

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03833

研究課題名(和文) 内毛細胞・蝸牛神経間シナプスをターゲットとした聴覚再生治療の新規開発

研究課題名(英文) Development of regenerative therapy targeting synapses between inner hair cells and cochlear nerves

研究代表者

欠畑 誠治 (Kakehata, Seiji)

山形大学・医学部・名誉教授

研究者番号：90261619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,080,000円

研究成果の概要(和文)：最新の研究により、音響性や薬剤性、加齢性聴覚障害の初期病変として内毛細胞と蝸牛神経間のシナプス病理、Cochlear Synaptopathyの病態が注目されている。本研究では、ROCK阻害薬の蝸牛神経障害に対する再生効果をin vivo実験系で検討し、laser-induced shockwave(LISW)を用いたCochlear synaptopathyモデルに対するROCK阻害薬の効果の検討を行った。ROCK阻害薬10 mM局所投与群で、ABR第I波振幅の再増大及び、シナプス数の増加が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで内耳再生のターゲットは有毛細胞であったが、有意な機能回復までには至っておらず実用にいたっていない。近年、内耳障害は有毛細胞・蝸牛神経間シナプス障害であることが注目されており、神経再生作用を持ち中枢神経系での研究ですでにいくつかの報告があるROCK阻害薬に着目した。本研究の結果により、in vivo実験系でのシナプス障害モデルに対するROCK阻害薬の有効性が示唆された。ROCK阻害薬はすでに承認されている薬剤であるため、応用へのハードルも高くないと思われ、聴覚障害に対する画期的な治療方法となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have focused on the pathogenesis of Cochlear Synaptopathy, a synaptic pathology between inner hair cells and the cochlear nerve, as an early lesion in noise-induced, drug-induced, and age-related hearing loss. In this study, we investigated the regenerative effects of ROCK inhibitors on cochlear synaptopathy in an in vivo experimental system and examined the effects of ROCK inhibitors on the Cochlear synaptopathy model by laser-induced shockwave (LISW). 10 mM local administration of ROCK inhibitor showed a reappearance of ABR I wave amplitude and an increase in the number of synapses.

研究分野：耳科学

キーワード：感音難聴 シナプス 蝸牛 有毛細胞 ROCK阻害薬 LISW 聴神経 聴覚再生

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難聴を引き起こす三大原因は、騒音暴露、薬物、そして加齢である。最新の研究により、音響性や薬剤性、加齢性聴覚障害の初期病変として内毛細胞と蝸牛神経間のシナプス病理、Cochlear Synaptopathy (primary neural degeneration)の病態が注目されている。本病態に起因する聴覚障害 (Hidden Hearing Loss)は、有毛細胞自体の障害は伴わず、内毛細胞・蝸牛神経間のシナプスの減少を認める病態で、一見正常な蝸牛機能を持つがその後の聴覚予後に影響を与える(Kujawa SG et al. J Neurosci. 2009)。しかしながら、Cochlear Synaptopathy に対する有効な治療法は未だ確立されていない。ROCK 阻害薬は神経保護効果・血流改善、さらに神経・シナプス再生作用などの多面的な効果を持つ人体毒性の少ない薬剤である。内耳においては、音響外傷での Rho-GTPase 経路の活性化や、ROCK 阻害薬による聴神経線維の伸長促進への関与が示唆されている。NT3 や BDNF などの神経栄養因子による神経・シナプス再生作用の報告はあるが、効果が早期に限定されることや生体内での分子の安定性の問題 (体内動態が不安定) などがあるため臨床では実用化が難しい。

