

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462572

研究課題名(和文) 蝸牛有毛細胞・らせん神経節細胞の遅発性脱落メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of delayed degeneration of hair cells and spiral ganglion cell

研究代表者

水足 邦雄 (Mizutari, Kunio)

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・病院 耳鼻咽喉科科  
・講師)

研究者番号：40338140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて3-nitropropionic acid(3-NP)による急性内耳エネルギー不全モデルを作成し、蝸牛内電位の低下が蝸牛有毛細胞、らせん神経節細胞に与える影響を検討した。3-NP投与によりマウス聴性脳幹誘発反応(ABR)閾値上昇が認められ、蝸牛内電位(endocochlear potential)を測定したところ、3-NP投与によって低下していることが明らかとなった。3-NP投与後2週間を超えると徐々に内有毛細胞、外有毛細胞およびらせん神経節細胞に細胞脱落が生じ、投与後3ヶ月となると高度の脱落が生じ、高音域の難聴を固定化させる要因となっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we analyzed the effect of low endocochlear potential on the survival of hair cells and spiral ganglion cells. First, we successfully made a mouse model of acute mitochondrial dysfunction used by 3-nitropropionic acid (3-NP). This mouse model had severe hearing loss measured by auditory brainstem response (ABR), which was caused by decrease of endocochlear potential. The gradient loss of hair cells and spiral ganglion cells was observed 2 weeks after 3-NP treatment, following severe degeneration of these cells, which causes permanent hearing impairment, was occurred. This degenerative changes were progressive, and progressed from the basal turn toward apex of the cochlea after 3-NP treatment.

研究分野：神経耳科学

キーワード：有毛細胞 らせん神経節 遅発性細胞脱落 内耳エネルギー不全 蝸牛内電位

## 1. 研究開始当初の背景

蝸牛外側壁に存在する線維細胞は、ATPを利用した能動的なカリウムイオンのリサイクリングによって、感覚受容細胞である有毛細胞の脱分極に不可欠な蝸牛内リンパ液の高カリウム濃度を作り出し、蝸牛内電位を維持している(Delprat et al., Mol. Cell. Biol. 25, 847-853. Minowa et al., Science 285, 1408-1411)。そのため虚血や低酸素血症などのATP産生が減少するような病態では、この能動的イオン輸送に障害が生じる事が推測される。これまで、我々の研究グループではミトコンドリアの電子伝達系の不可逆的阻害剤である3-nitropropionic acid(3-NP)を内耳に局所投与することによって、内耳に局限するエネルギー不全を生じるモデル動物を作製し、その病態の解明と治療法の検討を行ってきた。その結果、内耳局所的なミトコンドリア機能阻害により高度の聴性脳幹誘発反応(ABR)閾値上昇が認められ(Hoya et al. Neuroreport, 2004)、その原因が主に蝸牛外側壁線維細胞に特異的に生じるアポトーシスによるものであることを報告した(Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007)。一方、振動である音を電気信号に変換し、さらに脳へと伝達する有毛細胞およびらせん神経節については、3-NP投与直後にはアポトーシスを認めないが、(Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007) 投与後2週間を超えると徐々に細胞脱落が生じ、投与後2ヶ月となると、基底回転の内毛細胞、外毛細胞およびらせん神経節細胞の高度の脱落が生じ、高音域の難聴を固定化させる要因となっていることを、我々のグループは明らかにした(Mizutari et al. Brain Res, 2011)。このような遅発性有毛細胞障害およびらせん神経節障害は、非常に軽微なモデルがこれまでもアミノ配糖体投与や音響外傷モデルでも報告されてはいる

が、我々のモデルの様に高度の有毛細胞・らせん神経節脱落が経時的に観察できるモデルはこれまで報告されていない。二次的な有毛細胞・らせん神経節の脱落が生じると難聴は永続性となり、また高度の語音弁別能低下や補聴器装用効果の低下をもたらすため、治療法および予防法の確立が急がれる病態である。そこで本研究では、永続性の感音難聴の原因となる遅発性有毛細胞・らせん神経節脱落の発生メカニズムを明らかにし、病態に基づいた治療法および予防法を確立することを目標とする。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアの電子伝達系の不可逆的阻害剤である3-nitropropionic acid(3-NP)を内耳に局所投与し作成した急性内耳エネルギー不全モデルを用いて、蝸牛内電位の低下が内耳有毛細胞およびらせん神経節細胞に与える影響を明らかにすることを目的とする。本研究によって、これまで病態が判明していなかった蝸牛有毛細胞およびらせん神経節細胞の二次的脱落の機序および予防法が明らかとなり、原因不明である急性感音難聴の病態理解、特に外側壁線維細胞の障害後の動態について新たな知見をもたらし、突発性難聴や加齢性難聴等の新規治療法の開発に大きく寄与すると思われる。

