

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09918

研究課題名(和文) 耳鳴を生み出す聴覚神経回路網変化機構の解明

研究課題名(英文) The study on the neuronal mechanism of tinnitus in the auditory centers.

研究代表者

小野 宗範 (ONO, Munenori)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30422942

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)：内耳損傷による聴力低下が興奮性細胞と抑制性細胞の活動バランスを変化させることを発見した。音響暴露による聴力低下2か月後に、下丘における興奮性細胞と抑制性細胞の神経活動を記録したところ、正常動物では抑制性細胞の自発活動は興奮性細胞に比べて高いのに対して、聴力が低下した動物では逆に興奮性細胞の活動が亢進していることを発見した。加えて耳鳴緩和のための近赤外レーザー光による聴神経刺激装置の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耳鳴は感音難聴にしばしば随伴する。超高齢化社会を迎えた現在、老年性難聴の患者は増加し、同時に耳鳴にも悩まされている。本研究において耳鳴の原因と考えられる神経活動変化が発見されたことで、これまで不可能であった耳鳴を抑制するための治療開発に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that the deafness caused by acoustic trauma induced the alteration in the balance of the activities of inhibitory and excitatory neurons in the auditory center. In control animals, the spontaneous firing rate was higher in inhibitory neurons than in excitatory neurons. However, in the animals with acoustic trauma, the spontaneous firing rate was enhanced in excitatory neurons only, so that the balance of spontaneous activities between inhibitory and excitatory neurons was inverted. Further, we developed the infrared laser stimulation apparatus, which aimed to stimulate the auditory nerve and relieve the tinnitus induced by deafness.

研究分野：神経科学

キーワード：耳鳴 難聴 興奮性神経/抑制性神経

1. 研究開始当初の背景

耳鳴は感音難聴にしばしば随伴する。超高齢化社会を迎えた現在、老年性難聴の患者は増加し、同時に耳鳴にも悩まされている。内耳損傷等により聴神経を通じた中枢への音情報の入力低下した場合、入力の減弱を補償するために聴覚神経回路内での神経活動が過度に亢進する。この異常な神経活動が耳鳴を生み出すと考えられているが、聴覚神経回路内での神経活動亢進は、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの活動バランスの障害によることが想定されていた。興奮性ニューロンは他のニューロンの活動を引き起こし情報の伝達を担う一方、抑制性ニューロンは他のニューロンの活動を抑えることで神経回路の活動を制御し適切な情報伝達の形成に寄与する。耳鳴の原因となる異常な神経活動亢進の背景には、これらの興奮/抑制ニューロンネットワークの間での活動バランスが難聴による入力低下を補償する過程で崩れることが有力な仮説として考えられていた(Eggermont and Roberts, 2015)。しかしながら、生体内の興奮性/抑制性ニューロンの活動を識別することは従来困難であった。そのため、耳鳴と興奮/抑制ニューロンの活動特性との関係は不明であった。

また、耳鳴の治療には聴覚神経回路内での神経活動亢進を抑制する必要があるが現在有効な手段は知られていない。ただし、興味深い症例として高度感音性難聴であり術前に耳鳴に悩まされていた患者が人工内耳の術後に耳鳴が消失したこと(Ito and Sakahihara, 1994)が報告されている。このことから人為的に聴神経の活動を亢進させることで聴覚神経回路内での神経活動亢進を抑制できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、耳鳴の背景にある中枢神経回路活動の変化を解明することである。さらに、その応用として聴神経の活動操作による耳鳴の緩和方法の開発を目指した。

3. 研究の方法

神経活動記録は、聴覚中枢路における音情報処理の要であり耳鳴との関係が深いとされる下丘から行った。興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを記録時に識別するために VGAT-ChR2 マウスを使用した。この遺伝子改変動物の脳内では抑制性ニューロンに特異的に光感受性膜タンパクであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) が発現している。ChR2 は光刺激によって活性化され発現細胞の活動を引き起こす。そのため、活動記録中に記録細胞に対して光刺激を行うと抑制性ニューロンは活動を起こすが、興奮性ニューロンは逆に活動が抑制される。このように光刺激に対する応答を観察し、細胞種を同定する。耳鳴モデルマウスの作成は音響暴露による内耳障害を利用する。本研究では突発性難聴において見られるような高度の聴力低下による急性期の耳鳴ではなく、中程度の内耳障害によって遅発的に起こる慢性耳鳴のモデルを用いる。音響暴露後は定期的に聴性脳幹反応を記録することで暴露後の聴力の変化の推移を観察する。マウスにおいて聴力低下後の中枢神経での可塑的变化が安定すると考えられる 2 か月後に下丘から神経活動を記録し比較する。開頭手術後動物の回復を待ち、光ファイバーを装着した微小ガラス電極を覚醒動物の下丘に挿入し単一細胞からの電気活動記録を計測する。電気活動記録時には神経細胞の自発活動に加えて音に対する反応性を検証する。電気活動記録後は動物を灌流固定、脳標本を作製し、組織学的検証を行う。これらの実験により耳鳴の背景にある神経回路変化を電気生理学および形態学によって明らかにする。

