

令和 4 年 4 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23826

研究課題名（和文）内耳有毛細胞の生体イメージング

研究課題名（英文）Intravital imaging of hair cells

研究代表者

清水 康太郎（Shimizu, Kotaro）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60846492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、音響外傷や薬剤性難聴の機序を明らかにするために、内耳生体イメージングを試みた。有毛細胞にGFPを発現するAtoh1-GFPマウスとらせん神経節細胞および蝸牛神経にCFPを発現するThy1-CFPマウスを交配させ、有毛細胞および蝸牛神経、らせん神経節細胞に蛍光タンパク質を発現するマウスを作成した。続いてイソフルランで全身麻酔下に気管切開術を行って人工呼吸器で呼吸管理し、下顎骨切除を行って内耳骨包を露出した。二光子励起顕微鏡下に内耳生体イメージングを行える実験系の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤性難聴は耳毒性薬物により内耳有毛細胞が変性、細胞死することで感音難聴を引き起こす疾患である。その中でもアミノグリコシド系抗生物質はその広い抗菌スペクトラムから感染症治療で有用な薬剤だが、感音性難聴という有害事象はアミノグリコシド系抗生物質の扱いを困難にする原因の一つとなっている。内耳有毛細胞の細胞死のメカニズムは解明されていないため、アミノグリコシド系抗生物質による薬剤性難聴の機序を明らかにすることは感染症治療の一助になるだけでなく、内耳有毛細胞障害の機序を明らかにする足がかりとなり、更には感音難聴治療へと繋がる可能性があり、臨床的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to elucidate the mechanisms of acoustic trauma and drug-induced hearing loss by inner ear intravital imaging. Atoh1-GFP mice expressing GFP in hair cells were crossed with Thy1-CFP mice expressing CFP in spiral ganglion cells and cochlear nerve to create mice expressing fluorescent proteins in hair cells, cochlear nerve and spiral ganglion cells. Then a tracheotomy was performed under general anesthesia with isoflurane and respiratory control with a ventilator, and a mandibular resection was performed to expose the otic capsule. An experimental system was established to allow inner ear intravital imaging under two-photon excitation microscopy.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：生体イメージング 有毛細胞 内耳

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は世界で3億6千万人以上の患者が存在する疾患で、内耳有毛細胞の障害により不可逆的な難聴を引き起こし生活の質を著しく低下させる。一度障害された有毛細胞を再生させる治療手段は存在せず、その細胞障害機序の詳細も不明である。

その中でも薬剤性難聴は耳毒性薬物により内耳有毛細胞が変性、細胞死することで感音難聴を引き起こす疾患である。原因薬剤は治療する疾患により抗生剤、ループ利尿薬、非ステロイド性消炎鎮痛剤、抗がん剤など多岐にわたる。特にアミノグリコシド系抗生物質はその広い抗菌スペクトラムから感染症治療で有用な薬剤だが、感音性難聴という有害事象はアミノグリコシド系抗生物質の扱いを困難にする原因の一つとなっている。

内耳有毛細胞の細胞死のメカニズムは解明されていないため、アミノグリコシド系抗生物質による薬剤性難聴の機序を明らかにすることは感染症治療の一助になるだけでなく、内耳有毛細胞障害の機序を明らかにする足がかりとなり、更には感音難聴治療へと繋がる可能性があり、臨床的意義が高いと考えられた。

### 2. 研究の目的

臓器観察には組織を詳細まで観察する空間分解能と、経時的な変化を追う時間分解能の双方が必要となる。そして高い空間分解能と時間分解能を以って生きた細胞の障害動態を観察することは病態解明の大きな助けとなる。しかし内耳は非常に微小な臓器で且つ全体を側頭骨に覆われているため、アプローチが非常に困難な臓器である。

現状では構造を破壊せずに生きた組織を観察する手段は確立されておらず、マウスから周囲の側頭骨構造を破壊し摘出した内耳を観察する手段はあるが、時間分解能が犠牲となっている。CTやMRI、OCT検査といった画像検査は内耳の細胞動態を観察する為には解像度が不十分で、こちらは空間分解能が犠牲となっている。

内耳が側頭骨に囲まれた微小で複雑な臓器であることが生体の有毛細胞観察を極めて困難にしており、双方を両立させるためには高い空間分解能を有した顕微鏡を用いて、生体マウスの蝸牛を持続的に観察し、その様子を記録することが必要と考える。現時点で生きた状態のマウス有毛細胞を観察した報告はなく、我々は二光子励起顕微鏡を用いて生きた有毛細胞を観察し、続いて音響負荷や耳毒性薬剤に対する反応を可視化する実験系を確立することで、有毛細胞の障害機序を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

耳毒性の評価方法として、アミノグリコシド(カナマイシン)負荷を行い、生きた内耳有毛細胞の薬剤負荷への反応動態の観察を試みた。二光子励起顕微鏡で有毛細胞および脱神経の様子をリアルタイムで観察するために、有毛細胞、および蝸牛神経に蛍光タンパク質を発現するマウスが必要となった。そのため、有毛細胞にGFPを発現するAtoh1-GFPマウスとらせん神経節細胞および蝸牛神経にCFPを発現するThy1-CFPマウスを交配させた。

次に、生体イメージングを行うためには有毛細胞および神経接合部の形態を捉えておく必要がある。観察の状態を確認するために、まずはAtoh1-GFP / Thy1-CFPマウスの蝸牛透明化標本を作成し、共焦点顕微鏡にて観察を行った。続いて、二光子励起顕微鏡下にAtoh1-GFP/Thy1-CFPマウスの蝸牛intravital imagingを行った。

### 4. 研究成果

研究計画に基づき、Atoh1-GFPマウスとThy1-CFPの導入を行った。Atoh1-GFPマウスの蝸牛透明化標本を作成して共焦点顕微鏡下に観察し、有毛細胞におけるGFPの発現を確認した。また、Thy1-CFPマウスのらせん神経節細胞および蝸牛神経を摘出してCFPの発現を確認した。続いてAtoh1-GFPマウスとThy1-CFPマウスを交配させ、蝸牛透明化標本を作成した。共焦点顕微鏡下に観察を行い、有毛細胞にGFPを発現し、らせん神経節細胞および蝸牛神経にCFPを発現していることを確認し、観察に適したマウスを作成した。

続いて、マウス蝸牛の生体イメージングを行った。内耳展開を行うために、イソフルランで全身麻酔下に気管切開術を行って人工呼吸器で呼吸管理した。顕微鏡下に内頸動脈を温存しつつ下顎骨切除を行って、舌やマウス頭蓋骨に付着する筋肉群を切除した。続いて中耳骨包および耳小骨を取り除いて内耳骨包を露出した。人工呼吸管理を行いつつナリシゲ社の頭部固定装置を用いて頭部を固定し、二光子励起顕微鏡下に内耳生体イメージングを行える実験系の確立を行った。

今後は呼吸による視野の変動や内耳骨包による励起光の散乱を改善し、より安定した視野を得ることで耳毒性や音響不可への内耳の反応を評価し、有毛細胞死や脱神経の動態を明らかにす

ることを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------