## 3. 研究の方法

CBA/CaJ マウスを用いて3-nitropropionic acid(3-NP)による急性内耳エネルギー不全モデルを作成する。経時的に組織学的・免疫組織学的手法を用いて経時的に有毛細胞、らせん神経節細胞脱落の定量的に評価を行い、さらに細胞死の定量評価とシナプスの詳細な観察を行うことにより遅発性細胞脱落の機序を解明する。まず、従来我々の施設でS-Dラットを使用して作成していた3-nitropropionic acid(3-NP)による急性内耳

エネルギー不全モデルを CBA/CaJ マウスを用いて作成する。方法はこれまでの報告と同様(Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007, Hoya et al. Neuroreport, 2004)、全身麻酔下に耳後部切開をおき、中耳骨胞を露出する。続いて中耳骨胞にマイクロドリルで小開窓を行い手術顕微鏡下に正円窓窩を明視下に置く。500mM の 3-NP を正円窓窩にマイクロポンプと微小チューブを用いて局所投与する。3-NP 投与後、正円窓窩からの薬液脱落を防ぐため、正円窓窩にコラーゲンスポンジを留置し閉創する。この 500mM という 3-NP の濃度は、投与後翌日には全周波数においてスケールアウトレベルの ABR 域値上昇が見られるが、投与後 2 ヶ月で低音域・中音域において中程度の ABR 閾値改善と、進行性の有毛細胞・らせん神経節細胞脱落の見られる濃度である (Mizutari et al. Brain Res, 2011)。3-NP の投与量はラットにおいては 3 $\mu$ l であったが、本研究ではマウスの正円窓窩の体積とほぼ同様の 1 $\mu$ l とする。その後経時的に聴性脳幹誘発反応 (ABR) を全身麻酔下に行い、これまでのラットを用いたモデルと同様の ABR 閾値変化を生じるか確認する。マウスにおいて 3-NP 投与後 ABR 閾値上昇が認められれば、まず光学顕微鏡下にコルチ器有毛細胞とらせん神経節の観察を経時的 (投与前・投与直後・投与 1 日後・3 日後・1 週間後・2 週間後・1 ヶ月後・2 ヶ月後) に行う。より詳細な組織所見を得るため、グルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒドの混合液による全身灌流固定を行い、内耳を摘出・脱灰後、オスミウムにて後固定を行い Epon812 によりプラスチック包埋薄切切片を作成し、トルイジンブルーによる染色で評価を行う。また、同時に超薄切切片を作成し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛による二重染色により透過型電子顕微鏡を用いてコルチ器、らせん神経節のさらに詳細な微

小組織変化の観察を行う。特に内有毛細胞底部の ribbon synapse の観察は透過型電子顕微鏡を用いて、定量評価を行う。続いて各組織の免疫組織学的解析を行うため、4% パラホルムアルデヒドにて全身灌流固定を行った蝸牛を 3-NP 投与後経時的 (投与前・投与直後・投与 1 日後・3 日後・1 週間後・2 週間後・1 ヶ月後・2 ヶ月後) に採取する。有毛細胞観察のために、EDTA で 1 週間脱灰した後、実体顕微鏡下にコルチ器の micro-dissection を行い、surface preparation 法にて有毛細胞数の部位別のカウントを行う (Mizutari et al. Neuron, 2013)。本法を用いることにより、脱落した蝸牛有毛の担当周波数を Image J の pulg-in software (Mass. Eye and Ear Infirmary, Boston, USA) により正確に計測することが可能である (Mizutari et al. Neuron, 2013)。

前年度に定量評価した有毛細胞・らせん神経節細胞の脱落を、細胞死の観点より新たに定量を行う。まずは経時的なアポトーシスの定量評価を行うため、凍結切片を用いた Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) Assay を有毛細胞、らせん神経節細胞に対して行う。コルチ器に対する標本は 4%パラホルムアルデヒドにて全身灌流固定を行った蝸牛を 3-NP 投与後経時的 (投与前・投与直後・投与 1 日後・3 日後・1 週間後・2 週間後・1 ヶ月後・2 ヶ月後) に採取する。有毛細胞観察のために、EDTA で 1 週間脱灰した後、実体顕微鏡下にコルチ器の micro-dissection を行い、前述の surface preparation 法にて有毛細胞におけるアポトーシスを生じた細胞数を周波数部位別に正確にカウントする。さらに、有毛細胞から発生したシグナルをらせん神経節へ伝える ribbon synapse の変性がらせん神経節の遅発性脱落に関与する可能性が報告されている (Stankovic et al., J. Neurosci. 2004)。