また聴神経の人為的な活動亢進のための方法として、実験計画時は DREADD 技術を応用することを考えていたが、より非侵襲的で臨床応用に近いと考えられる近赤外レーザー刺激法を適用することにした。これまでの研究から、近赤外レーザー光を内耳に照射することで聴神経を刺激し聴感覚を惹起できることが知られている(Richter et al., 2008)。この方法を応用し慢性的に中耳に埋め込んだ光ファイバーを通じた内耳の近赤外レーザー刺激システムの開発を目指した。

4. 研究成果

(1) 内耳損傷による聴力低下が興奮性細胞と抑制性細胞の活動バランスを変化させることを発見した (Ma et al., 2020)。音響暴露による聴力低下2か月後に、下丘における興奮性細胞と抑制性細胞の神経活動を記録したところ、正常動物では抑制性細胞の自発活動は興奮性細胞に比べて高いのに対して、聴力が低下した動物では逆に興奮性細胞の活動が亢進していることを発見した (図1)。この変化に伴って活動電位の形状にも変化が見られたことから下丘細胞において後シナプスでの活動電位発生メカニズムに変化が生じていることが示唆された。

この知見をもとに後シナプスでの活動電位発生メカニズムに關与する構造として軸索起始部に対する聴力低下の影響を形態学的に検証した。脳幹部において聴力低下により形態変化が観察されると報告されている1週間後の下丘の軸索起始部における変化を検証した。この結果1週間後では軸索起始部の長さ、直径には変化がないことが判明した。現在もう一つの重要なパラメータである細胞体からの距離を計測している。また音響暴露後2か月後までの形態変化についても検証を進めている。また軸索起始部の形態変化に加えて、樹状突起を含めたニューロン全体の形態変化についても、ウイルスベクターを用いた可視化による検証を進めている。

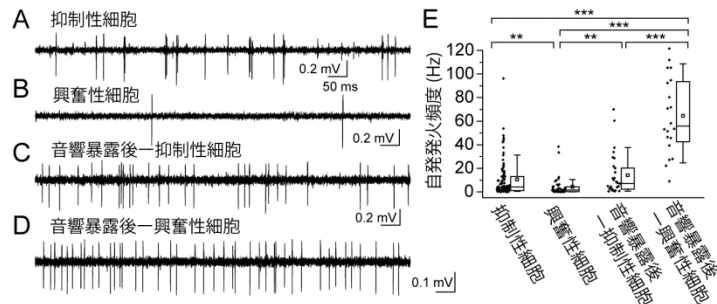


図1 聴力低下による下丘興奮性/抑制性活動バランスの変化 (A-D) 下丘細胞からの電気活動記録。棘状の活動電位の発生 (自発発火) が音響暴露後に興奮性細胞 (BとDを比較) で大幅に増加するのが見られる。一方抑制性細胞では大きな変化は見られない (AとC)。E. 自発発火頻度の比較。通常は抑制性細胞の自発発火頻度は興奮性細胞よりも高いが、聴力低下により関係が逆転する。** P < 0.01, *** P < 0.001, Steel-Dwass test.

