

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18321

研究課題名（和文）多重免疫染色法およびイメージサイトメトリーを用いた内耳組織マクロファージの解析

研究課題名（英文）Analysis of Inner Ear Tissue Macrophages Using Multiplex Immunostaining and Image Cytometry

研究代表者

二之湯 弦（Ninoyu, Yuzuru）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任講師

研究者番号：70814573

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：内耳恒常性維持に組織マクロファージは必須とされるが、その詳細な機構については未だ明らかにされていない。本研究では、Multiplex IHC/Image cytometry技術を用いて、6種類のマクロファージ表面マーカーを同一切片上で可視化することに成功した。これにより蝸牛マクロファージにおいても、古典的M1/M2サブセット以外に多様な表現型が存在することを見出した。また聴器毒性のあるシスプラチン投与により、マクロファージ数及びその表面マーカー発現が、一過性聴力変動と共に経時的に変化することが明らかとなり、シスプラチン難聴の病理に蝸牛神経周囲の免疫応答が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、多重免疫染色法を内耳に応用することにより、蝸牛マクロファージの多様性を可視化することに成功した。この手法により蝸牛周囲のマクロファージを介した局所的な免疫応答が、シスプラチン難聴に関与している可能性が示唆された。これまでシスプラチン難聴は、有毛細胞障害や血管条破綻により説明されてきたが、未だ有効な治療法は確立されていない。本研究における免疫学的な知見は、新たなシスプラチン難聴治療戦略に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cochlear macrophages play a pivotal role in maintaining cochlear homeostasis, yet their full significance remains incompletely understood. In our study, we employed the multiplex IHC/Image cytometry technique to analyze six surface markers on cochlear macrophages within the same tissue section. This approach uncovered a diversity of phenotypes beyond the traditional M1/M2 dichotomy. Furthermore, we observed dynamic changes in the number and expression patterns of surface markers in cochlear macrophages in response to transient hearing threshold shifts following cisplatin injection. These findings suggest that an immune-related mechanism in the cochlear nerve may contribute to cisplatin-induced hearing loss.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：多重免疫染色 蝸牛マクロファージ シスプラチン 難聴

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究背景

内耳は従来、免疫系の関与が限定的であるとされる特異な器官であった。しかし、最近の研究により内耳においても免疫細胞が存在し、聴覚機能の維持に対して重要な役割を果たしていることが示されている。特に、内耳マクロファージは胎生期に蝸牛内に移動し、血管条、コルチ器、および蝸牛神経に広がっている。これらの細胞は難聴の予防及び治療における新たな標的として注目されている(Kariya et al., 2014; Hirose et al., 2017; Martin and García, 2021; Manickam et al., 2023)。組織マクロファージは、細胞死や活性酸素の生成をシグナルとして細胞を貪食する働きに加え、音響外傷後や加齢に伴う変化に関与し、血管条におけるメラノサイト様マクロファージの減少と血管透過性の増加を促進することが報告されている。しかしながら、これらのマクロファージの起源や機能、外部刺激に対する応答メカニズムは未だ十分に解明されていない。例えば、頭頸部癌治療で使用されるシスプラチンは聴器毒性が認められているが、その投与による免疫応答の詳細は明らかではない。加えて、マクロファージは炎症や損傷に応じて形質転換を行うが、M1（炎症性マクロファージ）と M2（抗炎症性マクロファージ）の二分法による分類はマクロファージの多様性を十分に表現していないため、より複雑な分類モデルが提案されている。内耳マクロファージの多様な免疫応答とその分布に関しては、依然として多くが不明である。

2. 研究目的

本研究は、内耳マクロファージが多様な形質を示すという仮説に基づき、頭頸部癌研究で開発されたクロマチン多重免疫染色法（multiplex IHC）とイメージサイトメトリーを内耳研究に応用し、マクロファージの免疫特性を従来の表面マーカーに基づく分析とともに位置・分布情報を組み合わせて解析することを目的とする。このアプローチにより、シスプラチン投与に伴う蝸牛の免疫応答を詳細に調査し、シスプラチンによる聴覚障害におけるマクロファージの役割を明らかにする。

