

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0204

研究課題名（和文）Cochlear synaptopathyに対する新規聴覚再生治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of new regenerative therapy for cochlear synaptopathy

研究代表者

欠畑 誠治（Kakehata, Seiji）

山形大学・医学部・名誉教授

研究者番号：90261619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：音響性や薬剤性、加齢性聴覚障害の初期病変として内毛細胞と蝸牛神経間のシナプス病理、Cochlear Synaptopathyの病態が注目されている。本研究では、laser-induced shock wave(LISW)を用いたCochlear Synaptopathyモデルマウスを作製し、新規内耳再生治療の可能性を検討した。また、Harvard Medical SchoolのAaron Remenschneider氏との国際共同研究として、爆傷障害による新規Cochlear Synaptopathyモデルマウスの作製を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、in vivo実験系でのシナプス障害モデルに対するROCK阻害薬の有効性が示唆された。ROCK阻害薬はすでに承認されている薬剤であるため、応用へのハードルも高くはないと思われ、聴覚障害に対する画期的な治療方法となることが期待できる。さらに、衝撃波管を用いたcochlear synaptopathyモデル作製実験において、PTSのみならず、TTSを示す動物が効率的に作製可能であることが示された。この新たな障害機序のcochlear synaptopathyモデルを使用することで、病態に関する新たな知見や病態に対する治療法開発に繋がることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cochlear synaptopathy, a synaptic pathology between inner hair cells and the cochlear nerve, has been focused as an early lesion in noise-induced, drug-induced, and age-related hearing loss. In this study, we used a mouse model of Cochlear Synaptopathy by laser-induced shock wave (LISW) and investigated the possibility of a novel inner ear regeneration therapy. In addition, as an international collaboration with Aaron Remenschneider at Harvard Medical School, we attempted to generate a novel mouse model of Cochlear Synaptopathy caused by blast injury.

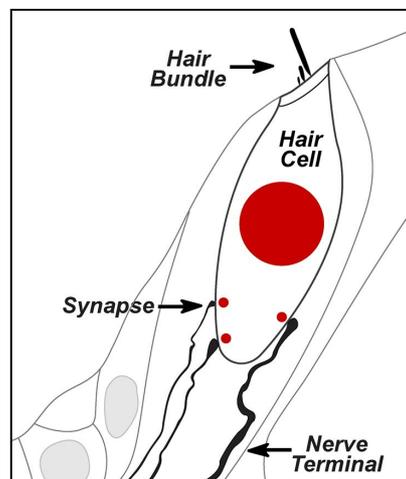
研究分野：耳科学

キーワード：感音難聴 シナプス 蝸牛 有毛細胞 ROCK阻害薬 LISW 聴神経 爆傷

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

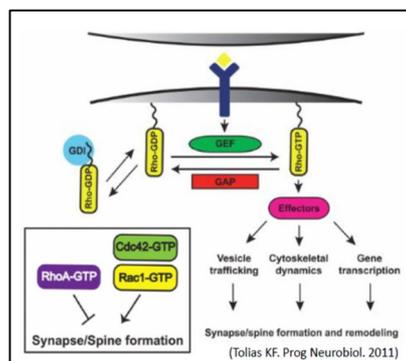
難聴治療の研究は従来、主に内耳の音感覚受容細胞である有毛細胞の障害に着目されて行われてきた。しかし、近年では有毛細胞自体の障害は伴わず、聴神経-有毛細胞間のシナプスの減少により、「言葉の聞き取りづらさ」、「耳鳴」、「音の響き」といった不快な感音難聴の主症状が引き起こされることが2009年に米国 Harvard Medical School の Eaton-Peabody 研究所より報告された(Kujawa SG et al., J Neurosci. 2009)。この病態は Cochlear synaptopathy と命名され様々な研究がこの10年で行われた結果、これまでの内耳障害に対する理解に変化が生じた。すなわち、従来主な研究ターゲットであった有毛細胞よりも、有毛細胞とシナプス形成している聴神経(ラセン神経節)に障害が現れることが、一過性の音響外傷(Kujawa SG et al. J Neurosci. 2009) や加齢性難聴の初期(Sergeyenko Y et al. J Neurosci. 2013) といった感音難聴の多くを占める比較的軽度の内耳障害で確認された。これによって有毛細胞とシナプス形成している聴神経が、難聴治療の最も重要性の高いターゲットであることを意味する。



