

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09908

研究課題名（和文）蝸牛組織マクロファージの加齢性難聴における役割

研究課題名（英文）The role of cochlear resident macrophages in age-related hearing loss

研究代表者

岡野 高之（OKANO, Takayuki）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：60642931

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）：内耳のマクロファージを標的とした難聴に対する新規治療を開発するにあたり、その由来組織や動態を解明することが求められている。加齢性難聴におけるCsf1伝達系の解析により、Csf1シグナルが内耳の骨形成だけでなく、成体マウスの蝸牛の靭帯および血管条における組織マクロファージの維持にも重要であると考えられた。また、内耳組織マクロファージは生後も胎生肝および骨髄から供給され入れ替わりがみられ、またマクロファージの由来組織が卵黄嚢 胎生肝 骨髄と移行することが示唆された。本研究の実施により、今後、加齢性難聴を予防、治療するため、内耳組織マクロファージを標的とした治療開発に向けた基礎的な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蝸牛の組織マクロファージは、内耳の恒常性を維持し、内耳の損傷に続いて免疫学的に最前線で防御機構の一部として役割を担うと考えられている。ただし蝸牛組織マクロファージの役割の詳細は知られておらず、今後内耳のマクロファージを標的とした難聴に対する新規治療を開発するにあたり、基盤となる知識としてその由来組織や動態を解明することが求められている。本研究の実施により、今後の増加の一途を辿る加齢性難聴を予防、治療を見据えて、骨髄由来の内耳組織マクロファージを標的とした新たな治療法を模索するための基礎的な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of development of novel therapies for hearing loss that target macrophages in the inner ear, there is a need to elucidate their tissue of origin and dynamics. Analysis of the Csf1 signaling pathway in age-related hearing loss suggests that Csf1 signaling is important not only for inner ear bone formation, but also for the maintenance of resident macrophages in the spiral ligament and stria vascularis in adult mouse cochlea. In addition, it was suggested that resident macrophages in the mouse inner ear are supplied and replaced by fetal liver and bone marrow after birth, and that the tissue from which macrophages originate migrates from the yolk sac, fetal liver, or bone marrow. This study provides basic knowledge for the development of therapies targeting resident macrophages in the inner ear to prevent and treat age-related hearing loss in the future.

研究分野：内耳の免疫学

キーワード：加齢性難聴 内耳性難聴 免疫 組織マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

かつて内耳は免疫学的に特異的な場所であるとされたが、その後組織マクロファージが内耳に定常状態で存在することが分かり、マクロファージが内耳の免疫において重要な役割を果たすことが示唆されている。哺乳類の蝸牛では炎症のない定常状態であっても、ラセン靭帯、ラセン神経節、および血管条に組織マクロファージが常在している。蝸牛の組織マクロファージは、内耳の恒常性を維持し、内耳の損傷に続いて免疫学的に最前線で防御機構の一部として役割を担うと考えられている。ただし蝸牛組織マクロファージの役割の詳細は知られておらず、今後内耳のマクロファージを標的とした難聴に対する新規治療を開発するにあたり、基盤となる知識としてその由来組織や動態を解明することが求められている。

2. 研究の目的

本研究では以下の2点も目的として実験を行った。

1) 加齢性難聴におけるコロニー刺激因子-1 (Csf1) 伝達系の役割の解明

マクロファージは加齢性難聴を示す蝸牛でその密度が増加するが、その役割は知られていない。マクロファージの活性化に大きな影響をもつCsf1伝達の役割について、成体マウスで遺伝子改変マウスを用いて検討し、表現型の解析を通して成体における非傷害時の内耳組織マクロファージの役割を考察する。

2) 骨髄由来単球の動態に着目した生後マウス内耳におけるマクロファージ由来組織の同定

我々は、現時点で有効な手段が確立されていない感音難聴の新たな治療標的として、内耳のマクロファージがその候補となると考えている。マクロファージが組織修復的、もしくは組織保護的に作用する分化誘導を行うのが一つの戦略となる。他方、血液内耳関門の存在により内耳への薬物の運搬や遺伝子導入が困難となっているが、マクロファージを治療的薬物や遺伝子の運搬体として用いることがもう一つの戦略の候補である。これらの新奇治療の開発の基礎として、生後のマウスの組織マクロファージの由来組織を詳細に検討し、感音難聴の新規治療法開発に結び付ける。

3. 研究の方法

実験1: Csf1シグナル伝達は、マクロファージや単球系の生存、増殖、および組織マクロファージの分化を調節し、内耳の組織マクロファージに不可欠であると考えられている。聴覚機能におけるCsf1シグナル伝達の役割を調べるために、ホモ接合型Csf1変異体 (*Csf1 op / op*) マウスの耳小骨と内耳の表現型を検討した。耳小骨、および内耳骨包の表現型については、マウスからキヌタ骨とアブミ骨を取り出したのち、そのままマクロの形態を検討した。また固定脱灰を経て凍結切片を作製し、HE染色で内耳骨包の組織像を検討した。また内耳でのマクロファージをIba1、またはF4/80、CD68に対する免疫組織化学で可視化して、ホモ接合型変異体とヘテロ接合型のマクロファージの密度と分布を比較検討した。血管条の微小血管はCD31やvWFで可視化して、マクロファージと血管内皮細胞の位置関係を解析した。また聴力を聴性脳幹反応 (ABR) で測定して、ホモ接合型変異体とヘテロ接合型の聴覚の差異を検討した。

