

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19602

研究課題名（和文）内耳の受傷性に対する概日リズムの影響

研究課題名（英文）Influence of circadian rhythm on the susceptibility of the inner ear

研究代表者

山嵜 達也（Yamasoba, Tatsuya）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60251302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：概日リズムタンパク質の発現量が多くなるサーカディアン時刻での免疫染色を行った。CBAマウスの脳と側頭骨を摘出、脳組織はfree floating切片、凍結切片、パラフィン切片、内耳はsurface preparation、凍結切片、パラフィン切片を作成、蛍光免疫染色と酵素抗体法を行った。floating切片の視交叉上核でのPER1とPER2のみ陽性細胞を確認できたが、蝸牛内の発現は自家蛍光が強く評価困難であった。C57BL/6Jを強大音暴露したが、暴露後24時間後、2週間いずれの群においても日中暴露群は夜間暴露群に比べてABR閾値が上昇しており、先行研究と矛盾する結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では概日リズムが蝸牛の障害に与える影響を調べ、同じ障害条件であっても難聴などの内耳障害を来しにくい時間を見いだすことが目的である。ただし、概日リズムに関するタンパクの発現は脳組織では確認できたが、蝸牛では良い抗体がなく、評価が困難であった。また、音響外傷を来す実験においては、日中暴露群が夜間暴露群に比べて難聴は悪化する結果となった。この結果は、同じ強大音響でも時間帯によって生じる難聴の程度が異なることを意味しているが、先行研究とは逆の結果であり、さらに検討を加える必要がある。

研究成果の概要（英文）：Immunostaining of the brain tissue and cochlea was performed at the circadian time when the expression level of circadian rhythm protein was the highest. Brain tissues were subjected to free floating sections, frozen sections, and paraffin sections, and the cochlea to surface preparation, frozen sections and paraffin sections. Only PER1 and PER2 positive cells could be observed in the suprachiasmatic nucleus of the floating section of the brain. The expression of the circadian protein in the cochlea was difficult to evaluate because of the autofluorescence. In another experiment, C57BL / 6J was exposed to intense sound. The ABR thresholds were greater in animals exposed to noise in the daytime than those exposed in the nighttime both 24 hours and 2 weeks after noise exposure, which was inconsistent with the findings in a previous study.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：蝸牛 内耳 時間 易障害性

## 1. 研究開始当初の背景

概日リズム(サーカディアン・リズム)は内在的に形成され、光、温度、食事など外界からの刺激によって修正される。この体内時計を考慮して投薬を行うことで、薬の効力を増し、副作用や毒性を減らす可能性が指摘されている。抗がん剤などでは投与時期により腎毒性に差が生じることも知られている。聴覚では耳鳴の重症度の日内変動が知られ、マウスの音響外傷では曝露時間帯の違いにより障害に差が出るのが近年報告されたが、まだこの領域の研究はほとんどなされていない。

シスプラチンは長期反復投与で感音難聴を引き起こし、また発展途上国では廉価のアミノ配糖体による耳毒性が大きな問題となっている。投与時間帯の違いにより薬剤による内耳障害を減らすことができれば大きな福音である。

内耳における概日リズムの意義を明らかにするには概日リズム関連タンパク質の *in situ* 解析が必要不可欠である。本研究では内耳透明化手法(Urata et al. eLIFE 2019)を用いた全内耳解析(四次元解析)を行い、内耳における概日リズム制御機構の解を目指す。また、概日リズムに介入し薬剤性、騒音性などの病的難聴の予防・治療法の確立を目指している。

## 2. 研究の目的

内耳の概日リズム研究は少なく、内耳を構成する細胞群間における包括的な観察はされていない。本研究は、内耳における概日リズム関連タンパク質の活性動態を明らかにし、リズム制御に介入することで内耳障害の予防・改善可能かを検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、陽性制御の *Clock*・*Bmal1*、陰性制御の *Per*・*Cry* 遺伝子群の概日変動について、透明化技術(Urata et al. 2019 eLIFE)を用いて内耳(蝸牛、前庭)のすべての細胞について評価する。また、耳毒性薬剤投与や強大音響曝露の日内のタイミングの影響について解析し、概日リズム遺伝子発現やストレスホルモン・BDNF などの神経賦活因子の発現への影響を調べる。更に、ストレスホルモンの関与についても検証する為、TrkB agonist である 7,8-dihydroxyflavone (DHF)の投与による負の効果が抑制できるかについての検討を行う。概日リズムの内耳内の発現につき、日中の異なる時間帯で夜行性の CBA マウスを断頭・固定し、内耳全体を透明化して免疫染色で観察する。概日リズムに関与するすべての分子につき検討を加えるが、特に陽性制御の *Clock*・*Bmal1*、陰性制御の *Per*・*Cry* 遺伝子群につき詳細に調べる。