有毛細胞-聴神経間シナプス  
(hearingreview.com の liberman らの記事より引用)

### 2. 研究の目的

中枢神経系の基礎研究から、ROCK 阻害薬には、障害された神経線維に対しての伸長やシナプス形成を促進する作用があることが報告されている。正常な聴神経に対しても軸索伸長促進効果の報告があり(Lie M et al. Neuroscience. 2010)、障害された聴神経に対してもその作用を発揮する可能性が十分に考えられる。先行研究として in vitro の蝸牛器培養系を用いたグルタミン酸アゴニストによる聴神経障害モデルの作製および、この聴神経障害モデルに対する ROCK 阻害薬の効果の検討を行った。聴神経障害モデルと比較して、聴神経障害後に ROCK 阻害薬を作用させることで、有毛細胞-聴神経間シナプスの再形成が起こっている可能性が示唆された(Koizumi Y et al. Front Cell Neurosci. 2020)。この結果から、in vivo の cochlear synaptopathy モデルにおいても ROCK 阻害薬がシナプス再形成に有利に働く可能性は十分に考えられる。また、ROCK 阻害薬はすでに緑内障や脳血管攣縮において保険適応薬剤として臨床応用されている薬剤であるため、応用へのハードルも高くはないと思われ、聴覚障害に対する画期的な治療方法となることが期待できる。



中枢神経系での Rho-ROCK 経路のシナプスに対する作用

### 3. 研究の方法

実験動物として生後6週のマウス(CBA/J)を用いた。マウスに対するすべての処置は、筋肉注射(ケタミン 75 mg/kg、メドミジン 1 mg/kg)による全身麻酔下で行った。

#### 障害モデル作製

本研究では cochlear synaptopathy モデルを作製するために2種類の障害方法について検討した。1つ目は国内共同研究先である防衛医科大学で施行された。Niwa らの方法(Sci Rep. 2016)を参考として laser-Induce shock wave (LISW)による cochlear synaptopathy モデルを作製した。本研究では実験動物としてマウスを使用したため、衝撃波の強度は 2.00 J/cm<sup>2</sup> とした。2つ目は海外共同研究先である米国 Harvard Medical School の Eaton-Peabody 研究所で施行された。Hickman らの方法(Sci Rep. 2018)を参考として、衝撃波管を用いて cochlear synaptopathy モデル作製のための条件検索を行った。

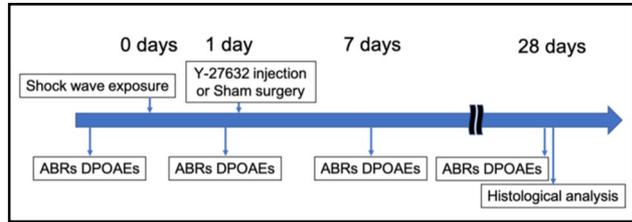
#### cochlear synaptopathy モデルに対する ROCK 阻害薬の効果についての検討

ROCK 阻害薬の効果の検討を行うにあたり、LISW により作製した cochlear synaptopathy モデルを使用した。cochlear synaptopathy モデルに対する ROCK 阻害薬の影響について、以下の3群の条件を設定し比較検討した。PBS群(shamコントロール)、ROCK 阻害薬(1 mM)群、ROCK 阻害薬(10 mM)群。薬剤投与は耳後部切開による中耳経由での局所投与により行った。ROCK 阻害薬は Y-27632 (和光)を使用した。

## 蝸牛機能検査

LISW 曝露前、1 日後、7 日後、28 日後に各動物の ABR および DPOAE を計測した。対数間隔の 6 つの周波数 (5.6 - 32.0 kHz の半オクターブステップ) で、音圧レベルは 10 dB から 80 dB SPL まで 5 dB ステップとした。