実験2: マウス内耳マクロファージの由来組織について、新生仔から生後14日目、30日目、60

日目の時点で検討をおこなった。卵黄嚢の造血が阻害される *Csf1r* 欠損マウス、および骨髄由来の血球細胞が TdTomato でラベルされる *Ms4a3TdT* 遺伝子改変マウスを用いて、内耳マクロファージの分布、密度とそれらの由来組織の割合を検討した。実験 2 でも固定と脱灰を経て、内耳の凍結切片を作製して、組織マクロファージを *Iba1*、または *CD11b* に対する免疫組織化学で可視化して、由来組織を検討した。マクロファージの密度の計測には、ImageJ を用いてマクロファージの計数と内耳の関心領域の断面積の計測をおこなった。

4 . 研究成果

実験 1:

Csf1 op / op マウスの側頭骨およびアブミ骨を含む耳小骨は肉眼的に骨の肥厚を示し、内耳の耳包も厚く不透明であった。組織学的分析は、*Csf1 op / op* マウスの耳包が肥厚し、海綿骨変性を示した。聴覚脳幹反応の測定により、野生型同腹仔と比較しての *Csf1 op / op* マウスでは聴覚閾値が大幅に上昇し、*Csf1 op / op* マウスが、少なくとも一部は耳小骨の変形によって、難聴を示していることが判明した。また *Csf1 op / op* マウスは、ラセン靭帯と血管条の *Iba1* 陽性マクロファージの密度が減少していた。これらの結果より、*Csf1* シグナル伝達が内耳の骨形成だけでなく、成体マウスの蝸牛の螺旋靭帯および血管条における組織マクロファージの維持にも重要であると考えられた。

実験 2 :

卵黄嚢由来の内耳組織マクロファージは生後14日目付近で急速にその割合を減少させた。青直後や生後14日目では胎生肝由来のマクロファージの割合が高かった。一方で骨髄由来の内耳組織マクロファージは生後14日目、30日目、60日々と徐々に割合および密度を増加させた。これらの結果は、内耳組織マクロファージは生後も胎生肝および骨髄から供給され入れ替わりがみられ、またマクロファージの由来組織が卵黄嚢 胎生肝 骨髄と移行することから、小腸や真皮の組織マクロファージと同様の動態を示すことが示唆された。

内耳のマクロファージは当初は中枢神経系の組織マクロファージであるマイクログリアと同様のマーカータンパクを発現し形態も類似することから、内耳組織マクロファージの大部分がマイクログリアと同様に卵黄嚢由来だと予想していたが、予想に反して生後は胎生肝や骨髄からダイナミックに供給を受けており、またそれらは内耳の部位によって異なることが明らかとなった。先行研究では骨髄キメラマウスを用いて骨髄由来の単球が内耳に移入することが示されていたが本研究の結果では骨髄移植のための放射線照射などの影響を排除した状況でも、胎生肝や骨髄から持続してマクロファージの供給を受けており、常にゆっくりと置換されていることが判明した。本研究の実施により、今後の増加の一途を辿る加齢性難聴を予防、治療を見据えて、骨髄由来の内耳組織マクロファージを標的とした新たな治療法を模索するための基礎的な知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Miwa Toru, Okano Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Inner Ear Macrophages and Autoimmune/Autoinflammatory Mechanisms in the Pathophysiology of Inner Ear Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2022.861992	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 Iemura-Kashiwagi Maho, Okano Takayuki, Iwai Noriko, Taniguchi Mirei, Omori Koichi	4. 巻 155
2. 論文標題 Prognosis of otitis media with effusion in pediatric patients with cleft palate during language-acquisition period treated by simultaneous tympanostomy tube placement with palatoplasty	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology	6. 最初と最後の頁 111071 ~ 111071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijporl.2022.111071	査読の有無 有
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 Kanemaru Shin-ichi, Kanai Rie, Omori Koichi, Yamamoto Norio, Okano Takayuki, Kishimoto Ippei, Ogawa Kaoru, Kanzaki Sho, Fujioka Masato, Oishi Naoki, Naito Yasushi, Kakehata Seiji, Nakamura Hajime, Yamada Shinobu, Omae Kaoru, Kawamoto Atsuhiko, Fukushima Masanori	4. 巻 online ahead of prin
2. 論文標題 Multicenter phase III trial of regenerative treatment for chronic tympanic membrane perforation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 S0385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2021.02.007	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 Okano Takayuki, Kishimoto Ippei	4. 巻 10
2. 論文標題 Csf1 Signaling Regulates Maintenance of Resident Macrophages and Bone Formation in the Mouse Cochlea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2019.01244	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	西村 幸司 (NISHIMURA Koji) (20405765)	滋賀県立総合病院(研究所)・その他部局等・嘱託研究員 (84203)	
研究分担者	山本 典生 (YAMAMOTO Norio) (70378644)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

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