

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：82406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24052

研究課題名(和文)内耳障害における蝸牛神経の髄鞘制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Neuroplasticity of auditory neurons in cochlear damage

研究代表者

栗岡 隆臣(Takaomi, Kurioka)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・耳鼻咽喉科学)講師

研究者番号：30842728

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):我々は、伝音難聴による中耳から内耳への音響刺激の減少が蝸牛神経に及ぼす影響と神経可塑性について検討した。マウスの両耳に耳栓を充填し伝音難聴モデルを作成した。耳栓により有意な聴力閾値の上昇を認めたが、耳栓解除後には聴力閾値は完全に回復した。組織学的には、有毛細胞や蝸牛神経の消失は認めなかったが、内有毛細胞と蝸牛神経の接合部シナプス数、蝸牛神経軸索径および髄鞘化が有意に低値となった。これらの組織学的変化は伝音難聴の解消により回復を示した。以上のことから、聴覚刺激に依存して蝸牛神経は可塑性を有すると考えられ、伝音難聴においても蝸牛神経への電気刺激を維持することが重要と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

伝音難聴には真珠腫性中耳炎や慢性中耳炎などがあり、薬物治療や外科的治療が聴力回復に有用と考えられている。薬物治療や外科治療が伝音難聴の治療に有効であることは変わらないものの、長期間の伝音難聴に伴う蝸牛神経への電気刺激の減少は、不可逆的な蝸牛シナプス障害をきたす可能性がある。従って、臨床における伝音難聴においても、長期に放置した場合には蝸牛神経の機能が低下する懸念があることから、早期に外科的治療や補聴器装用で神経活動を維持することが重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文):We investigated the neuroplasticity of auditory neurons (ANs) in adult mice with conductive hearing loss (CHL). Eight week old male mice were bilaterally earplugged for 4 weeks (CHL (+) group) and allowed to survive for a further 4 weeks after removal of the earplugs (CHL (+/-) group). The ABR threshold was significantly elevated across all tested frequencies in the earplugged mice. After removal of the earplugs, the threshold shifts recovered fully. The ABR amplitude significantly decreased and the latency significantly increased for all tested frequencies in the CHL (+) mice. These changes were only partially restored in the CHL (+/-) mice. Auditory deprivation had no significant impact on the survival of the hair cells and ANs. However, the synapses and myelin were significantly damaged, and the neuronal sizes of the ANs were significantly decreased in the CHL (+) mice. These changes also recovered only partially in the CHL (+/-) mice as compared to the CHL (+) mice.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳障害 シナプス 髄鞘 蝸牛神経 難聴

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

内耳機能は加齢に伴って徐々に低下し、難聴や耳鳴等の聴覚障害を呈することから、近年の超高齢化社会においては、この内耳障害が大きな社会問題となっている。申請者は、内耳障害の病態には有毛細胞死や蝸牛神経のシナプス障害、変性・脱髄が関与していると報告してきたが、蝸牛神経の脱髄や髄鞘化を制御する詳細なメカニズムは未だ解明されていない。蝸牛神経への電気刺激が減少することによる神経系の変化は、中枢神経のシナプスや髄鞘などでこれまでに報告されており、さらに蝸牛神経自体の変化も観察されている。これらのことから、蝸牛神経への電気刺激が減少する伝音難聴においても内耳や蝸牛神経の変性をきたす可能性があるが詳細については不明である。

### 2. 研究の目的

蝸牛神経の脱髄・再髄鞘化制御メカニズムの解明を目的として、内耳障害後の蝸牛神経の髄鞘変化と再髄鞘化能の解析を行う。そこで今回我々は、伝音難聴による中耳から内耳への音響刺激の減少が蝸牛神経に及ぼす影響と蝸牛神経の可塑性の有無を明らかにすることを目的として、伝音難聴における聴性脳幹反応 (ABR) の変化及び有毛細胞と蝸牛神経の形態学的変化について評価する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 実験動物

実験にはC57BL/6J マウス (雄, 8週齢) を使用し、両耳に耳栓 (シリコン樹脂印象材) を充填することで伝音難聴モデルを作成した。耳栓を挿入せずに12週齢で評価を行う耳栓 (-) 群 (N=9)、両耳に耳栓を4週間充填し耳栓を解除した直後に12週齢で評価を行う耳栓 (+) 群 (N=9)、両耳に耳栓を4週間充填し、続いて4週間耳栓を解除して16週齢で評価を行う耳栓 (+/-) 群 (N=9) の3群に分けて検討を行なった。

#### 2) 聴性脳幹反応

ミダゾラム、ペドルファール、ドミトールの混合麻酔を腹腔内投与し、聴力閾値をABRにより測定した。波潜時と振幅については、各周波数ごとに80 dB SPL 入力時のABR 波形から抽出した。

#### 3) 有毛細胞・シナプスの評価

4%パラホルムアルデヒドで経心灌流を行った後に、両側の蝸牛を摘出した。EDTAを用いて16時間脱灰しコルチ器を摘出した。1次抗体にはMyosin7a 抗体、CtBP2 抗体を使用した。2次抗体と反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、各周波数領域での有毛細胞生存率とシナプス数を算出した。

