

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2022
課題番号：18K16857
研究課題名（和文）収束イオンビーム走査型電子顕微鏡による外有毛細胞損傷における初期構造変化の解明

研究課題名（英文）Investigation of Early Structural Changes in Outer Hair Cell Damage Using Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy

研究代表者
安齋 崇（Anzai, Takashi）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20624852
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）：マウスの内耳にある蝸牛感覚上皮を水平に薄くスライスした検体を作成し、収束イオンビーム搭載操作顕微鏡で音を感じるために重要な細胞である外有毛細胞の連続画像を作成した。外有毛細胞の細胞膜の直下に嚢胞状の構造体で、細胞の活動エネルギー供給の場として重要とされるsubsurface cisternaeという細胞内器官を観察することができた。さらにこの連続画像をデジタルトレースして再構築することで、これまで平面構造として観察されてきた外有毛細胞の細胞内器官を立体構造としてとらえることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
収束イオンビーム搭載操作顕微鏡で撮影した連続画像のsubsurface cisternae及び細胞膜をデジタルトレースを行うことでこれまで平面でとらえられていた構造を立体構造として可視化し得た。Subsurface cisternaeはATP産生の場としても注目されており、疾患モデルとの比較により障害の程度を定量化する新たな指標になりえることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We created thin horizontal slices of the cochlear sensory epithelium in the mouse inner ear and obtained sequential images of outer hair cells, which are important cells for sensing sound, using a focused ion beam-equipped scanning microscope. We were able to observe a cyst-like subcellular structure called subsurface cisternae, located just beneath the cell membrane of the outer hair cells, which is considered vital for cellular energy supply. Furthermore, by digitally tracing and reconstructing these sequential images, we were able to capture the three-dimensional structure of the intracellular organelles of the outer hair cells, which were previously observed only in planar structures.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：内耳 収束イオンビーム搭載操作顕微鏡 FIB/SEM 外有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は 1000 出生に 1 人発生し、先天性疾患の中でも最も高頻度に起こる疾患の一つである。我が国は世界でも類をみない超高齢社会に突入し、加齢性難聴の患者数は増加の一途をたどっている。このように、世界には 3 億 6 千万人の難聴患者がいると見積もられている。しかしながら、根治的な治療は未だ発見されておらず、不可逆的な内耳の変性をきたせば聴力改善は現在の医療では望めない。障害が重度になれば補聴器・人工内耳による対症的な治療を選択するのみであるが、自然な聴力改善には限界がある。

外有毛細胞の脱落は遺伝性難聴、騒音性難聴、加齢性難聴などを含む感音性難聴の内耳変性の終末像として共通するものである。しかしながら、哺乳類の外有毛細胞は再生能を有しておらず外有毛細胞の脱落は不可逆的である。各ストレスからの外有毛細胞の保護を考えたとき、外有毛細胞が致命的な障害を受ける前に介入することが必要であり、そのためには有毛細胞へのストレスの初期の病態変化をとらえることが鍵となる。研究代表者は Cx26 変異モデルマウスの病態初期に外有毛細胞の膜構造が変化していることを初めて発見した(Anzai et, al. *PLoS One* 2015)【図 1】。

哺乳類の外有毛細胞は高度に分化した細胞である。外有毛細胞は音刺激により、自ら伸長運動を行い、蝸牛に伝わった音エネルギーを増幅させる働きを持っている。外有毛細胞はこの自動運動に重要と考えられている立体的三層構造をしている【図 2】。

詳細な立体構造の理解は細胞の機能やその機能が病態において、どのようにして崩壊していくのかを理解するのにとても重要である。そこで、本研究では外有毛細胞に特徴的な外側壁の三層層構造を収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡

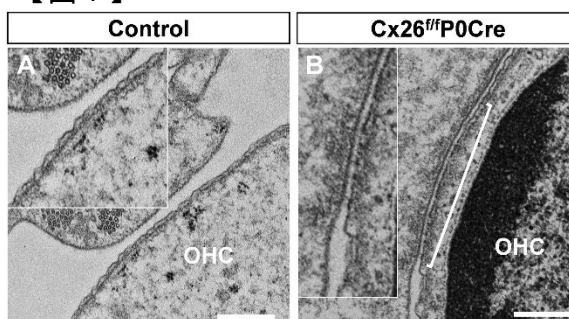
(FIB/SEM) により得られた連続断面画像を基盤として 3 次元構築することによって、通常の病理では検出できない膜構造の変化を可視化できると考えた。より早期に外有毛細胞の変性をとらえることができれば最適な治療介入時期の予測が可能になり、薬剤・遺伝子治療の効果の評価が可能になる。