### 3-1. 内耳における *Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry* タンパク質の発現を確認

CBA マウスの脳(視交叉上核)、内耳を用いてサーカディアン時刻(CT)0, 4, 8, 12, 16, 20 における *Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry* の発現を免疫染色法にて確認する。また、内耳におけるタンパク質発現量を視交叉上核と比較を行う。

### 3-2. 傷害モデルを用いた概日リズム関連タンパク質発現量の比較

3-1の結果より各種概日リズム関連タンパク質の発現量が最も少ない時間と多い時間に強大音響曝露、または耳毒性薬剤の投与(エタクリン酸静注・カナマイシン筋注、シスプラチン静注、ゲンタシン局所投与)による聴覚または前庭障害後のタンパク質発現量の測定を行う。また、ストレスホルモン・BDNF などの神経賦活因子の発現パターンを調べる。

### 3-3. 概日リズムへの介入での内耳障害予防・治療法の確立

先行研究で BDNF の関与が示唆されていることから TrkB agonist である 7,8-dihydroxyflavone (DHF)の投与による負の効果が抑制できるかについての検討を行う。また、血中ストレスホルモン量の測定を行い、agonist または antagonist 投与による修飾効果を調べる。

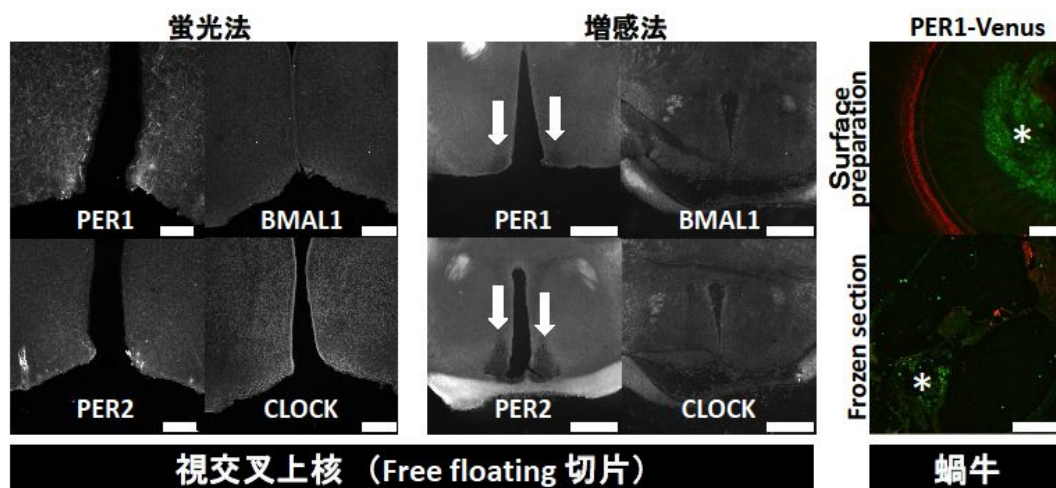
## 4. 研究成果

### 4-1. 概日リズム関連タンパク質可視化

先行研究より各概日リズムタンパク質の発現量をもっとも多いとされているサーカディアン時刻(CT)での解析を行った(*Clock*, CT0: *Bmal1*, CT0: *Per1*, CT12: *Per2*, CT12)。CBA マウスの右心室よりリン酸緩衝液(PBS)で前灌流、50ccの4%パラホルムアルデヒドで心灌流固定後、脳と側頭骨を摘出した。側頭骨は10%EDTAにて脱灰を行った。脳組織は free floating 切片、凍結切片、パラフィン切片を作成した。脱灰後の側頭骨より内耳を摘出し、surface preparation、凍結切片、パラフィン切片を作成した。全

での切片において蛍光免疫染色と酵素抗体法(増感法:ABC法)を行った。陽性コントロールとして視交叉上核を用いて評価を行った。結果は蛍光法、増感法ともに floating 切片の視交叉上核での PER1 と PER2 のみ陽性細胞を確認できた(図1矢印)。蝸牛内での発現は自家蛍光が強く評価困難であった。以上の結果は複数回行って結果は変わらなかった為、免疫染色法での概日リズムタンパク質の動態解析は困難であると思われた。現在、PER1-Venus, PER2-DsRed マウスを導入し前述と同様の方法で解析を行っており、ラセン神経節細胞における PER1 陽性細胞を確認している(図1アスタリスク、緑:PER1-Venus 陽性細胞、赤:F-actin)。

