

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16912

研究課題名(和文)急性内耳障害とセロトニン3A受容体の関連

研究課題名(英文)The relationship between acute cochlear damage and 5-HT3A receptors

研究代表者

大畠 和也(OHATA, KAZUYA)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10778632

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):免疫染色を用いて5-HT3A受容体の内耳での発現を確認した所、外有毛細胞を支配する遠心性線維(MOC)に特異的に発現していることがわかった。次に聴覚機能を比較した結果、5-HT3A受容体KOマウスではシスプラチンによる聴覚閾値上昇が有意に抑えられていることが分かった。一方、音響外傷を用いた検討では、KOマウスの方が有意に内耳障害が増強していること、およびこのマウスのMOC機能が野生型と比べ有意に低下していることがわかった。これらから5-HT3A受容体は正常なMOC機能を保つために必須であり、その欠損により強大音に対する防御機能を担うMOC機能が減弱し内耳障害が増強するということが解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳障害と5-HT3A受容体の関連については今までほとんど報告がなく、今回の知見は非常に学術的意義が大きいものと考えられる。さらに、薬理的検討にて5-HT3A受容体阻害薬の投与により、シスプラチンの内耳障害を軽減可能であったことは学術的および社会的観点からも意義深いものと思われる。なぜならば、通常抗ガン剤としてシスプラチンを用いる際に制吐剤として5-HT3受容体阻害薬が用いられている。我々の知見と併せて考えると、この5-HT3受容体阻害薬が内耳障害も予防できていた可能性がある。

研究成果の概要(英文):We found that 5-HT3A receptors were expressed in efferent neurons which innervated outer hair cells in cochlear. Moreover, threshold shift in 5-HT3A receptor deficient mice administered with CDDP in ABR or DPOAE were smaller than that in wild-type mice. Meanwhile, 5-HT3A receptor deficient mice showed weaker MOC function and severer cochlear damage than wild-type mice after noise exposure. These results showed that the 5-HT3A receptor is essential for normal MOC function and 5-HT3A receptor deficient leads to weaker MOC function, which results in severer cochlear damage after acoustic trauma.

研究分野：耳科学

キーワード：セロトニン 内耳障害 シスプラチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

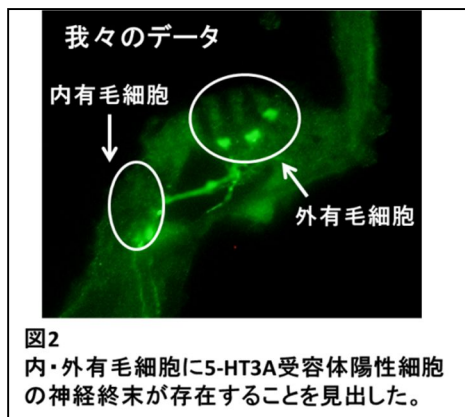
シスプラチンは様々な固形癌の治療に使用されている抗がん剤の一つであるが、内耳毒性のある薬剤として広く知られている。しかしながら、現在までにそれに対する有効な予防および治療法は発見されておらず、残念ながら対症療法に限られているのが現状である。

セロトニンはノルアドレナリン、ドーパミンと並び、3大モノアミン系神経伝達物質の一つである。また、セロトニン受容体(5-HT受容体)は1~7のサブタイプが同定されており、ほとんどがG蛋白共役型であるが、5-HT3受容体は唯一イオンチャネル型で、その速いチャネル活性から神経伝達系に発現機能しているものと考えられる。

また、セロトニンおよびセロトニン受容体は、聴覚、視覚の神経伝達系に加え、偏頭痛、不安、うつ病、嘔吐の症状発現メカニズムに関与していることはよく知られている。

我々のグループは以前に5-HT3A受容体が末梢前庭神経に発現し機能していることを示した(Takimoto et al. Brain Res)。私は今回5-HT3A受容体が蝸牛に発現していることに注目し、5-HT3A受容体が聴覚の神経伝達機能に関わっているのではないかと着想に至った。

まずRT-PCR法によりマウス蝸牛に5-HT3A受容体が発現していることを再確認した(図



1)。次に5-HT3A-GFPトランスジェニックマウスを入手し、免疫染色法を用いてマウス蝸牛での5-HT3A受容体の発現を解析した。その結果、らせん神経節および内・外毛細胞に5-HT3A受容体陽性細胞の神経終末が存在することを見出した(図2)。

次に5-HT3A受容体KOマウスを用いて、他覚的聴力検査である聴性脳幹反応検査(ABR)を行った。ABR上は野生型マウスと比して明らかな聴力低下は認めなかった。

このことから5-HT3A受容体は定常状態では聴覚閾値に重要な役割は担っていないと考えられた。次に私はシスプラチン投与後の聴力閾値を調べることにした。その結果、野生型マウスと比べて5-HT3A受容体KOマウスではシスプラチン投与後での聴覚障害が軽減されている結果を得た。