2. 研究の目的

中枢神経系の基礎研究から、Rho-ROCK 経路の活性化は神経線維の伸長やシナプス形成を阻害することが知られており、この経路の活性を阻害する ROCK 阻害薬には、障害された神経線維に対しての伸長やシナプス形成を促進する作用があることも示されている。内耳蝸牛内の蝸牛神経正常組織においても、神経の伸長促進効果の報告があり (Lie M et al. Neuroscience. 2010)、障害された蝸牛神経に対してもその作用を発揮する可能性が考えられる。また ROCK 阻害薬は、NT3 や BDNF などの神経栄養因子と異なりすでに臨床応用されている薬剤であり、動物実験で得られた知見をもとに内耳領域でも臨床応用できれば比較的簡便で画期的な治療方法となりうる。内毛細胞・蝸牛神経間シナプス障害モデルマウスを作成し (primary neural degeneration モデル)、神経保護効果および神経・シナプス再生作用を有し、かつ人体に安全な ROCK 阻害薬を用い、内耳障害における内毛細胞・聴神経間のシナプス再生を検証し、新規内耳再生治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

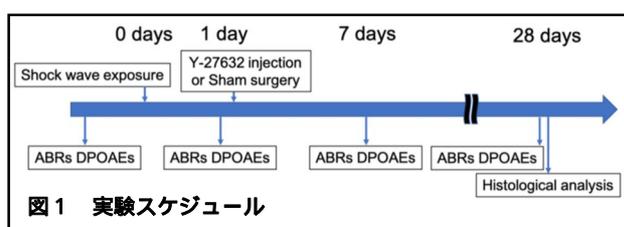
実験動物として生後 6 週のマウス (CBA/J) を用いた。マウスに対するすべての処置は、筋肉注射 (ケタミン 75 mg/kg、メドミジン 1 mg/kg)による全身麻酔下で行った。

障害モデル作製

Niwa らの方法を参考として laser- induce shock wave (LISW)によるシナプス障害モデルを作製した。(Niwa K et al. Sci Rep. 2016) 本研究では実験動物としてマウスを使用したため、衝撃波の強度は 2.00 J/cm² とした。

シナプス障害モデルに対する ROCK 阻害薬の効果についての検討

蝸牛器官培養神経障害モデルに対する ROCK 阻害薬の影響について、以下の 3 群の条件を設定し比較検討した。PBS 群 (sham コントロール)、ROCK 阻害薬 (1 mM)群、ROCK 阻害薬 (10 mM)群。薬剤投与は耳後部切開による中耳経由での局所投与により行った。ROCK 阻害薬は Y-27632 (和光)を使用した。



蝸牛機能検査

LISW 曝露前、1 日後、7 日後、28 日後に各動物の ABR および DPOAE を計測した。対数間隔の 6 つの周波数 (5.6 - 32.0 kHz の半オクターブステップ)で、音圧レベルは 10 dB から 80 dB SPL まで 5 dB ステップとした。

免疫組織化学

LISW 曝露 28 日後に各動物の蝸牛を採取した。4%PFA/PB で 4 一晩固定し、その後 EDTA で 4 日間脱灰した。ホルマウント標本作製し、0.3%Triton X/5%NHS/PBS で室温 1 時間処理した。0.3% Triton X で希釈した一次抗体で 37 一晩インキュベートした。使用した一次抗体は聴神経マーカーとして Chicken anti-NF 200 (1:500, Millipore: AB5539)、有毛細胞マーカーとして rabbit anti-Myo7a (1:500, Proteus Biosciences Inc : 25-6790)、前シナプスマーカーとして mouse (IgG1) anti-CtBP2 (1: 500 BD Biosciences: 612,044)、後シナプスマーカーとして mouse (IgG2a) anti-GluA2 (1 : 2000 Millipore: MAB397)を使用した。PBS で洗浄後、2 次抗体として 500 倍希釈した Alexa Fluor 350-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen:

A21068), Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen: A21131), Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen: A11034), Alexa 568-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Invitrogen: A21124), Alexa 647-conjugated goat anti-chicken IgY (Invitrogen: A21449) を用いて室温で 2 時間反応させた。

