

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18792

研究課題名(和文) Cochlear synaptopathyに対する予防法・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of preventive and therapeutic methods for cochlear synaptopathy

研究代表者

鈴木 淳 (Suzuki, Jun)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80735895

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)：グルタミン酸毒性、抗酸化作用、ミトコンドリア障害がcochlear synaptopathyを含めた音響性聴覚障害の発症にどのように関与するかについて研究を行った。内耳研究における代表的なマウス系統であるCBA/CaJとC57BL/6について騒音曝露によるシナプス障害モデルを作成した。ミトコンドリア機能が低下するマウス(Ndufs4ノックアウトマウス)を用いた実験において、Ndufs4が蝸牛内に広く発現すること、Ndufs4が欠失すると騒音曝露による低音域の聴力の悪化が生じやすいこと、Ndufs4が欠失してもcochlear synaptopathyの発症には寄与しないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一過性の聴力低下が生じる程度の騒音曝露により、有毛細胞が無傷であっても不可逆的な内毛細胞シナプスの減少が生じ(cochlear synaptopathy)、加齢性難聴の早期発症や耳鳴症の原因となるとされる。本研究で確立した代表的なマウス系統のシナプス障害モデルは、今後のcochlear synaptopathy研究の基礎となる。またNdufs4の欠失によるミトコンドリア機能低下ではcochlear synaptopathyの発症が促進されないことが示され、cochlear synaptopathyの更なる病態解明の手掛かりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mild noise exposure causing temporary threshold shifts causes an irreversible decrease of inner hair cell synapses (cochlear synaptopathy) and is believed to cause early onset of age-related hearing loss and tinnitus. In this study, we assessed how glutamate toxicity, antioxidants, and mitochondrial dysfunction are involved in the development of noise-induced hearing loss, including cochlear synaptopathy. We established a model mouse of noise-induced cochlear synaptopathy in CBA/CaJ and C57BL/6 mouse strains, representative mouse strains in inner ear research. In experiments using mice with impaired mitochondrial function (Ndufs4 knockout mice), we found that Ndufs4 is broadly expressed in the cochlea, that deletion of Ndufs4 causes deterioration of low-frequency hearing after moderate noise exposure, and that deletion of Ndufs4 does not contribute to the development of cochlear synaptopathy.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科学

キーワード：Cochlear synaptopathy ミトコンドリア障害 グルタミン酸毒性 抗酸化作用 音響性聴覚障害 騒音曝露 Ndufs4

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

工場の大騒音やコンサートの大音響などにより、急性音響性難聴が生じる。損傷が大きく、有毛細胞の脱落が生じると永久的聴力閾値上昇 (PTS: permanent threshold shift) となる。一方、損傷が軽度であれば、有毛細胞の脱落は生じず、一過性の聴覚閾値上昇 (TTS: temporary threshold shift) となり、聴力は自然に回復する。TTS は後遺症をきたさないと従来から考えられてきたが、近年 TTS をきたす程度の軽度の騒音曝露により、有毛細胞が無傷であっても不可逆的な内有毛細胞シナプスの減少が生じ (cochlear synaptopathy) 加齢性難聴の早期発症や耳鳴症の原因となることが報告された (Kujawa and Liberman, J. Neurosci., 2009)。このシナプス障害は、聴性脳幹反応 (ABR) の閾値や光学顕微鏡では検出できないために「Hidden hearing loss」とも呼ばれ、ヒトでも同様の病態が存在すると推定されている (Liberman et al., PLoS ONE, 2016)。全世界で 11 億人もの若者が、音楽プレイヤーやクラブでの騒音曝露により難聴の危険を有するという WHO の報告もあり、cochlear synaptopathy の病態解明および予防法・治療法の開発は急務と考えられる。