2. 研究の目的

以上の予備実験の結果より、5-HT3A受容体がシスプラチンによる内耳障害に関与している可能性が高いと考えられる。本研究の目的は5-HT3A受容体と内耳障害の機序を解明して、未だ確立されていない急性内耳障害に対する治療を開発することである。

3. 研究の方法

1.野生型マウス,5-HT3A受容体KOマウスの内耳において5-HT3A受容体遺伝子の発現および局在を確認する

我々の予備実験ですでにRT-PCR法で発現を確認している。さらに内耳における局在をin situ hybridizationと免疫染色で確認する。また5-HT3A受容体KOマウスの内耳凍結切片を作製し、組織形態を観察し野生型マウスと比較する。

2.野生型マウス、5-HT3A受容体KOマウスにおいて生理実験を用いて聴覚を評価する

聴性脳幹反応検査(ABR)等の他覚的聴力検査を用いて5-HT3A受容体KOマウス

の聴覚を評価し野生型マウスと比較する。

3. シスプラチン投与後の5-HT3A 受容体 KO マウスと野生型マウスで分子生物学的解析、生理実験を行い詳細に解析、比較検討をおこなう。

シスプラチン投与後の 5-HT3A 受容体 KO マウスにおける 5-HT3A 受容体の発現量の変化、聴覚を評価し、シスプラチンによる聴覚障害に対する耐性機構を明らかにする。

4.音響外傷による聴力低下や有毛細胞の障害について検討する

音響外傷による内耳障害では蝸牛神経の神経終末の形態変化が起きることが報告されている。我々の予備実験では同部位に 5-HT3A 受容体陽性細胞の神経終末が存在することが示されており(図 2)、**音響外傷による内耳障害のメカニズムと 5-HT3A 受容体の関係が示唆される。**このことに注目し、音響外傷後に聴性脳幹反応 (ABR) 検査を行い、5-HT3A 受容体 KO マウスと野生型マウスで差があるか検討する。また、免疫染色を行って音響外傷による有毛細胞障害に関して両者を比較し音響外傷と 5-HT3A 受容体の関係について検討する。

5. 内耳での 5-HT3A 受容体の刺激、阻害での効果を検証し薬理学的にも検討する

5-HT3 受容体の刺激薬および阻害薬を用いて内耳での 5-HT3A 受容体の機能を検討する。

4 . 研究成果

まず、免疫組織学的手法をもちいて 5-HT3A 受容体の内耳での発現を確認したところ、内耳における外有毛細胞を支配する遠心性線維 (MOC : Medial Olivocochlear) に特異的に発現していることがわかった。次に、ABR、DPOAE といった生理学的検査によりシスプラチン投与後の野生型マウスと 5-HT3A 受容体 KO マウスの聴覚機能を比較した。その結果、野生型マウスと比して 5-HT3A 受容体 KO マウスではシスプラチンによる聴覚閾値上昇が有意に抑えられていることが分かった。

続いて、今回見られた聴覚閾値上昇抑制の機序を調べるためにシスプラチン投与後の内耳組織を対象に免疫組織学的検査を用いて調べることにした。シスプラチンによる内耳障害では外有毛細胞の脱落や血管条の形態変化、らせん神経節細胞の変性などが生じるとされているが、今回の我々の検討ではそれらについては野生型マウスと 5-HT3A 受容体 KO マウスの間で形態的には有意な差は見られなかった。この点についてはさらなる検討が必要と考えられた。

一方、音響外傷による内耳障害モデルを用いた検討では、興味深いことに野生型マウスと比して 5-HT3A 受容体 KO マウスの方が有意に内耳障害が増強していることが分かった。元々、外有毛細胞を支配する遠心性線維の主たる機能の一つとしては強大音に対する防御機構が報告されており、非常に興味深い知見と考えられた。このことから、5-HT3A 受容体 KO マウスでは MOC 機能が減弱しているのではないかと推察されたため、DPOAE を用いた計測にて精査したところ、5-HT3A 受容体 KO マウスの MOC 機能が野生型マウス

と比べ有意に低下していることがわかった。このことから、5-HT_{3A} 受容体は正常な MOC 機能を保つために必須であり、その欠損により強大音に対する防御機能を担う MOC 機能が低下することで、内耳障害が増強する結果につながるということが解明できた。

最後に、5-HT_{3A} 受容体阻害薬投与による薬理的検討をおこなった。その結果、シスプラチン内耳障害モデルおよび強大音による内耳障害モデル両方で 5-HT_{3A} 受容体 KO マウスで得た結果を薬理的に再現することができた。また、強大音による内耳障害モデルでは 5-HT_{3A} 受容体刺激薬の事前投与により内耳障害を軽減できるという予防効果を確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuya Ohata
2. 発表標題 Cochlear protection after noise exposure requires 5-HT3A receptor via efferent feedback system
3. 学会等名 2020 ARO MidWinter Meeting (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----