蛍光観察

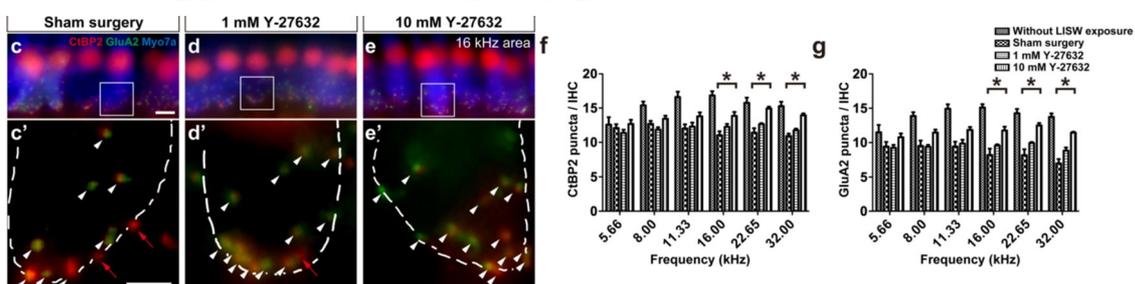
BZ-X700 蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて観察を行った。解析には Z-series での撮影を行った。シナプス数は最大値投影法での解析を行った。画像解析ソフト imageJ を用いて、Myo7a 陽性内有毛細胞上での CtBP2 および PSD95 陽性シグナルの数を計測し、1 内有毛細胞あたりのシグナルの数を算出した。統計学的解析には、Kruskal-Wallis 法による一元配置分散分析および Dunn-Bonferroni 法による多重比較検定を行った。

4. 研究成果

LISW 曝露により障害されたシナプスに対する Y-27632 の効果

Y-27632 の局所投与から 1 ヶ月後、聴神経-有毛細胞シナプスへの影響を確認する目的で、CtBP2 および GluA2 で標識された内有毛細胞シナプスを測定した。PBS 群における CtBP2、GluA2 陽性シグナルは、5.6 kHz を除くすべての周波数において、対照群 (LISW 曝露なし、薬剤投与なし) よりも有意に少なかった (図 2c, c', g)。ROCK 阻害薬 (1 mM) 群では、CtBP2、GluA2 陽性シグナルの増加傾向が観察された (図 2d, d', g)。ROCK 阻害薬 (10 mM) 群では、高周波領域 (16.0–32.0 kHz) での CtBP2、GluA2 陽性シグナルの有意な増加が確認された。これらの結果から、Y-27632 は LISW による蝸牛シナプス障害の改善に対して用量依存的な効果を持つことが示唆された。