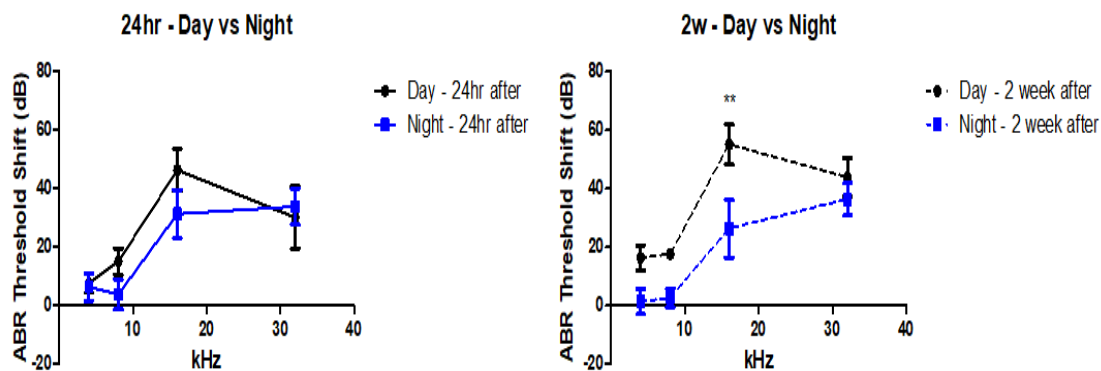
図 1



#### 4-2. 異なる CT での音響障害程度の評価

先行研究(Metler et al. 2014 Curr Biol)では CBA マウスでは日中での騒音暴露群は夜間における暴露群と比較し聴性脳幹反応 (ABR) の閾値が低いと報告している。我々はトランスジェニックマウスと同系統である C57BL/6J を用いて先行研究と同等の強大音条件にて (free field broadband noise at 6-12 kHz, 105dB, 1h)、CT3-5(Day)もしくは CT14-16(Night)にて強大音暴露を行った。結果は、暴露後 24 時間後、2 週間いずれの群においても日中の強大音暴露群は夜間暴露群に比べて ABR 閾値が上昇しており先行研究と矛盾する結果であった(図 2)。マウス種間での抵抗性の可能性も否定できず現在 CBA マウスを用いて同様の条件での強大音暴露後の聴覚機能測定を行っている。

図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Urata S, Iida T, Yamamoto M, Mizushima Y, Fujimoto C, Matsumoto Y, Yamasoba T, Okabe S.           | 4. 巻<br>8            |
| 2. 論文標題<br>Cellular cartography of the organ of Corti based on optical tissue clearing and machine learning | 5. 発行年<br>2019年      |
| 3. 雑誌名<br>Elife   | 6. 最初と最後の頁<br>e40946 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.7554/eLife.40946  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>浦田真次、飯田忠恒、水嶋優、藤本千里、松本有、岡部繁男、山岨達也 |
| 2. 発表標題<br>組織透明化と機械学習を用いた蝸牛地図作成             |
| 3. 学会等名<br>第28回日本耳科学会総会・学術講演会               |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shinji Urata, Tadatsune Iida, Yu Mizushima, Chisato Fujimoto, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba and Shigeo Okabe |
| 2. 発表標題<br>Rapid clearing and labeling of mouse cochlea by modified Sca/eS enable exhaustive analysis of hair cell       |
| 3. 学会等名<br>第70回日本細胞生物学会（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shinji Urata, Tadatsune Iida, Yu Mizushima, Chisato Fujimoto, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba and Shigeo Okabe |
| 2. 発表標題<br>Cellular cartography of the organ of Corti based on tissue clearing and machine learning                      |
| 3. 学会等名<br>48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2018（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)               | 備考 |
|-------|--|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 吉川 弥生<br><br>(Kikkawa Yayoi)<br><br>(00452350) | 東京大学・医学部附属病院・助教<br><br><br>(12601)  |    |
| 研究分担者 | 近藤 健二<br><br>(Kondo Kenji)<br><br>(40334370)   | 東京大学・医学部附属病院・准教授<br><br><br>(12601) |    |
| 研究分担者 | 松本 有<br><br>(Matsumoto Yu)<br><br>(80548553)   | 東京大学・医学部附属病院・講師<br><br><br>(12601)  |    |