2. 研究の目的

本研究は外有毛細胞の脱落という不可逆的な現象でありながら様々な因子による難聴に共通した病態の解明、特に病態進行の初期の変性を立体解剖学的に捉え、内耳への早期ストレス負荷の指標を作ることとを目的としている。これらが成されることにより

(1)外有毛細胞の外側層 SC の 3 次元構造を世界で初めて明らかにすることができる

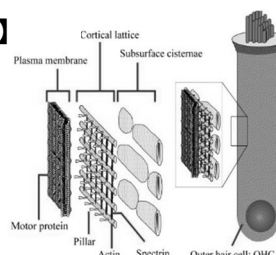
【図 1】



(Anzai et., al. *PLoS ONE*)

Cx26 変異難聴モデルにおける初期の外有毛細胞は波状構造が消失し、平坦化する。

【図 2】



(東北大学工学部 HP より)

- (2) ストレス下の病態において立体構造がどのように変化するかを示すことができる
- (3) ストレス早期の指標となり、各治療効果を上げ、治療効果の指標となる

これらの成果は内耳変性のメカニズムを明らかにし、さらには革新的な難聴予防・治療の開発の促進、活性化に貢献することが期待できる。このことは根治的な難聴治療への突破口を開くものとなり、難聴に悩む多くの患者への福音となる。

3. 研究の方法

マウス蝸牛における外有毛細胞の3Dでの立体形態学的解析

近交系マウスとしてC57BL/6J系マウス約3週齢の聴性脳幹反応(ABR)を測定し、聴力が正常であることを確認したマウスを正常蝸牛モデルとして使用する。

【Step:1 新しいSEM法による連続切片の画像を作成】

マウスから取り出した蝸牛をエポン樹脂に包埋したブロックから蝸牛感覚上皮の水平断を作成し、収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡(FIB/SEM)を用いて外有毛細胞を20nm間隔のFIBによる断面加工を行い、走査型電顕(SEM)を繰り返すことにより外有毛細胞全体の連続画像(約400枚、計8μm厚)を得る。【図3】

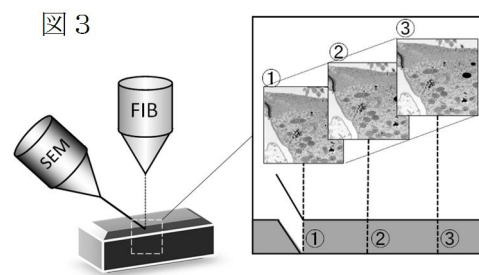


図3 FIB加工とSEM観察を繰り返し断面SEM像を取得
デジタルトレースを画像を作成して3次元構造を構築する

【Step:2 連続画像の画像を1枚ずつ解析】

SEMの連続画像から subsurface cisternae (SC) や細胞膜のデジタル描写によるトレース画像を作成。

【Step:3 画像処理ソフトで立体構造を再現】

画像処理ソフト Amira によりグラフィック化(図5)し、細胞全体のSCの立体構築及び細胞膜も同様に立体構築し細胞側壁構造全体を立体的に可視化し、詳細な立体構造を作成することで、外有毛細胞の立体構造を明らかにする。

各疾患モデルにおける外有毛細胞の3Dでの立体形態学的解析

外有毛細胞の2次的な脱落という共通した事象を持つ疾患モデルマウスを使用して、正常モデルとの比較を行う。

- A: 遺伝性難聴モデルとしてCx26の内耳特異的欠損マウス
- B: 加齢性難聴モデルとしてC57BL/6J系マウス
- C: 音響外傷モデルとして騒音下に暴露したC57BL/6J系マウスを使用する。

時系列での立体構造の変化と形態学的変化の定量化

各モデルマウスの形態学的な変化を時系列を追って観察することにより、外有毛細胞の変性の過程を明らかにする。また、CGで再現した立体構造からSCの体積を数値化することによって、外有毛細胞へのストレス・変性の指標となるか検討する。