そこで、ribbon synapse を surface preparation 法にて有毛細胞と同一の視野にて描出し、その数を 3-NP 投与後経時的に観察する。Ribbon synapse は CtBP2 による免疫染色により描出可能であり (Kujawa et al., J. Neurosci. 2009)、この原法に基づき ribbon synapse および pre-synaptic vesicle を vGlut3 にて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて定量を経時的に行う。一方、らせん神経節細胞については、有毛細胞と同時期に同固定法にて採取した蝸牛から凍結切片を作成し、切片に対する TUNEL 染色を行うことにより各回転別にアポトーシス陽性のらせん神経節細胞数を正確にカウントし、担当周波数を推測する (Mizutari et al. Brain Res, 2011)。

#### 4. 研究成果

まず、従来我々の施設でS-Dラットを使用して作成していた3-nitropropionic acid(3-NP)による急性内耳エネルギー不全モデルをCBA/CaJマウスを用いて作成した。方法はこれまでの報告と同様(Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007, Hoya et al. Neuroreport, 2004)、全身麻酔下に耳後部切開をおき、中耳骨胞を露出。中耳骨胞にマイクロドリルで小開窓を行い手術顕微鏡下に正円窓窩を明視下に置く。500mMの3-NPを正円窓窩にマイクロポンプと微小チューブを用いて局所投与した。その結果マウスにおいてラットにおいて観察された3-NP投与後のABR閾値上昇が同様に認められた。さらに組織学的な検討を行ったところ、内耳局所的なミトコンドリア機能障害により高度の聴性脳幹誘発反応(ABR)閾値上昇が認められ(Hoya et al. Neuroreport, 2004)、その原因が蝸牛外側壁線維細胞に特異的に生じるアポトーシスによるものであることを光学顕微鏡下に確認した。この3-NPモデルマウスを3-NP投与後2ヶ月まで経過観察

すると、低音域から中音域までのABR閾値に有意な改善が認められた。組織学的には外側壁線維細胞、特にI型、IV型において細胞分裂を伴う自発的な再生が認められ、再生した線維細胞は能動的イオンリサイクリングの主体を担うNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase -1を発現していることが明らかとなった。これらの結果より、従来ラットで用いていた急性内耳エネルギー不全モデルが、マウスでも使用可能となった。さらに、蝸牛内電位(endocochlear potential)を測定したところ、3-NP投与によって低下した電位が改善していることが明らかとなった。以上により、自発的な蝸牛外側壁線維細胞の再生は蝸牛内電位の回復により聴力の改善を来していることが明らかとなった。

続いて、内耳有毛細胞およびらせん神経節細胞の組織学的検討をプラスチック(Epon812)包埋による薄切切片を用いた内毛細胞、外毛細胞、およびらせん神経節の微細構造の観察を光学顕微鏡にて行った。その結果、3-NP投与後2週間を超えると徐々に細胞脱落が生じ、投与後3ヶ月となると、基底回転の内毛細胞、外毛細胞およびらせん神経節細胞の高度の脱落が生じ、高音域の難聴を固定化させる要因となっていることが明らかとなった。これらの細胞脱落は、時間経過とともに徐々に進行し、最終的には基底回転から徐々に頂回転へと進行する事も明らかとなった。また免疫組織学的手法を用いて経時的に有毛細胞、らせん神経節細胞脱落の定量的に評価を行った。その結果投与2週間後ではどちらの細胞も10%程度の細胞脱落を認めるのみであったが、投与後3ヶ月では約90%の細胞脱落が認められることが明らかとなった。また有毛細胞の脱落が3-NP投与直後に起こり、らせん神経節は2次的に脱落していることが明らかとなった。有毛細胞の脱落と共にシナプスの脱落も生じており、末梢からの

入力低下がらせん神経節脱落を促すことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Takeda H, Kurioka T, Kaitsuka T, Tomizawa K, Mizutari K, Hakim F, et al. Protein transduction therapy into cochleae via the round window niche in guinea pigs. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*. 2016;3:16055.

2. Niwa K, Mizutari K, Matsui T, Kurioka T, Matsunobu T, Kawauchi S, et al. Pathophysiology of the inner ear after blast injury caused by laser-induced shock wave. *Sci Rep*. 2016;6:31754.

3. Michikawa T, Nakamura T, Imamura H, Mizutari K, Saito H, Takebayashi T, et al. Markers of Overall Nutritional Status and Incident Hearing Impairment in Community-Dwelling Older Japanese: The Kurabuchi Study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2016;64(7):1480-5.

4. Kurioka T, Mizutari K, Niwa K, Fukumori T, Inoue M, Hasegawa M, et al. Hyaluronic acid pretreatment for Sendai virus-mediated cochlear gene transfer. *Gene Ther*. 2016;23(2):187-95.

