

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16887

研究課題名（和文）蝸牛の新規3次元培養法の確立と内耳再生 -ROCK阻害薬によるシナプス再形成-

研究課題名（英文）Regenerative effect of a ROCK Inhibitor, Y-27632, on excitotoxic trauma in an organotypic culture of the cochlea

研究代表者

小泉 優 (Koizumi, Yutaka)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80723585

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）：内耳機能の再生は聴覚障害に対する治療法として、現在最も注目されている分野の一つである。本研究は蝸牛器官培養系を用い、NK処理による聴神経障害モデルを作製し、ROCK阻害薬の効果を検討した。NK処理のみを行った蝸牛組織と比較して、ROCK阻害薬であるY-27632で追加処理した蝸牛組織では、有毛細胞へ投射している聴神経線維数およびシナプス数に有意な差が確認された。本研究の結果からROCK阻害薬の聴神経障害に対する有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年になりprimary neural degenerationという概念が提唱され、感音難聴の成因として聴神経の障害が注目を集めている。本研究では内耳蝸牛の器官培養系を用いて、神経保護効果および神経・シナプス再生作用を有するとされるROCK阻害薬の聴神経障害への効果について検討した。ROCK阻害薬はすでに臨床応用されている薬剤であり、内耳領域でも効果が確認できれば、比較的簡便で画期的な聴覚障害の治療法となる可能性がある。今後、蝸牛聴神経でのRhoA/ROCK経路の発現変化についての解析および、in vivoでのROCK阻害薬の効果についてさらなる検討が期待される。

研究成果の概要（英文）：Recent studies show that loss of primary synapses accompanied by excitotoxic degeneration of peripheral axons is likely to be the underlying pathology in sensorineural hearing loss. Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) inhibition has been reported to have neuroprotective and regenerative effects on synaptic pathways. Therefore, we analyzed the effect of ROCK inhibition using Y-27632 in a model of peripheral axonal damage in the spiral ganglion neurons created using the glutamate agonists, N-methyl-D-aspartate (NMDA) and kainic acid, to induce excitotoxic trauma in the explanted cochlea. The findings of this study suggest that ROCK inhibition could be a potential strategy for the regeneration of peripheral axons in the spiral ganglion and synapse formation in the inner hair cells of a cochlea that has sustained excitotoxic injury, which is one of the primary etiologies of inner ear disease.

研究分野：内耳基礎研究

キーワード：内耳 感音難聴 聴神経 シナプス ROCK阻害薬 蝸牛 再生 器官培養

### 1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛内では内・外有毛細胞と、有毛細胞とシナプス形成している聴神経が存在し、中枢に音信号を伝えている。内耳障害はこれら有毛細胞または聴神経に障害が起こった状態である。内耳障害では有毛細胞が先に障害される（聴神経が2次的に障害される：secondary neural degeneration）と考えられていた（Johnsson LG. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1974.）。これは強力な音響外傷や薬剤による内耳障害実験によって確認された現象に基づいていた。この説に対して、近年新しい概念が提唱された。聴神経が障害されたのちに有毛細胞が障害される（聴神経が一次的に障害される：primary neural degeneration）という概念である（Kujawa SG and Liberman MC. *Hear Res.* 2015）。この説は、一過性の音響外傷では有毛細胞は消失しないが、聴神経とのシナプスは消失する（Kujawa SG et al. *J Neurosci.* 2009）、加齢性難聴では有毛細胞障害が明らかとなる前に聴神経と有毛細胞のシナプスの消失を認める（Sergeyenko Y et al. *J Neurosci.* 2013）といった現象に基づいている。これらの現象は secondary neural degeneration では説明が困難であるが、primary neural degeneration により説明可能である。また、より強い音響外傷や進行した加齢性難聴では有毛細胞、聴神経がともに消失するが、これも primary neural degeneration がより進行した結果と考えても矛盾はない。以上のように、感音性難聴の成因として、聴神経および有毛細胞-聴神経間のシナプスが重要であると考えられる（図1）。