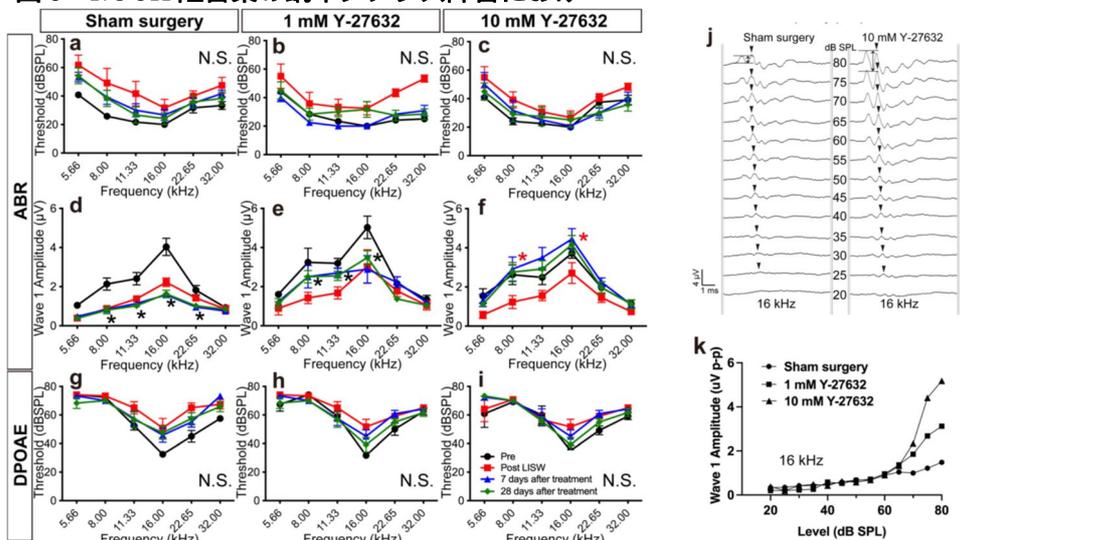
図 2 ROCK 阻害薬の蝸牛シナプス障害への影響



LISW 曝露後の聴覚機能障害に対する Y-27632 の効果

LISW および ROCK 阻害剤 Y-27632 の投与前後のいくつかの時点で ABR と DPOAE を計測した (図 3)。PBS 群では、LISW 曝露 1 日後に ABR と DPOAE の閾値が一時的に上昇したが、7 日後には閾値が回復し (一過性閾値上昇: TTS)、すべての周波数で有意差はみられなかった (図 3a, g)。一方で、ABR 第 I 波振幅は LISW 曝露 1 日後から減少し、LISW 曝露 28 日後まで回復せず、8.00 kHz から 22.65 kHz までの周波数で有意差が認められた (図 3d)。ROCK 阻害薬 (1 mM) 群でも PBS 群と同様に TTS を示した (図 3b, h)。28 日後の ABR 第 I 波振幅は、22.65 kHz のみ LISW 曝露前と有意差がみられなかった (図 3e)。ROCK 阻害薬 (10 mM) 群では投与 7 日後より ABR 第 I 波振幅の改善がみられ、28 日後の 8.00 kHz および 16.00 kHz では、LISW 曝露 1 日後と比較し有意な改善を示した (図 3f)。これらの結果から、Y-27632 は蝸牛シナプス障害における聴覚機能の改善に対して用量依存的な効果を持つことが示唆された。

図 3 ROCK 阻害薬の蝸牛シナプス障害におけ



これまで内耳再生のターゲットは有毛細胞であったが、有意な機能回復までには至っておらず実用にいたっていない。近年、内耳障害は有毛細胞・蝸牛神経間シナプス障害であることが注目されており、神経再生作用を持ち中枢神経系での研究ではすでにいくつかの報告がある ROCK 阻害薬に着目した。先行研究では *ex vivo* での蝸牛器官培養の系を用いて実験を行い、グルタミン酸アゴニストによる蝸牛神経障害モデルに対する ROCK 阻害薬の効果の検討を行ったところ、ROCK 阻害薬を作用させることで、蝸牛神経線維の伸長および有毛細胞・蝸牛神経間シナプスの再形成が起こっている可能性が示唆された (Koizumi Y et al. Front Cell Neurosci. 2020)。また本研究の結果により、*in vivo* 実験系でのシナプス障害モデルに対しても ROCK 阻害薬の有効性が示唆された。ROCK 阻害薬はすでに承認されている薬剤であるため、応用へのハードルも高くはないと思われ、聴覚障害に対する画期的な治療方法となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koizumi Yutaka, Mizutari Kunio, Kawauchi Satoko, Sato Shunichi, Shiotani Akihiro, Kakehata Seiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Y-27632, a ROCK inhibitor, improved laser-induced shock wave (LISW)-induced cochlear synaptopathy in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00819-1	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 Koizumi Yutaka, Ito Tsukasa, Mizutari Kunio, Kakehata Seiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Regenerative Effect of a ROCK Inhibitor, Y-27632, on Excitotoxic Trauma in an Organotypic Culture of the Cochlea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	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） 10.3389/fncel.2020.572434	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 Chiba Makoto, Ito Tsukasa, Shinkawa Chikako, Koizumi Yutaka, Hull Melinda, Kakehata Seiji	4. 巻 351
2. 論文標題 Consistent removal of hair cells in vestibular end organs by time-dependent transtympanic administration of gentamicin in guinea pigs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 109049 ~ 109049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2020.109049	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13件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小泉 優 , 伊藤 , 吏 , 窪田俊憲 , 松井祐興 , 新川智佳子 , 寺田小百合 , 天野彰子 , 欠畑誠治
2. 発表標題 Cochlear synaptopathy をターゲットとした治療法開発への試み ~当科での内耳基礎研究について~
3. 学会等名 第6回耳鳴・難聴研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田小百合, 伊藤 吏, 新川智佳子, 小泉 優, 天野彰子, 松井祐興, 窪田俊憲, 欠畑誠治
2. 発表標題 実験動物モデルにおける ABR を用いた伝音難聴と感音難聴の鑑別について
3. 学会等名 第1回 ERA・ERP 研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小泉 優
2. 発表標題 Cochlear synaptopathyをターゲットとした治療法開発への試み in vitro聴神経障害モデルを用いた検討
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