5. Kitao K, Mizutari K, Nakagawa S, Matsunaga T, Fukuda S, Fujii M. Recovery of endocochlear potential after severe damage to lateral wall fibrocytes following acute cochlear energy failure. *Neuroreport*. 2016;27(15):1159-66.

6. Honkura Y, Matsuo H, Murakami S, Sakiyama M, Mizutari K, Shiotani A, et al. NRF2 Is a Key Target for Prevention of Noise-Induced Hearing Loss by Reducing Oxidative Damage of Cochlea. *Sci Rep*. 2016;6:19329.

7. Tamura A, Matsunobu T, Mizutari K, Niwa K, Kurioka T, Kawauchi S, et al. Low-level laser therapy for prevention of noise-induced hearing loss in rats. *Neuroscience letters*. 2015;595:81-6.

8. Mizutari K, Mutai H, Namba K, Miyanaga Y, Nakano A, Arimoto Y, et al. High prevalence of CDH23 mutations in patients with congenital high-frequency

sporadic or recessively inherited hearing loss. *Orphanet journal of rare diseases*. 2015;10(1):60.

9. Watanabe T, Shimizu T, Takahashi M, Sato K, Ohno M, Fuchimoto Y, Mizutari K et al. Cricopharyngeal achalasia treated with myectomy and post-operative high-resolution manometry. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2014;78(7):1182-5.

10. Mizutari K. Spontaneous recovery of cochlear fibrocytes after severe degeneration caused by acute energy failure. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:198.

11. Michikawa T, Mizutari K, Saito H, Takebayashi T, Nishiwaki Y. Glycosylated hemoglobin level is associated with hearing impairment in older Japanese: the Kurabuchi Study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2014;62(7):1231-7.

〔学会発表〕(計 9 件)

2015.4.19

Kunio Mizutari

Endoscopic Tympanoplasty, The initial difficulties.

1st World Congress on Endoscopic Ear Surgery, Dubai, UAE,

2015.7.2

Kunio Mizutari, Katsuki Niwa, Takaomi Kurioka, and Akihiro Shiotani

Advantage of Endoscopic Surgery for Adhesive Otitis Media

30th Politzer Society Meeting, Niigata, Japan,

2015.9.14

Takaomi Kurioka, Kunio Mizutari, Katsuki Niwa, Makoto Inoue, Yasuji Ueda, and Akihiro Shiotani

Hyaluronic acid pretreatment for sendai virus-mediated cochlear gene transfer

52<sup>nd</sup> Inner Ear Biology Workshop, Rome, Italy

平成 27 年 5 月 21 日

第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会（東京）

原因不明の高音部障害を認める先天性難聴における CDH23 遺伝子変異の頻度

水足邦雄, 務台英樹, 仲野敦子, 有本友季子, 増田佐知子, 守本倫子, 阪本浩一, 加我君孝, 松永達雄

平成 27 年 10 月 23 日

第 60 回日本聴覚医学会総会・学術講演会（東京）

ヒアルロン酸を用いたセンダイウイルスベクターによる内耳遺伝子導入

水足邦雄, 栗岡隆臣 丹羽克樹, 福森崇之, 塩谷彰浩

14<sup>th</sup> Meeting of the International Otopathology Society (June 13, 2016, Boston, USA)

Cochlear histopathology on a blast injury rat model induced by laser-induced shock waves

Kunio Mizutari, Katsuki Niwa, Shunichi Sato, Yasushi Satoh, Yasushi Kobayashi, Akihiro Shiotani

53<sup>rd</sup> Inner Ear Biology Workshop (Sep 19, 2016, Montpellier, France)

Recovery of endocochlear potential after severe damage to lateral wall fibrocytes following acute cochlear energy failure  
Kunio Mizutari, Kyoko Kitao, Susumu Nakagawa, Tatsuo Matsunaga, Satoshi Fukuda, Masato Fujii

第 117 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会（平成 28 年 5 月 19 日、名古屋市）

NRF2 活性化による強大音曝露に伴う酸化ストレスからの内耳保護効果（2）-50 歳聴力への影響-

水足邦雄 本蔵陽平 川瀬哲明 香取幸夫  
塩谷彰浩

第 61 回日本聴覚学会総会・学術講演会（平成 28 年 10 月 21 日、盛岡市）

爆傷による感音難聴と耳鳴の病態生理学的検討

水足邦雄 丹羽克樹 栗岡隆臣 塩谷彰浩

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.ndmc.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
水足 邦雄 (MIZUTARI, Kunio)  
防衛医科大学校・病院 耳鼻咽喉科・講師  
研究者番号：40338140

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：