

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09365

研究課題名(和文)Otof遺伝子ノックアウトマウスを用いたANSDの治療モデル構築

研究課題名(英文)Construction of a mouse model for Auditory Neuropathy Spectrum Disorder

研究代表者

難波 一徳 (NAMBA, Kazunori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：60425684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Otof遺伝子が欠損したマウスは、外有毛細胞の機能は正常であるが、聴覚神経の活動が観られない感音性難聴であるオーディトリーニューロパチー(ANSD)の特徴を示す。本研究で見つかった1型神経細胞の著しい減少がANSDの重篤化に関係するという仮説に基づき、免疫組織染色を行ったところ、1型神経細胞減少は、BDNFの減少と細胞死が関与していることが解った。また、各週齢のホモ遺伝子型、野生型のDPOAEを測定し統計解析を行ったところ有意差は見られず、音響放射の機能に影響しないことが解った。DPOAE、ABRのデータがSGN減少の免疫組織染色と合わさることで、ANSDの新規治療モデルに発展する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、初めて免疫組織解析および小動物用の耳音響放射測定により、ANSDの重篤化を示唆する分子機序の解明に踏み込んだ試みであり、学術的意義がある。また、マウスの発達段階での病気の進行パターンを視覚的なデータとして残した点、またその実際のマウスを治療モデルとして使える有用なものにした点に、学術的意義がある。

また、将来的にらせん神経節細胞の減少を抑えることができれば、人工内耳などのインプラント技術を用いた際の生体のメンテナンス機能を向上できる可能性があることから社会的意義があるといえる。

研究成果の概要(英文)：Otof gene null Mice show the characteristics of auditory neuropathy spectrum disorder (ANSD), which is a sensorineural deafness in which the function of external hair cells is normal but the activity of auditory nerves is not observed. In this study, based on the hypothesis that the significant decrease in type 1 neurons found in the spiral ganglion of mice at the developmental stage is related to the progression of ANSD, the mechanism of molecular damage is elucidated mainly by immunohistochemical staining. It was found that type 1 neuronal depletion is associated with BDNF depletion and cell death. In addition, DPOAEs of homozygous and wild-type mice at 4 and 48 weeks of age were measured and statistically analyzed, no significant difference was observed. Combining the DPOAE data with immunohistochemical staining data for SGN degradation, it will develop into a new therapeutic model for ANSD.

研究分野：遺伝子解析

キーワード：Otof オーディトリーニューロパチー ANSD オトフェリン らせん神経節 BDNF DPOAE SGN

## 1．研究開始当初の背景

Otoferlin は *Otof* 遺伝子 (*Otof*) の遺伝子産物で、有毛細胞のリボンシナプスに発現し、聴神経の伝導のためのシナプス小胞の分泌およびリサイクルに責任がある。*Otof* 欠損マウスは、外有毛細胞の機能(音響放射, DPOAE)は正常であるが、聴覚神経の活動(聴性脳幹反応, ABR)が観られない感音性難聴であるオーディトリニューロパチー (ANSD)の特徴を示す。本研究室において、*Otof* 欠損マウスのラセン神経節においてラセン神経節細胞(SGN)、主に1型神経細胞が減少し、それは正常ならせん神経節に比べて、神経栄養因子(BDNF)の発現が少なく、それに伴い細胞死(アポトーシス)が多く観られる特徴があることを世界に先駆けて発見した(2012-2014年度\_若手B, 研究課題番号 27491819 による)。つまり、*Otof* 欠損マウスの難聴の病因は、有毛細胞でのシナプス小胞分泌機能が機能しないだけでなく、SGNが減少していることも原因であることが示唆された。

現在人工内耳の手術件数が増えており、ANSDの治療の一環として人工内耳手術の高い効果が評価されてきている。人工内耳の有効性は聴覚神経が健在であることに依存するため、らせん神経節を含む聴覚神経系のメンテナンスが重要である。ANSDの病態モデルの作成により、この人工内耳のメンテナンスに有効な情報を得るための治療モデルとなりうる。そこで、まず、ANSDの特徴を示す *Otof* 欠損マウスがどのような障害メカニズムにより、蝸牛神経の形態異常が生じるのか、また、ラセン神経節において神経組織形成段階の分子機序に何らかの異常が関与するのかわかるといふ疑問を解析することを目的とし、本研究を開始した。