図 1 実験スケジュール



## 免疫組織化学

LISW 曝露 28 日後に各動物の蝸牛を採取した。4%PFA/PB で 4 一晩固定し、その後 EDTA で 4 4 日間脱灰した。ホルマウント標本を作製し、0.3%Triton X/5%NHS/PBS で室温 1 時間処理した。0.3% Triton X で希釈した一次抗体で 37 一晩インキュベートした。使用した一次抗体は聴神経マーカーとして Chicken anti-NF 200 (1:500, Millipore: AB5539)、有毛細胞マーカーとして rabbit anti-Myo7a (1:500, Proteus Biosciences Inc : 25-6790)、前シナプスマーカーとして mouse (IgG1) anti-CtBP2 (1: 500 BD Biosciences: 612,044)、後シナプスマーカーとして mouse (IgG2a) anti-GluA2 (1 : 2000 Millipore: MAB397)を使用した。PBS で洗浄後、2 次抗体として 500 倍希釈した Alexa Fluor 350-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen: A21068), Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen: A21131), Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen: A11034), Alexa 568-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Invitrogen: A21124), Alexa 647-conjugated goat anti-chicken IgY (Invitrogen: A21449) を用いて室温で 2 時間反応させた。

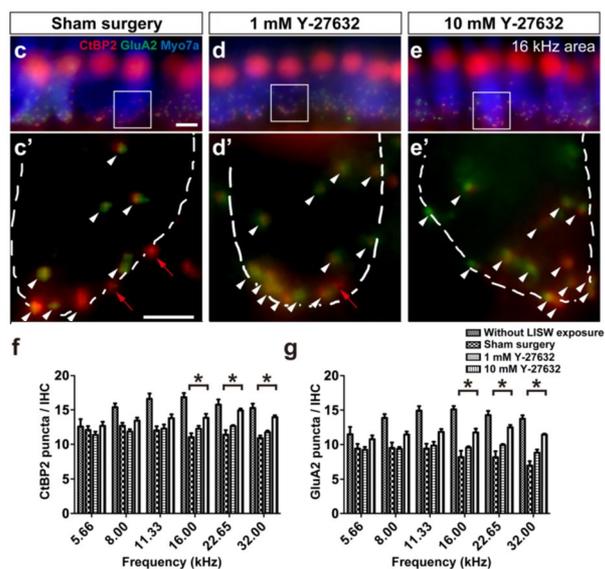
## 蛍光観察

BZ-X700 蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて観察を行った。解析には Z-series での撮影を行った。シナプス数は最大値映法での解析を行った。画像解析ソフト imageJ を用いて、Myo7a 陽性内有毛細胞上での CtBP2 および PSD95 陽性シグナルの数を計測し、1 内有毛細胞あたりのシグナルの数を算出した。統計学的解析には、Kruskal-Wallis 法による一元配置分散分析および Dann-Bonferroni 法による多重比較検定を行った。

## 4. 研究成果

LISW 曝露により障害されたシナプスに対する Y-27632 の効果  
Y-27632 の局所投与から 1 ヶ月後、聴神経-有毛細胞シナプスへの影響を確認する目的で、CtBP2 および GluA2 で標識された内有毛細胞シナプスを測定した。PBS 群における CtBP2、GluA2 陽性シグナルは、5.6 kHz を除くすべての周波数において、対照群 (LISW 曝露なし、薬剤投与なし) よりも有意に少なかった (図 2c, c', g)。ROCK 阻害薬 (1 mM) 群では、CtBP2、GluA2 陽性シグナルの増加傾向が観察された (図 2d, d', g)。ROCK 阻害薬 (10 mM) 群では、高周波領域 (16.0 - 32.0 kHz) での CtBP2、GluA2 陽性シグナルの有意な増加が確認された。これらの結果から、Y-27632 は LISW による蝸牛シナプス障害の改善に対して用量依存的な効果を持つことが示唆された。