1. 発表者名 寺田 小百合, 伊藤 吏, 小泉 優, 天野 彰子, 新川 智佳子, 欠畑 誠治
2. 発表標題 レンチノイドを用いた中耳粘膜上皮の創傷治癒効果について
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

1. 発表者名 小泉 優, 水足 邦雄, 伊藤 吏, 塩谷 彰浩, 欠畑 誠治
2. 発表標題 Laser-induced shock waveによるcochlear synaptopathyモデルに対するROCK阻害薬の効果の検討
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

1. 発表者名 Seiji Kakehata
2. 発表標題 Regenerative effects of a ROCK inhibitor, Y-27632, on facial nerve function and afferent cochlear synapses
3. 学会等名 Korean Otological Society Annual Spring Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野 彰子, 新川 智佳子, 伊藤 吏, 千葉 寛之, 阿部 希望, 小泉 優, 松井 祐興, 後藤 崇成, 欠畑 誠治
2. 発表標題 聞き取り困難症例に対する新たな診断法開発の試み Hidden Hearing Lossの診断法についての検討
3. 学会等名 第67回日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新川 智佳子, 天野 彰子, 伊藤 吏, 千葉 寛之, 阿部 希望, 小泉 優, 後藤 崇成, 欠畑 誠治
2. 発表標題 聞き取り困難症例に対する新たな診断法開発の試み 聴覚情報処理検査と67-S語表による雑音下語音聴力検査
3. 学会等名 第67回日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田 小百合, 伊藤 吏, 小泉 優, 天野 彰子, 新川 智佳子, 欠畑 誠治
2. 発表標題 TEESを用いてレチノイド局所投与治療を行った再生中耳粘膜の機能評価
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Koizumi, Aaron K Remenschneider, Jeffrey Tao Cheng, Christopher J Smalt, Kunio Mizutari, Seiji Kakehata
2. 発表標題 Evaluation of auditory damage after blast exposure in mice.
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 46th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野彰子, 杉山元康, 伊藤史, 古川孝俊, 後藤崇成, 新川智佳子, 小泉優, 寺田小百合, 欠畑誠治
2. 発表標題 動物モデルを用いたROCK 阻害薬による顔面神経麻痺治療の基礎的研究
3. 学会等名 第71回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会東北地方部会連合学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野 彰子, 杉山 元康, 伊藤 史, 古川 孝俊, 後藤 崇成, 新川 智佳子, 小泉 優, 寺田 小百合, 欠畑 誠治
2. 発表標題 動物モデルを用いたリパスジルによる顔面神経麻痺治療の基礎的研究
3. 学会等名 第33回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yutaka Koizumi, Aaron Remenschneider, Jeffrey Cheng, Christopher J. Smal, Kunio Mizutari, Seiji Kakehata
2. 発表標題 Evaluation of the Effects of Rock Inhibitors on Auditory Damage Model Caused by Blast Exposure in CBA/J.
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 47th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024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
研究分担者	寺田 小百合 (Sayuri Terada) (40795697)	山形大学・医学部・医員 (11501)	
研究分担者	伊藤 吏 (Tsukasa Ito) (50344809)	山形大学・医学部・准教授 (11501)	
研究分担者	天野 彰子 (Akiko Amano) (50787249)	山形大学・医学部・医員 (11501)	
研究分担者	杉山 元康 (Motoyasu Sugiyama) (60637255)	山形大学・医学部・客員研究員 (11501)	
研究分担者	窪田 俊憲 (Kubota Toshinori) (80536954)	山形大学・医学部・客員研究員 (11501)	
研究分担者	小泉 優 (Yutaka Koizumi) (80723585)	山形大学・医学部・医員 (11501)	

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