3. 研究方法

本研究では、まず内耳に適応した多重免疫染色法のプロトコルを確立し、内耳組織マクロファージの免疫特性解析に必要な抗体パネルを構築する。4 週齢のマウスにシスプラチン（5mg/kg/day x 6 日間）を投与後、投与開始後 7 日目、14 日目、28 日目に蝸牛を採取し、固定後、上記パネルを用いて解析を行う。

4. 研究成果

多重免疫染色法により、6 種類のマクロファージ表面マーカー（F4/80, CD68, CD206, Iba1, CD86, CD163）を蝸牛パラフィン切片から可視化することに成功した。この技術により、マク

ロファージの表現型と位置情報を詳細に解析することが可能となり、活性化状態にあるマクロファージ群が存在すること、及び従来の M1/M2 分類に収まらない新しいタイプのマクロファージ (mixed macrophage) が確認された。シスプラチン投与による蝸牛の免疫反応を調査した結果、投与後 7 日目には、Iba1 を始めとする神経炎症マーカーの発現が増加し、M1 および M2 マクロファージの数が一時的に増加することが観察された。これらの免疫応答は蝸牛神経周囲で顕著であり、聴力閾値の一過性上昇と連動していた。以上の結果から、シスプラチン誘発性難聴の病態において局所的な免疫応答が関与している可能性が示唆された。本研究は内耳における新しい免疫解析手法の導入に成功し、蝸牛マクロファージの多様性及びシスプラチン誘発性難聴の発症機序における免疫学的側面を明らかにした。

< 引用文献 >

1. Hirose K, Rutherford MA, Warchol ME (2017) Two cell populations participate in clearance of damaged hair cells from the sensory epithelia of the inner ear. *Hear Res* 352:70–81.
2. Kariya S, Okano M, Maeda Y, Hirai H, Higaki T, Noyama Y, Haruna T, Nishihira J, Nishizaki K (2014) Role of macrophage migration inhibitory factor in age-related hearing loss. *Neuroscience* 279:132–138.
3. Manickam V, Gawande DY, Stothert AR, Clayman AC, Bataalkina L, Warchol ME, Ohlemiller KK, Kaur T (2023) Macrophages Promote Repair of Inner Hair Cell Ribbon Synapses following Noise-Induced Cochlear Synaptopathy. *J Neurosci* 43:2075–2089.
4. Martin KE, García AJ (2021) Macrophage phenotypes in tissue repair and the foreign body response: implications for biomaterial-based regenerative medicine strategies. *Acta Biomater* 133:4–16.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Bedeir Mai Mohamed, Ninoyu Yuzuru, Nakamura Takashi, Tsujikawa Takahiro, Hirano Shigeru	4. 巻 13
2. 論文標題 Multiplex immunohistochemistry reveals cochlear macrophage heterogeneity and local auditory nerve inflammation in cisplatin-induced hearing loss	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	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/fneur.2022.1015014	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 Ninoyu Yuzuru, Friedman Rick A.	4. 巻 40
2. 論文標題 The genetic landscape of age-related hearing loss	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Trends in Genetics	6. 最初と最後の頁 228 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tig.2023.12.001	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mai Mohamed Bedeir, Yuzuru Ninoyu, Takashi Nakamura, Takahiro Tsujikawa, Shigeru Hirano
2. 発表標題 Multiplex immunohistochemistry and image cytometry reveals an impact of cochlear resident macrophages on Cisplatin-induced hearing loss
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology Midwinter Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mai Bedeir, 二之 湯弦, 中村 高志, 辻川 敬裕, 平野 滋
2. 発表標題 多重免疫組織染色とイメージサイトメトリーにより明らかになったシスプラチン誘導性聴覚障害への蝸牛組織マクロファージの関与
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mohamed Bedeir Mai、Ninoyu Yuzuru	4. 発行年 2024年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 -
3. 書名 Macrophages - Molecular Pathways and Immunometabolic Processes	

〔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
---------	---------