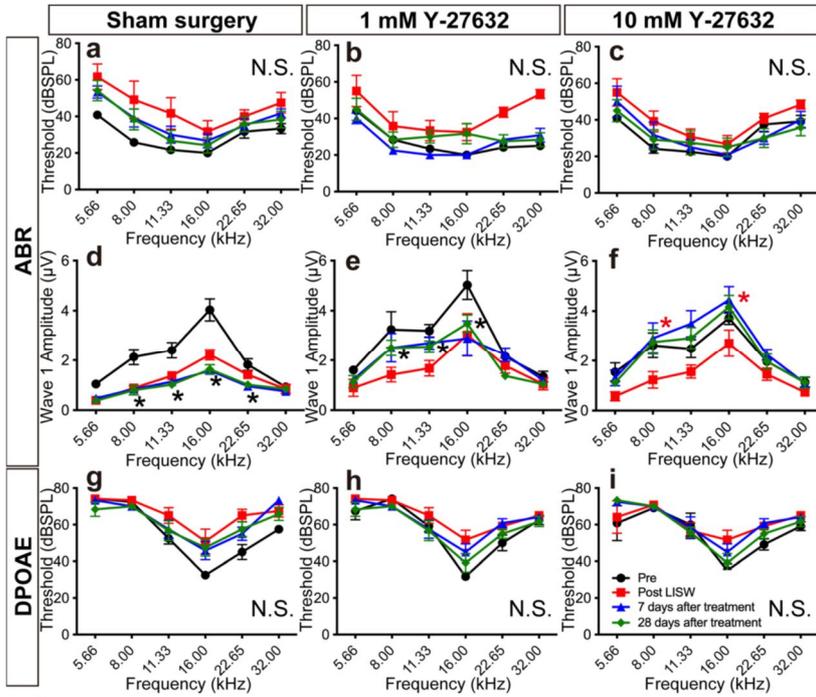
図 2 ROCK 阻害薬の蝸牛シナプス障害への影響



## LISW 曝露後の聴覚機能障害に対する Y-27632 の効果

LISW および ROCK 阻害剤 Y-27632 の投与前後のいくつかの時点で ABR と DPOAE を計測した (図 3)。PBS 群では、LISW 曝露 1 日後に ABR と DPOAE の閾値が一時的に上昇したが、7 日後には閾値が回復し (一過性閾値上昇: TTS)、すべての周波数で有意差はみられなかった (図 3a, g)。一方で、ABR 第 I 波振幅は LISW 曝露 1 日後から減少し、LISW 曝露 28 日後まで回復せず、8.00 kHz から 22.65 kHz までの周波数で有意差が認められた (図 3d)。ROCK 阻害薬 (1 mM) 群でも PBS 群と同様に TTS を示した (図 3b, h)。28 日後の ABR 第 I 波振幅は、22.65 kHz のみ LISW 曝露前と有意差がみられなかった (図 3e)。ROCK 阻害薬 (10 mM) 群では投与 7 日後より ABR 第 I 波振幅の改善がみられ、28 日後の 8.00 kHz および 16.00 kHz では、LISW 曝露 1 日後と比較し有意な改善を示した (図 3f)。これらの結果から、Y-27632 は蝸牛シナプス障害における聴覚機能の改善に対して用量依存的な効果を持つことが示唆された。