4. 研究成果

(1)本研究では近交系マウスとして C57BL/6J 系マウスを使用した。

蝸牛感覚上皮の水平断を作成し収束イオンビーム搭載操作顕微鏡で外有毛細胞の連続画像を作成した。subsurface cisternae は外有毛細胞の細胞膜の直下に嚢胞状の構造体として観察することができた(図4 矢印)。また細胞膜及び subsurface cisternae の直下にはミトコンドリアが多数存在していた。なお、研究期間中に subsurface cisternae は外有毛細胞の構造を支持するだけでなく、ミトコンドリアと接合して ATP 産生の場として重要な構造体であることが他施設より報告された。(Perkins G et al. *J Neurosci.* 2020)

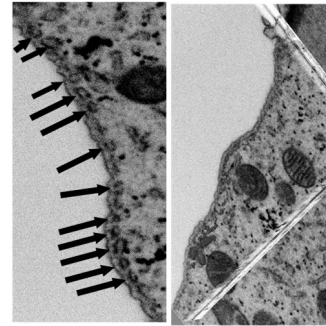


図4 外有毛細胞の水平断

(2)収束イオンビーム搭載操作顕微鏡で撮影した連続画像の subsurface cisternae 及び細胞膜をデジタルトレースを行い、画像処理ソフトを用いて立体構造を再構築することでこれまで平面でとらえていた外有毛細胞の細胞内器官を立体構造として可視化し得た。これにより、外有毛細胞の直下に存在し、網目状の構造体を形成している subsurface cisternae をより明確に視覚化することが可能になった。(図5)

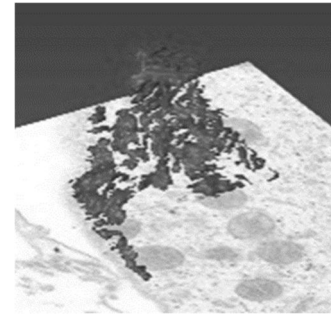


図5 3D再構成した subsurface cisternae

(3)病理モデルとの比較と構造体の数値化

各病理モデルの Subsurface cisternae の構造的な変化や加齢による経時的変化を立体構造で検討比較すること、さらに画像解析により障害の程度を定量化することを試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Chen Cheng, Iizumi Madoka, Shiga Takahiro, Matsuoka Rina, Anzai Takashi, Hibiya-Motegi Remi, Tajima Shori, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kamiya Kazusaku	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of two iPSC lines from siblings of a homozygous patient with hearing loss and a heterozygous carrier with normal hearing carrying p.G45E/Y136X mutation in GJB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102290 ~ 102290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hara Satoshi, Kusunoki Takeshi, Nakagawa Hiroshi, Toyoda Yu, Nojiri Shuko, Kamiya Kazusaku, Furukawa Masayuki, Takata Yusuke, Okada Hiroko, Anzai Takashi, Matsumoto Fumihiko, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 166
2. 論文標題 Association Between Earwax-Determinant Genotypes and Acquired Middle Ear Cholesteatoma in a Japanese Population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otolaryngology Head and Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 139 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/01945998211000374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Anzai Takashi, Takata Yusuke, Hara Satoshi, Sonoda Kenji, Ikeda Katsuhisa, Okada Hiroko, Matsumoto Fumihiko	4. 巻 0
2. 論文標題 Combined underwater endoscopic and microscopic surgery for external auditory canal cholesteatoma: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ear, Nose & Throat Journal	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/01455613211064011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takata Yusuke, Anzai Takashi, Hara Satoshi, Okada Hiroko, Matsumoto Fumihiko, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 0
2. 論文標題 Cholesteatoma Surgery With a Dehiscent High Jugular Bulb Treated With Surgery Assisted With Underwater Endoscopy: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ear, Nose & Throat Journal	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/01455613211009135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takata Y, Anzai T, Matsumoto F, Hara S, Ikeda K	4. 巻 -
2. 論文標題 Subtotal Petrossectomy With Preservation of Chorda Tympani for Petrous Bone Cholesteatoma: Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ear Nose Throat J. 2020	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) 10.1177/0145561320964268.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga I, Shiga T, Chen C, Oe Y, Danzaki K, Ohta S, Matsuoka R1, Anzai T, Hibiya-Motegi R, Tajima S, Ikeda K, Akamatsu W, Kamiya K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Generation of the induced pluripotent stem cell (iPSC) line (JUFMD0i004-A) from a patient with hearing loss carrying GJB2 (p.V37I) mutation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 0-1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2019.101674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安齋 崇、他
2. 発表標題 内耳障害のみを生じた耳性帯状疱疹に対してアメナメビルが著効した 1 例
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------