#### 4) らせん神経節細胞の評価

摘出した蝸牛をEDTA とグルタルアルデヒドで処理後にEpon で包埋し、厚さ1  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。作成した切片は、トルイジンブルーで染色を行い、観察には光学顕微鏡を使用した。評価には、10000  $\mu\text{m}^2$  あたりのらせん神経節細胞の神経細胞密度を計測した。神経サイズに関しては、20個のらせん神経節細胞を無作為に抽出し、平均神経サイズを算出した。

#### 5) 蝸牛神経髄鞘の評価

摘出した蝸牛をEDTA とグルタルアルデヒドで処理後にEpon で包埋し、厚さ80 nm の切片を作成した。作成した切片は、uranyl acetate とlead citrateで染色を行い、観察には電子顕微鏡

を使用した。100  $\mu\text{m}^2$  あたりの蝸牛神経軸索の密度を計測した。髄鞘評価に関しては、100個以上の軸索を無作為に抽出し、軸索径とG-ratio（髄鞘含まない長径 / 髄鞘含む長径）を算出した。

#### 4 . 研究成果

伝音難聴では、有毛細胞やらせん神経節細胞、蝸牛神経軸索の消失を認めないにも関わらず、有毛細胞と蝸牛神経の接合部シナプスと蝸牛神経径及び髄鞘に障害を認め、ABR で蝸牛神経機能が低下することを明らかにした。伝音難聴後に聴力閾値は完全回復したにも関わらず、ABR の 波の振幅が有意に減少し、潜時も有意に延長したままであったが、耳栓解除1か月後には部分的な回復を示した。組織学的には有毛細胞と蝸牛神経の接合部シナプスを除いて、神経径と髄鞘はほぼ正常レベルに回復した。これらの結果は、シナプス障害や脱髄等の蝸牛神経の変化が、蝸牛神経への電気刺激の減少によって引き起こされたことを示唆している。さらに伝音難聴が解消されると、内耳の組織学および機能的な回復を認めたことから、蝸牛神経は入力される電気刺激に依存して可塑性を有すると考えられる。本結果は、聴覚刺激の増加が蝸牛神経の障害を予防し、聴覚機能低下を軽減させる可能性を示唆している。

## 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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kurioka Takaomi, Mogi Sachiyo, Yamashita Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 Transient Conductive Hearing Loss Regulates Cross-Modal VGLUT Expression in the Cochlear Nucleus of C57BL/6 Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 260 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci10050260	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 Kurioka Takaomi, Sano Hajime, Furuki Shogo, Yamashita Taku	4. 巻 60
2. 論文標題 Speech discrimination impairment of the worse-hearing ear in asymmetric hearing loss	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Audiology	6. 最初と最後の頁 54 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14992027.2020.1795282	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 Kurioka Takaomi, Sano Hajime, Furuki Shogo, Yamashita Taku	4. 巻 8
2. 論文標題 Long-term administration of vitamin B12 and adenosine triphosphate for idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e10406 ~ e10406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.10406	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 Kurioka Takaomi, Mogi Sachiyo, Yamashita Taku	4. 巻 11
2. 論文標題 Decreasing auditory input induces neurogenesis impairment in the hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-80218-z	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 Takaomi Kurioka, Hajime Sano, Shogo Furuki, Taku Yamashita	4. 巻 -
2. 論文標題 Iron deficiency is associated with poor prognosis in idiopathic sudden sensorineural hearing loss	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Laryngology & Otology	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) 10.1017/S0022215121001079	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 Kurioka Takaomi, Mogi Sachiyo, Tanaka Manabu, Yamashita Taku	4. 巻 41
2. 論文標題 Activity-Dependent Neurodegeneration and Neuroplasticity of Auditory Neurons Following Conductive Hearing Loss in Adult Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 31~42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10571-020-00829-y	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 Takaomi Kurioka, Hajime Sano, Shogo Furuki, Taku Yamashita	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of the Conductive Component of Hearing Loss on Speech Discrimination Ability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of International Advanced Otology	6. 最初と最後の頁 93-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5152/iao.2020.7870	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8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 栗岡隆臣
2. 発表標題 左右非対称性難聴における悪聴耳の語音聴取能低下について
3. 学会等名 第40回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗岡隆臣
2. 発表標題 伝音難聴が蝸牛神経に及ぼす影響と神経可塑性について
3. 学会等名 第65回日本聴覚医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗岡隆臣
2. 発表標題 難聴が海馬の神経新生に及ぼす影響について
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗岡隆臣
2. 発表標題 音響性聴覚障害における 蝸牛神経と海馬の障害メカニズムについて
3. 学会等名 第40回日本耳科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaomi Kurioka
2. 発表標題 Activity-dependent Synaptopathy and Demyelination of Auditory Neurons following Conductive Hearing Loss in Adult Mice
3. 学会等名 43th annual meeting of association for Research in Otolaryngology, 2020, San Jose, USA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗岡隆臣
2. 発表標題 伝音難聴が内耳に及ぼす影響について
3. 学会等名 第37回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗岡隆臣
2. 発表標題 混合難聴の伝音成分が語音明瞭度に与える影響について
3. 学会等名 第29回日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗岡隆臣
2. 発表標題 難聴の基礎と臨床～伝音難聴による聴覚障害とその病態解明～
3. 学会等名 神奈川県耳鼻咽喉科セミナー, 2019
4. 発表年 2019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
---------	---------