内有毛細胞シナプス微細構造の解析により、騒音曝露によるシナプス障害はグルタミン酸の過剰放出・過剰興奮 (グルタミン酸毒性) に起因するものが想定されている。シナプスと無髄蝸牛神経終末の消失が生じた後も、有髄蝸牛神経軸索や蝸牛神経節細胞体の変性が進行していくまでに時間差が存在するとされ、この時間差の間に介入を行うことで、障害の進行を阻止しシナプスを再生させる可能性があると考えられている。これまでに、内有毛細胞シナプスのグルタミン酸毒性制御に着目して cochlear synaptopathy の予防法・治療法検討した報告は極めて少ない。Cochlear synaptopathy の発症には、グルタミン酸毒性のみならず、PTS の発症要因となる酸化ストレスの関与も推測できるが、酸化ストレスが cochlear synaptopathy の病態に関与するのかを評価した報告はない。そこで本研究では、学術的「問い」として、「グルタミン酸毒性と酸化ストレスを軽減することで、cochlear synaptopathy の予防や治療ができるのか」を設定し、グルタミン酸毒性と酸化ストレスという観点から課題に取り組むこととした。当初の研究予定には含まれなかったが、PTS の発症要因となるミトコンドリア機能が cochlear synaptopathy の病態に関与するのかを評価した報告はなく、こちらの研究も併せて施行した。

2. 研究の目的

- (1) グルタミン酸毒性を軽減しうる薬剤の投与により、cochlear synaptopathy を予防・治療できるのかを確かめる。
- (2) PTS の実験系で蝸牛保護作用が実証されている抗酸化剤の投与により、cochlear synaptopathy が予防・治療できるのかを確かめる。
- (3) ミトコンドリア機能が低下することで、cochlear synaptopathy の発症が促進されるのかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) C57BL6 マウスおよび CBA/CaJ マウスに各条件の騒音曝露を行い、cochlear synaptopathy のモデルマウスを作成する。作成したモデルマウスに各薬剤の投与を行い、電気生理学的、および組織学的解析を行う。
- (2) Nrf2 の誘導効果を有する glucoraphanin 含有餌を投与し、他の Nrf2 誘導体同様に PTS の抑制効果があるかを確認する。効果が確認されたら、Nrf2 KO マウスおよび、同じ条件で glucoraphanin 含有餌を投与したマウスに TTS 条件の騒音曝露を行い、シナプス障害に変化が生じるか解析を行う。
- (3) ミトコンドリア機能が低下する Ndufs4 (ミトコンドリア複合体 のサブユニット) 欠損マウスに各条件の騒音曝露を行い、cochlear synaptopathy の発症と Ndufs4 欠損との関係性を評価する。

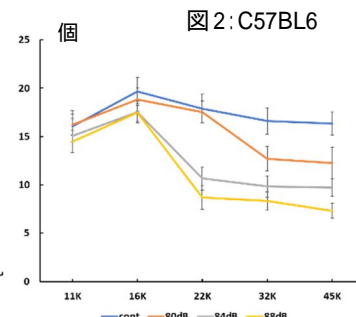
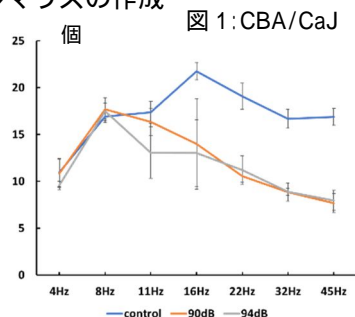
4. 研究成果

(1) Cochlear synaptopathy モデルマウスの作成

8 週齢の CBA/CaJ マウス (図 1) では「8-16kHz, 90dB, 2hr」

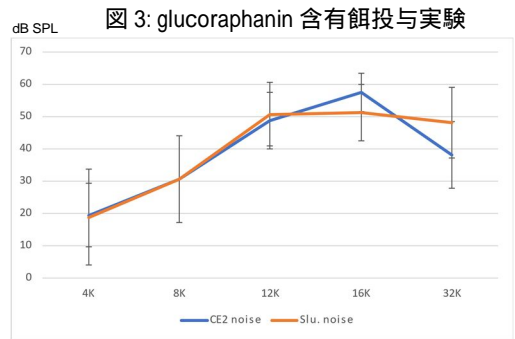
8 週齢の C57BL/6 マウス (図 2) では「8-16kHz, 84dB, 2hr」の条件で、最低限の PTS で cochlear synaptopathy モデルマウスを作成できることを確認した。