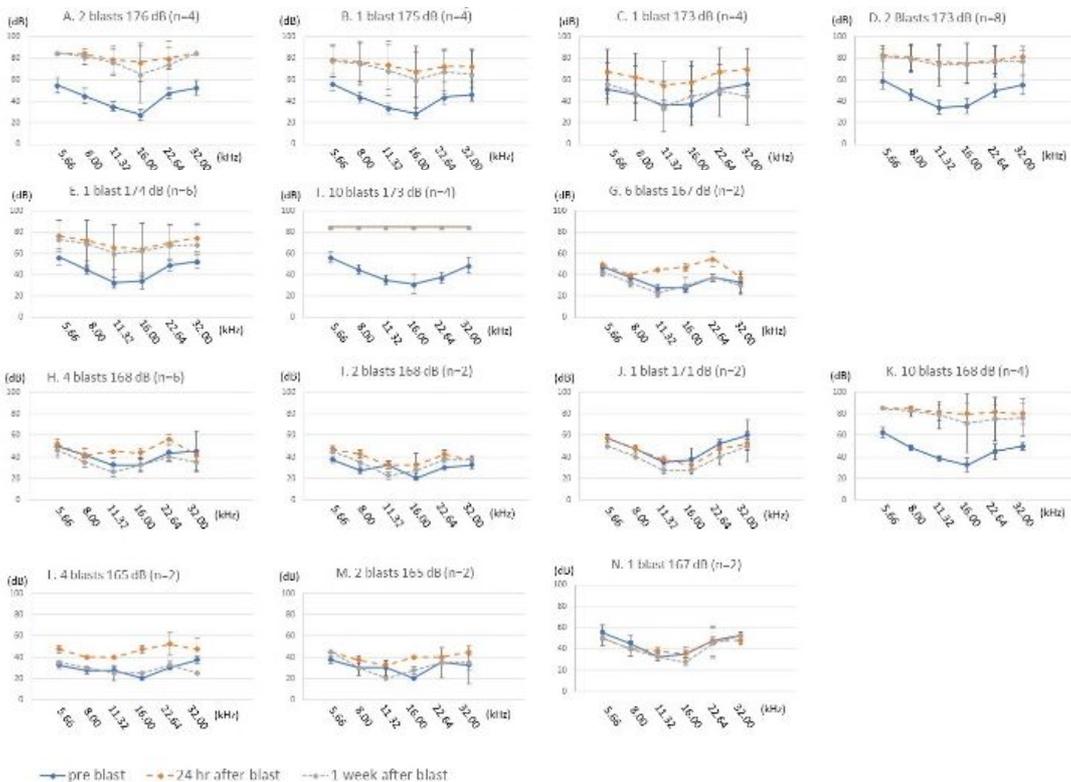
図3 ROCK 阻害薬の蝸牛シナプス障害における聴覚機能への影響



衝撃波管を用いた cochlear synaptopathy モデル作製の試み

衝撃波管による爆風暴露の前、1日後と1週間後に ABR と DPOAE を行い、閾値変化について確認した。衝撃波管の衝撃強度は SPL で示した。176 dB2 回、175 dB1 回、173 dB2 回、174 dB1 回、173 dB10 回、168 dB10 回の条件下で、動物は PTS を示した (図 4 A、B、D、E、F、K)。一方、173 dB1 回、167 dB6 回、168 dB4 回、165 dB4 回、165 dB2 回の条件では、TTS を示した動物が観察された (図 4.C、G、H、L、M)。高音圧の条件では多くの動物で重度の難聴を引き起こしたことから、このシステムが重度の感音難聴を効率的に誘発できる可能性が示唆された。一方で、比較的低音圧の条件では、1 回の曝露では閾値シフト自体が生じなかったものの、複数回の曝露では効率的に TTS が誘導されることが示唆された。

図4 衝撃波管による爆風曝露後の ABR 閾値変化



—●— pre blast    - - - ■ - - - 24 hr after blast    ····· ▲ ····· 1 week after blast

本国際共同研究の目的は、根本的な治療法の存在しない感音難聴に対する病態に基づく新しい治療法を開発し、臨床試験を行うための橋渡し研究を、日米双方の経験と知識さらには環境を最大限活用して行うことである。本研究の結果、in vivo 実験系でのシナプス障害モデルに対する ROCK 阻害薬の有効性が示唆された。ROCK 阻害薬はすでに承認されている薬剤であるため、応用へのハードルも高くはないと思われ、聴覚障害に対する画期的な治療方法となることが期待できる。さらに、衝撃波管を用いた cochlear synaptopathy モデル作製実験において、PTS のみならず、TTS を示す動物が効率的に作製可能であることが示された。現在は引き続き、これらの動物についての組織学的検討を行っている。この新たな障害機序の cochlear synaptopathy モデルを使用することで、病態に関する新たな知見や病態に対する治療法開発に繋がることを期待できる。本モデルに対する ROCK 阻害薬の治療効果についても現在検討を進めている。