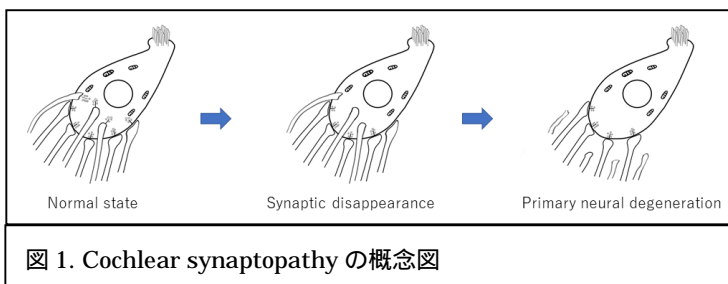


図1. Cochlear synaptopathy の概念図

### 2. 研究の目的

ROCK (Rho associated coiled-coil containing protein kinase) は低分子量 GTP 結合蛋白 Rho の標的蛋白質として同定されたセリン-スレオニン蛋白リン酸化酵素である。この経路を阻害する ROCK 阻害薬は、血流改善・神経保護効果、さらに神経・シナプス再生作用などの多面的な効果を持つ緑内障治療薬として臨床応用されている。非臨床試験でも循環器領域疾患、神経変性疾患、および癌など多くの疾患に対する有効性が示されている（瀬戸ら、2011）。内耳蝸牛領域での報告は非常に少ないが、音響外傷での ROCK 経路の活性化（Chen F et al. *J Neurosci.* 2012）、Rho キナーゼ阻害薬の薬剤障害からの有毛細胞保護効果（Daniel B et al. *Hear Res.* 2002）、Rho キナーゼ阻害薬による聴神経線維の伸長促進（Lie M et al. *Neuroscience.* 2010）、などの重要な知見が示されている。これらの知見から、神経保護効果および神経・シナプス再生作用を有する ROCK 阻害薬は、内耳障害における有毛細胞-聴神経間のシナプス再形成に関してもその効果を発現する可能性が十分に考えられる（図2）。

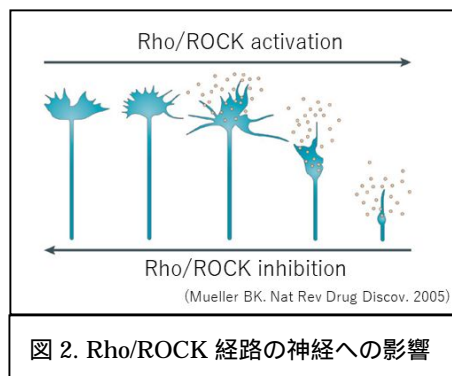


図2. Rho/ROCK 経路の神経への影響

### 3. 研究の方法

#### 実験動物および材料

実験材料として生後 4-6 日目のマウス (C57BL/6J) を用いた。マウスは氷上にしばらく置き低体温麻酔を行った上で断頭した。マウス側頭骨より内耳を採取し、実態顕微鏡を用い PBS 内で蝸牛組織を単離した。

#### 蝸牛器官培養

単離した蝸牛組織を使用し器官培養を行った。培養液の組成は以下の通りである。DMEM/F12 (gibco)、10 % FBS (SIGMA)、25 mM HEPES (gibco)、N-2 Supplement (gibco)、B-27 Supplement (gibco)、100 U/l penicillin G (WAKO)。37°Cで最長 72 時間まで培養を行った。その他の薬剤として、聴神経障害モデル作製のため glutamate 受容体アゴニストである N-Methyl-D-aspartic Acid (Tocris Bioscience) と Kainic Acid (Tocris Bioscience) を使用した。ROCK 阻害薬は Y-27632 (Wako 257-00511) を使用した。

#### 蝸牛器官培養神経障害モデルの作製

神経障害モデル作製は Wang らの報告 (*J Neurosci.* 2011) に基づき、原法と同じ条件の NMDA

0.5 mM + Kainic acid 0.5 mM、2 時間の条件で行った。

#### 蝸牛器官培養神経障害モデルに対する ROCK 阻害薬の効果の検討

蝸牛器官培養神経障害モデルに対する 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。control 群、NK 処理群 (NMDA 0.5 mM + Kainic acid 0.5 mM、2 時間。その後は洗浄し通常の培養液中で培養)、ROCK 阻害薬作用群 (NK 処理後に洗浄し、培養液中に 10  $\mu$ M Y27632 を添加)。培養後 24 時間、72 時間で免疫化学的な形態評価を行った。

#### 免疫組織化学

組織は PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド / PBS にて室温で 1 時間反応させ固定した。PBS で洗浄したのち、0.3% TritonX / 5% BSA / PBS にて室温で 1 時間ブロッキングをおこなった。1 次抗体は、有毛細胞マーカーとして Rabbit anti- Myo7a (1:1000 Sigma: N4142)、聴神経マーカーとして Rabbit anti-NF200 (1:1000 Sigma: N4142)、Chicken anti-NF200 (1:1000 chemicon: AB5539)、前シナプスマーカーとして Mouse (IgG1) anti-CtBP2 (1:1000 BD biosciences: 612044)、後シナプスマーカーとして Mouse (IgG2a) anti-PSD95 (1:5000 abcam: ab2723) を使用した。すべての抗体において 4°C で 16 時間反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体として 500 倍希釈した Alexa405 Goat anti-Rabbit IgG (Invitrogen: A31556)、Alexa488 Donkey anti-Rabbit IgG (Invitrogen: A21206)、Alexa488 Goat anti-Chicken IgG (Invitrogen: A11039)、Alexa 488 Goat anti-Mouse IgG2a (Invitrogen: A21131)、Alexa 568 Goat anti-Mouse IgG1 (Invitrogen: A-21124) を用いて室温にて 2 時間反応させた。これを PBS 洗浄し、グリセロールで封入し観察した。

