 以上で ABR 閾値の上昇がみられ

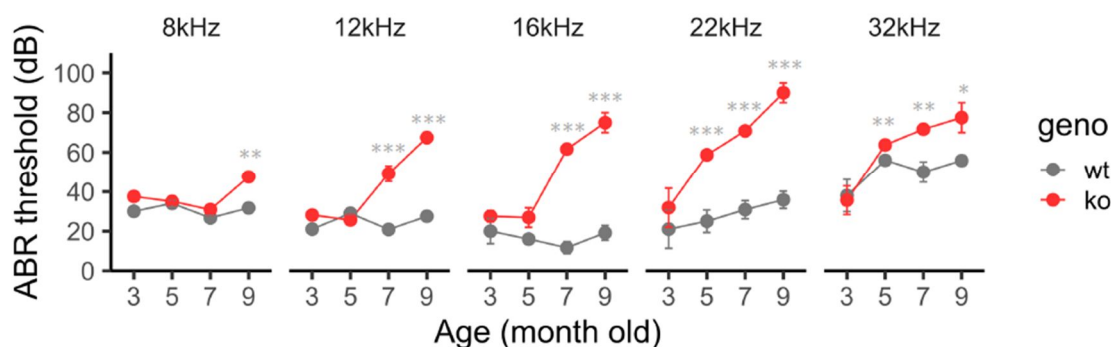
た。2週間後には Cbln1 発現マウスで 16kHz の閾値に改善がみられたが、22kHz 以上では Cbln1 の補充効果は確認できなかった。MOC-OHC シナプス終末のサイズは Cbln1 補充の有無で違いは認めなかった。

(7) Cbln1 の蝸牛内強制発現の効果 野生型マウスでの検討

同様に C57BL/6N マウスの内耳に Cbln1 または EGFP を発現させ、Cbln1 補充の効果を調べた。予備実験から 3 か月齢の C57BL/6N マウスに対する TTS 条件を 8-16kHz のバンドノイズで 92dB SPL の 60 分刺激と設定した。両者とも負荷翌日に 16kHz 以上で ABR 閾値は上昇し、2週間後には負荷前と同等な閾値にまで回復した。興味深いことに、2週間後の I 波振幅は EGFP を発現させた群で負荷前と比べて減少したが、Cbln1 を発現させた群では負荷前と同等のレベルにまで改善を認めた。これらの結果から、Cbln1 の補充は MOC-OHC シナプス機能を回復ないし増強させる効果があり、それにより cochlear synaptopathy を軽減あるいは予防できる可能性を示唆する。現在、リボンシナプス数の評価を行っている。

(8) Cbln1 欠損マウスの聴覚の加齢性変化

最後に Cbln1 欠損による加齢の影響を調べるために ABR 閾値の経時的な測定をした。その結果、Cbln1 欠損は高音域から閾値上昇が出現し、徐々に低音域へと広がり、9 か月齢には 70-90dB SPL の高度難聴に至ることがわかった (図4)。