上記モデルマウスに対し、リルゾール投与実験を進めている。



(2) Glucoraphanin 含有餌投与実験

Nrf2 の誘導効果を有する 0.1% glucoraphanin を含有した特殊餌を作成し、コントロール餌 (CE-2) で飼育したマウスとの比較を行った。5 週齢から特殊餌の投与を開始し、8 週齢で騒音暴露 (98dB, 8-16kHz, 2hr の PTS 条件) を行った。7 週齢および 10 週齢で ABR 測定を行った。2 群間において、聴力変動 (threshold shifts) には有意な差を認めなかった (図 3)。効果が確認できなかったため、TTS 条件の実験は施行しなかった。

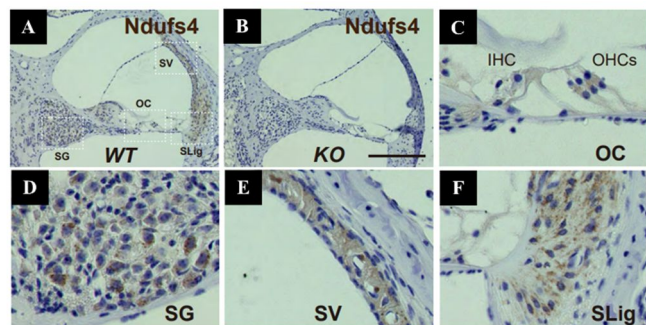


(3) Ndufs4 欠失が騒音暴露後の聴覚に及ぼす影響

NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 4 (Ndufs4) は、ミトコンドリア複合体の合成と安定化に関与するサブユニットである。Ndufs4 の欠失により、ミトコンドリア機能が低下することが知られている。今回、ミトコンドリア機能と音響性聴覚障害との関係性を明らかにする目的に、Ndufs4 KO マウスと野生型 (WT) マウスに騒音暴露を行い、音響脆弱性に関与するかを検討した。

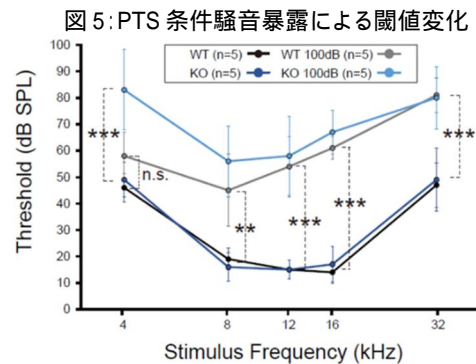
図 4: 蝸牛における Ndufs4 の発現

Ndufs4 KO マウスは 7-8 週齢で死亡するため、P32 で初回 ABR 測定、P34 で各種の騒音暴露を行い、P42 で最終 ABR 測定および組織解析を行った。Ndufs4 の蝸牛での発現を確認するために、免疫染色 (酵素抗体法) を行い、Ndufs4 がコルチ器、らせん神経節、血管条、ラセン靭帯と蝸牛内に広く発現することを確認した (図 4)。



OC: organ of corti, IHC: inner hair cell, OHC: outer hair cell, SG: spiral ganglion, SV: stria vascularis, SLig: spiral ligament.

永続的閾値上昇 (PTS) 条件 (100dB, 8-16kHz, 2hr) の騒音に暴露したところ、WT マウスに比して KO マウスでは 4kHz の ABR 閾値において WT マウスに比較して有意な閾値の上昇を認めた (図 5)。有毛細胞数のカウント、らせん神経節数のカウント、血管条の厚さ測定などの組織解析では、2 群間に有意差を認めなかった。



一過性閾値上昇 (TTS) 条件 (86dB, 8-16kHz, 2hr) の騒音に暴露したところ、ABR 第 1 波振幅、内有毛細胞シナプス数 (図 6、図 7) のいずれにおいても、2 群間に有意差を認めなかった。Ndufs4 欠損は低音域の PTS に関与するが、cochlear synaptopathy の発症には寄与しなかった。