#### 蛍光観察

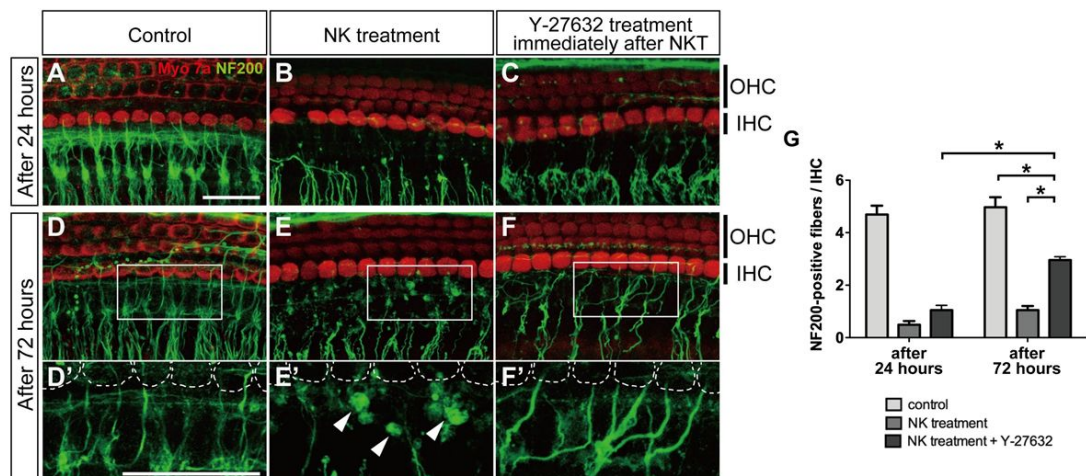
共焦点レーザー顕微鏡 LSM-700 (Carl Zeiss) を用いて観察を行った。内有毛細胞へ投射している聴神経線維数の解析については Z-series での解析を行った。Myo7a 陽性内有毛細胞に接する NF200 陽性の聴神経繊維を計測し、1 内有毛細胞あたりの聴神経線維数として算出した。また同視野において、1 視野あたりの内有毛細胞と外有毛細胞の生存率も算出した。シナプス数については Maximum intensity projection (MIP: 最大値投影法) での解析を行った。画像解析ソフト imageJ を用いて、Myo7a 陽性内有毛細胞上での CtBP2 および PSD95 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。それぞれ 1 サンプルにつきランダムな 3 視野での計測を行い、3 視野の平均と標準偏差を算出した。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 法による多重検定を行った。

## 4 . 研究成果

### 蝸牛器官培養神経障害モデルの作製と ROCK 阻害薬による神経線維数の変化

単離した蝸牛は 72 時間の培養を行った (図 3)。NMDA 0.5 mM + Kainic acid 0.5 mM、2 時間の条件で NK 処理を行ったところ、培養後 24 時間、72 時間の時点で、1 内有毛細胞あたりの聴神経線維数は対照群と比較して有意な減少を示した(図 3. A,B,D,E,G)。本研究で採用した障害モデルにおいて十分に聴神経線維の障害が確認できた。また、内有毛細胞および外有毛細胞の形態学的な障害も認めず、観察に支障がないことも確認した(not shown)。本条件のもと引き続き ROCK 阻害薬を作用させて検討を行った。培養 24 時間後の ROCK 阻害薬作用群では聴神経線維数が NK 処理群と比較してやや多い傾向はあったが有意差は認めなかった (図 3. C,G)。一方、培養 72 時間後では ROCK 阻害群で NK 処理群と比較して有意に多くの聴神経線維数を確認できた (図 3. F,G)。また、ROCK 阻害薬作用群でも内有毛細胞および外有毛細胞の減少は認めなかった (not shown)。