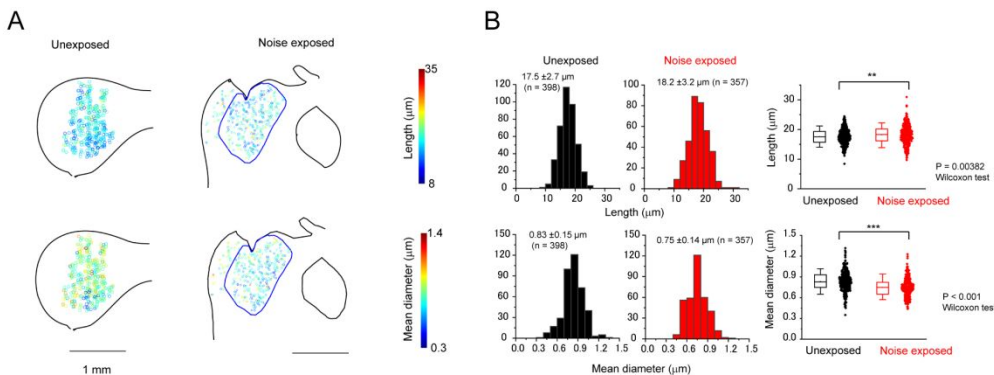


図2 下丘における聴力低下の軸索起始部形態に対する影響の定量化。軸索起始部の形態のパラメータとして長さ (A, 上段) と直径 (A, 下段) を計測した。A. 左が正常動物、右が音響暴露された動物からの記録例。長さ、直径ともに下丘内では様々な大きさの軸索起始部が混在していることが確認された。B. 正常動物と音響暴露された動物との間の軸索起始部の定量的比較。長さ、直径ともに音響暴露後1週間ではほとんど変化がないことが確認された。

(2) 近赤外レーザー光を発生させる安価な機械の開発を行った。過去の研究から聴神経に活動を引き起こすための近赤外レーザー光はパルス当たり最低 $4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ 程度のエネルギーを持つことが必要であることが分かっている (Tan et al., 2015)。しかしこのような近赤外レーザーパルス光を発生させることのできる装置は一般的に極めて高額となる。そこで市販の安価なレーザーダイオードを用いて聴神経刺激を行うことが可能な出力を持つ近赤外レーザー光発生装置の作成を試みた。その結果レーザーダイオードと MOSFET を組み合わせたレーザー光発生装置によって聴神経刺激に必要な強度のレーザー光パルスを得ることができた。現在はこのシステムを用いた聴神経刺激プロトコールの確立に取り組んでいる。

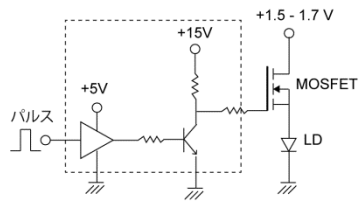


図3 レーザーパルス発生回路図
破線で囲われた部分の回路で増幅された電圧パルスをMOSFETに入力ゲートを制御することで、レーザーダイオード(LD)にパルス時間幅の電流が流れる結果パルス状のレーザー光を発生させる。

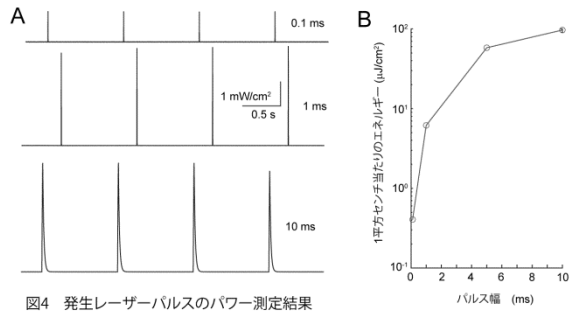


図4 発生レーザーパルスのパワー測定結果
Aは異なるパルス幅のレーザー光のパワー測定結果。Bは1パルスの持つ平方センチ当たりのエネルギーをパルス幅に対してプロットしたグラフ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Takashi, Ito Tetsufumi, Sumizono Megumi, Ono Munenori, Kato Nobuo, Honma Satoru, Ueno Masaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Combinational Approach of Genetic SHP-1 Suppression and Voluntary Exercise Promotes Corticospinal Tract Sprouting and Motor Recovery Following Brain Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurorehabilitation and Neural Repair	6. 最初と最後の頁 558 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1545968320921827	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 Xu Feng, Ono Munenori, Ito Tetsufumi, Uchiyama Osamu, Wang Furong, Zhang Yu, Sun Peng, Zhang Qing, Yamaki Sachiko, Yamamoto Ryo, Kato Nobuo	4. 巻 529
2. 論文標題 Remodeling of projections from ventral hippocampus to prefrontal cortex in Alzheimer's mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.25032	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 Ono Munenori, Bishop Deborah C., Oliver Douglas L.	4. 巻 385
2. 論文標題 Neuronal sensitivity to the interaural time difference of the sound envelope in the mouse inferior colliculus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 107844 ~ 107844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heares.2019.107844	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Ryo, Furuyama Takafumi, Sugai Tokio, Ono Munenori, Pare Denis, Kato Nobuo	4. 巻 123
2. 論文標題 Serotonergic control of GABAergic inhibition in the lateral amygdala	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 670 ~ 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00500.2019	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 該当する