<引用文献>

1. S. Safieddine and R. J. Wenthold. The glutamate receptor subunit delta1 is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. *J Neurosci* 1997; 17(19): 7523-7531.
2. J. Gao, S. F. Maison, X. Wu, K. Hirose, S. M. Jones, I. Bayazitov, et al. Orphan glutamate receptor delta1 subunit required for high-frequency hearing. *Mol Cell Biol* 2007; 27(12): 4500-4512.
3. Takeda T, Fujikawa T, Sakamaki, Y, et al. GluD1 deficiency causes progressive hearing loss and insufficient efferent synapse formation on outer hair cells. 42nd ARO midwinter meeting. Baltimore, February 2019.
4. Fujikawa T, Shiozaki M, Takeda T, et al. Insufficient trans-synaptic complex of delta-type glutamate receptor/cerebellin 1 causes medial olivocochlear synaptopathy and age-related hearing loss. *Neuro* 2022. Okinawa, June 2022.
5. S. F. Maison, H. Usubuchi and M. C. Liberman. Efferent feedback minimizes cochlear neuropathy from moderate noise exposure. *J Neurosci* 2013; 33(13): 5542-5552.
6. M. C. Liberman, L. D. Liberman and S. F. Maison. Efferent feedback slows cochlear aging. *J Neurosci* 2014; 34(13): 4599-4607.
7. L. E. Boero, V. C. Castagna, M. N. Di Guilmi, J. D. Goutman, A. B. Elgoyhen and M. E. Gómez-Casati. Enhancement of the Medial Olivocochlear System Prevents Hidden Hearing Loss. *J Neurosci* 2018; 38(34): 7440-7451.
8. L. E. Boero, V. C. Castagna, G. Terreros, M. J. Moglie, S. Silva, J. C. Maass, et al. Preventing presbycusis in mice with enhanced medial olivocochlear feedback. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(21): 11811-11819.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ito Taku, Fujikawa Taro, Honda Keiji, Makabe Ayane, Watanabe Hiroki, Bai Jing, Kawashima Yoshiyuki, Miwa Toru, Griffith Andrew J., Tsutsumi Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Cochlear Pathomorphogenesis of Incomplete Partition Type II in Slc26a4-Null Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Association for Research in Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 681 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10162-021-00812-4	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 Fujikawa Taro, Honda Keiji, Ito Taku, Kishino Mitsuhiro, Kimura Naoki, Umezawa Natsuka, Hirano Mana, Aoki Natsuki, Kawashima Yoshiyuki, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Enhanced fallopian canal as a potential marker for temporal bone vasculitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 1168 ~ 1175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.489	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 Fujikawa Taro, Tanimoto Kousuke, Kawashima Yoshiyuki, Ito Taku, Honda Keiji, Takeda Takamori, Sonobe Akane, Aoki Natsuki, Bai Jing, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Cholesteatoma has an altered microbiota with a higher abundance of <i>Staphylococcus</i> species	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 2011 ~ 2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.934	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 Watanabe Hiroki, Ito Taku, Aoki Natsuki, Bai Jing, Honda Keiji, Kawashima Yoshiyuki, Fujikawa Taro, Ikeda Takuo, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 183
2. 論文標題 Quantitative analysis and correlative evaluation of video-oculography, micro-computed tomography, and histopathology in Pendrin-null mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 106194 ~ 106194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2023.106194	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 Kurata Natsuko, Kawashima Yoshiyuki, Ito Taku, Fujikawa Taro, Nishio Ayako, Honda Keiji, Kanai Yasuhisa, Terasaki Mariko, Endo Ikuyo, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Advanced Magnetic Resonance Imaging Sheds Light on the Distinct Pathophysiology of Various Types of Acute Sensorineural Hearing Loss	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 656 ~ 663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000003930	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 Bai Jing, Ito Taku, Fujikawa Taro, Honda Keiji, Kawashima Yoshiyuki, Watanabe Hiroki, Kurata Natsuko, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 <scp>Three dimensionally</scp> visualized ossification and mineralization process of the otic capsule in a postnatal developmental mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 1036 ~ 1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.1090	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 Fujikawa Taro, Ito Taku, Okada Ryuhei, Sawada Mitsutaka, Mohri Kaori, Tateishi Yumiko, Takahashi Ryosuke, Asakage Takahiro, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 445
2. 論文標題 Combined genetic polymorphisms of the GSTT1 and NRF2 genes increase susceptibility to cisplatin-induced ototoxicity: A preliminary study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 108995 ~ 108995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heares.2024.108995	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 Mizoguchi Yoshie, Fujikawa Taro, Kawashima Yoshiyuki, Ito Taku, Kitamura Ken, Noguchi Yoshihiro, Takahashi Masatoki, Honda Keiji, Takeda Takamori, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 144
2. 論文標題 High fluence in laser stapedotomy aggravates transient subjective dizziness	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 118 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2024.2329287	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 Aoki Natsuki, Fujikawa Taro, Umezawa Natsuka, Kawashima Yoshiyuki, Ito Taku, Honda Keiji, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 3-Tesla magnetic resonance imaging reveals vasculitis-caused otitis media in a patient with giant cell arteritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica Case Reports	6. 最初と最後の頁 6~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23772484.2021.1877139	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5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 藤川太郎、川島慶之、伊藤卓、西尾綾子、本田圭司、竹田貴策、丸山絢子、堤剛
2. 発表標題 ANCA関連血管炎性中耳炎の造影MRI所見
3. 学会等名 第33回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shiozaki M, Fujikawa T, Yuzaki M.
2. 発表標題 The Role of MOC-OHC synapse in Age-Related Hearing Loss: Insights from Cbln1 Knockout Mice
3. 学会等名 The 5th JP-UK Neuroscience Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taro Fujikawa
2. 発表標題 Insufficient trans-synaptic complex of delta-type glutamate receptor/cerebellin 1 causes medial olivocochlear synaptopathy and age-related hearing loss
3. 学会等名 NEURO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤川太郎
2. 発表標題 デルタ型受容体欠損による外有毛細胞cochlear synaptopathy 新たな加齢性難聴モデル
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木夏姫、藤川太郎、竹田貴策、伊藤卓、川島慶之、堤剛
2. 発表標題 グルタミン酸受容体デルタ1欠損による進行性難聴の原因は外有毛細胞のcochlear synaptopathyである
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会
4. 発表年 2020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
---------	---------