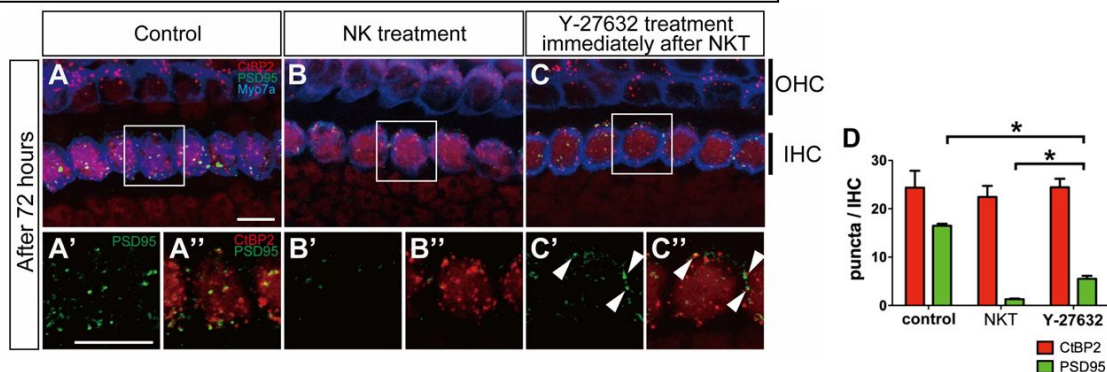
図 3. ROCK 阻害薬による神経線維数の変化



#### ROCK 阻害薬添加による後シナプスマーカーの発現変化

前シナプスマーカーである CtBP2 は、NK 処理による作用で障害されないことが報告されている。一方、後シナプスマーカーである PSD95 は NK 処理による作用で障害される。本研究では ROCK 阻害薬のシナプスへの影響を確認する目的で、PSD95 の陽性シグナル数変化に着目して検討した。培養 72 時間後において、PSD95 の陽性シグナル数は NK 処理群で著明に減少していることが確認できた (図 4. B', D)。一方、ROCK 阻害薬作用群では PSD95 の陽性シグナル数増加を確認できた (図 4. C', D)。画像解析ソフトによる解析では control 群で  $16.49 \pm 1.06$ 、NK 処理群で  $1.30 \pm 0.36$  と PSD95 陽性シグナルの減少を認め ( $p < 0.01$ )、ROCK 阻害薬作用群では  $5.52 \pm 1.50$  と NK 処理群と比較して PSD95 陽性シグナルの増加を確認できた (図 4. J,  $p < 0.01$ )。

図 4. ROCK 阻害薬添加による後シナプスマーカーの発現変化



#### 結語

内耳機能の再生は、聴覚障害に対する治療法として、現在、最も注目されている分野の一つである。本研究は蝸牛器培養系を用い、聴神経障害モデルに対する ROCK 阻害薬の効果を検討した。ROCK 阻害薬はすでに臨床応用されている薬剤であり、動物実験で得られた知見をもとに内耳領域でも臨床応用できれば比較的簡便で画期的な治療方法となることが期待される。NK 処理のみを行った蝸牛組織と比較して ROCK 阻害薬である Y-27632 で追加処理した蝸牛組織では、有毛細胞へ投射している聴神経線維数およびシナプス数に有意な差を確認でき、本研究の結果から ROCK 阻害薬の聴神経障害に対する有効性が示唆された。今後、蝸牛聴神経の再生過程での RhoA/ROCK 経路の変化について詳細な解析および、*in vivo* での ROCK 阻害薬の効果についてさらなる検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

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 無
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 Chiba Makoto, Ito Tsukasa, Shinkawa Chikako, Koizumi Yutaka, Hull Melinda, Kakehata Seiji	4. 巻 351
2. 論文標題 Consistent removal of hair cells in vestibular end organs by time-dependent transtympanic administration of gentamicin in guinea pigs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 109049 - 109049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2020.109049	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小泉優, 伊藤史, 欠畑誠治
2. 発表標題 蝸牛器官培養聴神経障害モデルにおけるROCK阻害薬の効果の検討
3. 学会等名 日本耳科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉優, 伊藤史, 欠畑誠治
2. 発表標題 蝸牛器官培養聴神経障害モデルを用いた聴神経の再生
3. 学会等名 日耳鼻東北地方連合学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉優
2. 発表標題 内耳再生研究の最前線
3. 学会等名 アレルギー疾患講演会in山形
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉優
2. 発表標題 蝸牛器官培養聴神経障害モデルを用いた聴神経の再生
3. 学会等名 日本耳科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yutaka Koizumi
2. 発表標題 ROCK inhibitor Y-27632 accelerates auditory nerve fiber growth and synapse formation after excitotoxic trauma in organotypic culture of cochlea
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 42nd Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------