1. 著者名 Ma Lanlan, Ono Munenori, Qin Ling, Kato Nobuo	4. 巻 391
2. 論文標題 Acoustic trauma induced the alteration of the activity balance of excitatory and inhibitory neurons in the inferior colliculus of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 107957 ~ 107957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heares.2020.107957	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 該当する

1. 著者名 Kishimoto Ippei, Okano Takayuki, Nishimura Koji, Motohashi Tsutomu, Omori Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Early Development of Resident Macrophages in the Mouse Cochlea Depends on Yolk Sac Hematopoiesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.01115	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 西村幸司、野田哲平、大森孝一	4. 巻 33
2. 論文標題 ダイレトリプログラミングによる蝸牛神経の再生	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス	6. 最初と最後の頁 62-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小野 宗範, 馬 蘭蘭, 加藤 伸郎
2. 発表標題 音響障害によっておこるマウス下丘における興奮性 - 抑制性細胞 活動バランスの改変
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 哲史, 劉 麗, 古山 貴文, 小野 宗範
2. 発表標題 機能的に同定したマウス聴覚野サブ領野への聴覚視床を經由した 2 シナプス経路の可視化
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野宗範, 伊藤哲史, 堀佳江, 山木幸子, 許峰, 馬蘭蘭, 加藤伸郎
2. 発表標題 3xTgアルツハイマーモデル動物脳内のアミロイド 蓄積パターンの免疫組織学的解析
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村幸司、康本明吉、大森孝一
2. 発表標題 マウス後半規管經由ウアバイン局所投与による前庭神経節への影響
3. 学会等名 第79回日本めまい平衡医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村幸司
2. 発表標題 Cochlear Implants Meet Regeneration of Primary Auditory Neurons
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ono M, Bishop DC, Oliver DL.
2. 発表標題 Neuronal sensitivity to the interaural time difference of the sound envelope in the mouse inferior colliculus.
3. 学会等名 日本音響学会聴覚研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬蘭蘭, 小野宗範, 加藤伸郎
2. 発表標題 Aberrant balance between the excitatory and inhibitory neuronal activities in the inferior colliculus after the cochlear insults.
3. 学会等名 第42回神経科学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野宗範, 大森治紀, 村本進司, 山木幸子, 許峰, 馬蘭蘭, 吳祖波, 加藤伸郎
2. 発表標題 Simultaneous in vivo recording of the electrical activities and the signal of fluorescent calcium indicator in the hippocampus of Alzheimer's mouse model.
3. 学会等名 第42回神経科学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhao Qin, 山本亮, 伊藤哲史, 小野宗範, 加藤伸郎
2. 発表標題 Retrograde tracing study on dopaminergic innervations unto the CeA and BNST
3. 学会等名 第42回神経科学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野宗範
2. 発表標題 Simultaneous in vivo recording of the electrical activities and the signal of fluorescent calcium indicator in the hippocampus of Alzheimer's mouse model.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishimura K, Ogita H, Meas SJ, Taura A, Ito J.
2. 発表標題 Generation of a mouse model of unilateral vestibular dysfunction.
3. 学会等名 The 42nd annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishimura K, Yasumoto A, Meas SJ, Ogita H, Taura A, Ito J, Omori K.
2. 発表標題 Pharmacological Ablation of Vestibular Hair Cells or Ganglion Neurons to Generate a Model of Unilateral Vestibular dysfunction.
3. 学会等名 Symposium & 56th Inner Ear Biology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村幸司、山本典生、岡野高之、大森孝一
2. 発表標題 人工内耳電極入れ替え症例の検討.
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村幸司、康本明吉、扇田秀章、田浦晶子、伊藤壽一
2. 発表標題 一側性前庭モデルマウスの作製
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村幸司、楯谷智子、岡野高之、大森孝一
2. 発表標題 前庭性片頭痛とBPPV様めまいを合併した両側外側半規管低形成例
3. 学会等名 第78回めまい平衡医学会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ito T, Ono M, Oliver DL. (edited by Karl Kandler)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Oxford University Press	5. 総ページ数 768
3. 書名 Th Oxford Handbook of the Auditory Brainstem.	

1. 著者名 小野宗範（生物音響学会編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 464
3. 書名 生き物と音の事典	

〔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)	京都大学・医学研究科・助教 (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