図 6: 共焦点顕微鏡画像

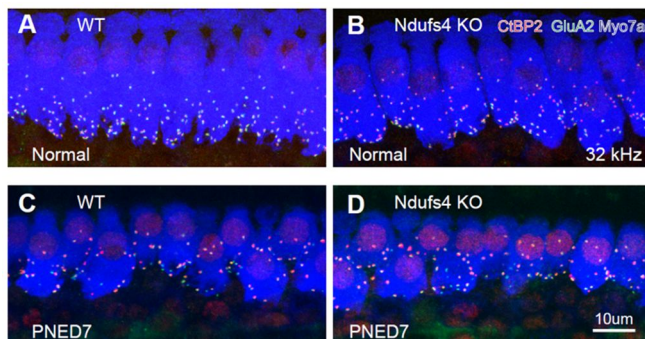
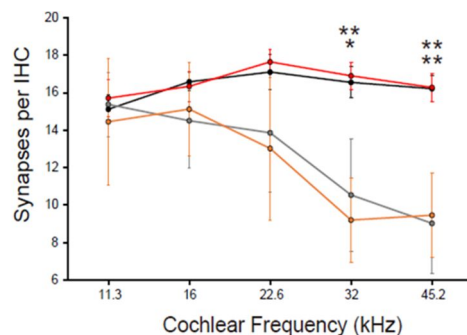


図 7: シナプスの定量



(4) その他

C57BL/6 系統のノックアウトマウスにおける passenger gene の問題、cochlear synaptopathy に対する NT-3 遺伝子治療の効果、3 脂肪酸が増加するマウスの聴力変化について報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Jun, Inada Hitoshi, Han Chul, Kim Mi-Jung, Kimura Ryuichi, Takata Yusuke, Honkura Yohei, Owada Yuji, Kawase Tetsuaki, Katori Yukio, Someya Shinichi, Osumi Noriko	4. 巻 -
2. 論文標題 "Passenger gene" problem in transgenic C57BL/6 mice used in hearing research	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30469-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.10.007	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 Hashimoto Ken, Hickman Tyler T., Suzuki Jun, Ji Lingchao, Kohrman David C., Corfas Gabriel, Liberman M. Charles	4. 巻 9
2. 論文標題 Protection from noise-induced cochlear synaptopathy by virally mediated overexpression of NT3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51724-6	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 該当する
1. 著者名 Honkura Yohei, Suzuki Jun, Sakayori Nobuyuki, Inada Hitoshi, Kawase Tetsuaki, Katori Yukio, Osumi Noriko	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of enriched endogenous omega-3 fatty acids on age-related hearing loss in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-019-4809-8	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 鈴木 淳	4. 巻 258
2. 論文標題 【耳鳴・難聴への効果的アプローチ】Hidden hearing lossとは?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ENTONI	6. 最初と最後の頁 56-62
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 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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Suzuki Jun、Inada Hitoshi、Han Chul、Kim Mi-Jung、Kimura Ryuichi、Takata Yusuke、Honkura Yohei、Owada Yuji、Kawase Tetsuaki、Katori Yukio、Someya Shinichi、Osumi Noriko
2. 発表標題 “Passenger gene” problem in transgenic C57BL/6 mice used in hearing research
3. 学会等名 ARO 2020 第43回米国耳鼻咽喉科研究学会 43rd Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 淳
2. 発表標題 “Hidden hearing loss” の治療法開発にむけて
3. 学会等名 第29回 日本耳科学会 総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Suzuki, Yoshitaka Takanashi, Atsushi Koyama, Yukio Katori
2. 発表標題 Hearing Recovery from Deafness Caused by Bromate Intoxication
3. 学会等名 INTERNATIONAL OTOPATHOLOGY SOCIETY MEETING 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 淳
2. 発表標題 「Hidden hearing loss」の病態解明・治療法開発に向けた内耳基礎研究」
3. 学会等名 第31回 日本耳科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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