## 2．研究の目的

本研究では、前回得られた結果として挙げられるこの *Otof* 欠損マウスのSGN(1型神経細胞)が生後7日後に急激に減少するという病徴を解析することに着目し、関与すると考えられる分子マーカーを用い、免疫組織染色の手法により発達段階での発現パターンの詳細な解析を行い、また、ANSDの特徴である、音響放射機能に影響がないという特徴が、SGNの神経細胞の減少とどのように関与してくるかなどの分子病態機序を調べる必要があった。

そこで、この発達段階での *Otof* 欠損マウスのらせん神経節で見つかった1型神経細胞の顕著な減少がANSDの重篤化に関係するという仮説に基づき、主に免疫組織染色によりその分子障害機序の解明を試みた。また、発達段階あるいは老齢に至るまでの1型神経細胞の減少に伴い、音響放射機能に何らかの異常が観られるか解析することを目的とし、小動物用DPOAEの測定を行った。

## 3．研究の方法

従来でのパラフィンを使用した免疫染色では、1型神経細胞マーカーNeuNと2型神経細胞のマーカーであるPeripherinのそれぞれ一次抗体を用い、赤と緑色を呈する蛍光二次抗体の二重染色によるデータを出発点とした。パラフィンによる切片では、処理段階で抗原性がある程度失われることによりS/N比が低下することから、発現パターンの区別が困難なサンプルが混在することが問題となっていた。つまり、1型神経細胞と2型神経細胞の区別、またマウスの週齢によるBDNF発現パターンの差異を調べるのが困難な問題が残されていた。

そこで本研究では、より生体に近い条件にするために、4週齢から48週齢の *Otof* 欠損マウスと同腹の野生型マウスのそれぞれの内耳の凍結切片を作成し、従来と同条件の免疫染色実験を行った。また、隣接した切片を用いて、発達段階の BDNF とその受容体の TrkB の発現パターンの免疫染色の条件検討を行った。免疫染色法では、主に抗 NeuN 抗体に対し、緑色蛍光を呈する二次抗体 (Akexa Fluor 488)、別の一次抗体に対応する赤色蛍光を示す二次抗体 (Alexa Fluor 488) を用いる二重染色によって行った。さらに、4週齢および48週齢のホモ遺伝子型、同腹の野生型のマウスの DPOAE をそれぞれ3回以上測定し有意差が観られるか統計解析を行った。

#### 4. 研究成果

本研究では、パラフィン切片と比べて、S/N比がある程度改善され、1型神経細胞の減少との相関性が観られるものの、厳密にカウントできるまでの改善に至っていない。さらに発達段階における1型神経細胞の減少は、免疫染色およびTUNEL染色により、相関性が観られた。しかし、この1型神経細胞の細胞死とBDNFの発現の減少との因果関係は依然のまま不明である。

また、耳音響放射機能を調べるためのDPOAEでは、正常マウスも *Otof* 欠損マウスでも有意差が観られなかったことから、*Otof* 欠損マウスは、正常マウスと同様に耳音響放射機能は正常であることが解った。本研究により、*Otof* 欠損マウス耳音響放射機能は、老齢に至っても正常マウスと比べて変化が観られないというデータが得られたことから、外有毛細胞は老齢に至っても機能していて、ANSDの特徴が続くと考えられる。

ヒトのANSDの治療において、人工内耳の効果が期待されており、人工内耳の脳へのシグナルを伝えるためには残されている聴神経を保護していく必要がある。ヒトのOTOF変異の患者では、聴神経がしっかり残っているという報告もあり、そのまま当てはめることは難しいが、事実上、*Otof* 欠損マウスではSGNの1型神経細胞が減少するという本データがあり、SGNの神経細胞の保護において何らかの不具合が生じている可能性は否定できない。SGNが減少すれば人工内耳の効果が低下することは明らかであり、今後はANSDの治療では残されている聴神経のメンテナンスが重要な課題の一つであると考えられる。多くの課題が残されているが、本研究はその対策のための重要な実験モデルとなると考えられる。

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
研究分担者	藤岡 正人  (FUJIOKA Masato)  (70398626)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師    (32612)	

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