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 Koizumi Yutaka, Mizutari Kunio, Kawauchi Satoko, Sato Shunichi, Shiotani Akihiro, Kakehata Seiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Y-27632, a ROCK inhibitor, improved laser-induced shock wave (LISW)-induced cochlear synaptopathy in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00819-1	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 Koizumi Yutaka, Ito Tsukasa, Mizutari Kunio, Kakehata Seiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Regenerative Effect of a ROCK Inhibitor, Y-27632, on Excitotoxic Trauma in an Organotypic Culture of the Cochlea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	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） 10.3389/fncel.2020.572434	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13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yutaka Koizumi, Aaron K Remenschneider, Jeffrey Tao Cheng, Christopher J Smalt, Kunio Mizutari, Seiji Kakehata
2. 発表標題 Evaluation of auditory damage after blast exposure in mice.
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 46th Annual MidWinter Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野 彰子, 新川 智佳子, 伊藤 吏, 千葉 寛之, 阿部 希望, 小泉 優, 松井 祐興, 後藤 崇成, 欠畑 誠治
2. 発表標題 聞き取り困難症例に対する新たな診断法開発の試み Hidden Hearing Lossの診断法についての検討
3. 学会等名 日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新川 智佳子, 天野 彰子, 伊藤 史, 千葉 寛之, 阿部 希望, 小泉 優, 後藤 崇成, 欠畑 誠治
2. 発表標題 聞き取り困難症例に対する新たな診断法開発の試み 聴覚情報処理検査と67-S語表による雑音下語音聴力検査
3. 学会等名 日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田 小百合, 伊藤 史, 小泉 優, 天野 彰子, 新川 智佳子, 欠畑 誠治
2. 発表標題 TEESを用いてレチノイド局所投与治療を行った再生中耳粘膜の機能評価
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小泉 優, 伊藤 史, 窪田俊憲, 松井祐興, 新川智佳子, 寺田小百合, 天野彰子, 欠畑誠治
2. 発表標題 Cochlear synaptopathy をターゲットとした治療法開発への試み ~当科での内耳基礎研究について~
3. 学会等名 第6回耳鳴・難聴研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田小百合, 伊藤 史, 新川智佳子, 小泉 優, 天野彰子, 松井祐興, 窪田俊憲, 欠畑誠治
2. 発表標題 実験動物モデルにおける ABR を用いた伝音難聴と感音難聴の鑑別について
3. 学会等名 第1回 ERA・ERP 研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小泉 優
2. 発表標題 Cochlear synaptopathyをターゲットとした治療法開発への試み in vitro聴神経障害モデルを用いた検討
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 寺田 小百合, 伊藤 史, 小泉 優, 天野 彰子, 新川 智佳子, 欠畑 誠治
2. 発表標題 レンチノイドを用いた中耳粘膜上皮の創傷治癒効果について
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 小泉 優, 水足 邦雄, 伊藤 史, 塩谷 彰浩, 欠畑 誠治
2. 発表標題 Laser-induced shock waveによるcochlear synaptopathyモデルに対するROCK阻害薬の効果の検討
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 Seiji Kakehata
2. 発表標題 Regenerative effects of a ROCK inhibitor, Y-27632, on facial nerve function and afferent cochlear synapses
3. 学会等名 Korean Otological Society Annual Spring Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野彰子, 杉山元康, 伊藤史, 古川孝俊, 後藤崇成, 新川智佳子, 小泉優, 寺田小百合, 欠畑誠治
2. 発表標題 動物モデルを用いたROCK 阻害薬による顔面神経麻痺治療の基礎的研究
3. 学会等名 第71回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会東北地方部会連合学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野 彰子, 杉山 元康, 伊藤 史, 古川 孝俊, 後藤 崇成, 新川 智佳子, 小泉 優, 寺田 小百合, 欠畑 誠治
2. 発表標題 動物モデルを用いたリバスジルによる顔面神経麻痺治療の基礎的研究
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yutaka Koizumi, Aaron Remenschneider, Jeffrey Cheng, Christopher J. Smal, Kunio Mizutari, Seiji Kakehata
2. 発表標題 Evaluation of the Effects of Rock Inhibitors on Auditory Damage Model Caused by Blast Exposure in CBA/J.
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 47th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024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	水足 邦雄  (Kunio Mizutari)  (40338140)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院耳鼻咽喉科科・講師)   (82406)	

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	小泉 優  (Yutaka Koizumi)  (80723585)	山形大学・医学部・医員    (11501)	

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