

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22992

研究課題名（和文）ストレスがcochlear synaptopathyに影響を及ぼす機序の解明

研究課題名（英文）Studies on the effects of stress on cochlear synaptopathy

研究代表者

橋本 研（Hashimoto, Ken）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90887928

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）：神経栄養因子とその受容体（Trk受容体）、グルタミン酸受容体を介したcochlear synaptopathyとストレスの関連性を解析することを目的に本研究を行った。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を用いて騒音曝露によりcochlear synaptopathyモデルを作成した。これまでTrk受容体の内毛細胞周囲での局在を解析した報告はなかったが、whole mount法で作成したマウスの蝸牛標本で内毛細胞底部の細胞膜上に発現するTrkBとTrkCを確認した。現在はこれらの局在の拘束浸水ストレス負荷と音響曝露による変化を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cochlear synaptopathyは内毛細胞シナプスの障害であり、通常の聴力検査や組織解析では検出できないが、加齢性難聴の発症を加速し、耳鳴症の原因となる。ヒトでの治療法や予防法は確立されていないものの、動物実験では神経栄養因子がシナプス保護・再生効果を持つことが分かっているが、内毛細胞周囲での神経栄養因子の受容体の局在についての報告はなかった。本研究ではこの局在が明らかになり、神経栄養因子の効率的な内耳への投与方法の開発などに繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed how stress influences cochlear synaptopathy through neurotrophins, Trk receptors and glutamate receptors. We made a mouse model of noise-induced cochlear synaptopathy in CBA/CaJ and C57BL/6 strains. By immunofluorescence staining on cochlear whole mounts of CBA/CaJ mice, we found that TrkB and TrkC are expressed on the basolateral surface of inner hair cells.

研究分野：耳科学

キーワード：cochlear synaptopathy hidden hearing loss 内毛細胞 蝸牛シナプス ストレス 神経栄養因子 Trk受容体

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、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

工場の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。損傷が高度であれば、有毛細胞の脱落が生じ、永久性の聴力閾値上昇 (PTS: permanent threshold shift) となる。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考えられてきたが、近年動物実験において、TTS をきたす程度の騒音曝露により、有毛細胞の脱落がなくとも不可逆的な内有毛細胞シナプスの減少 (cochlear synaptopathy) が生じることが報告され、ヒトにおいては加齢性難聴の早期発症や耳鳴症の原因となり得ると考えられている (Kujawa and Liberman, *J. Neurosci.*, 2009)。このシナプス障害は、聴性脳幹反応 (ABR: auditory brainstem response) の閾値や光学顕微鏡では検出できないため “Hidden hearing loss” と呼ばれ、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)。2019 年には世界の若者 (12 ~ 35 歳) の半数近くにあたる 11 億人が携帯音楽プレイヤーによる騒音曝露などにより難聴の危険を有すると WHO が報告しており、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。

これまで神経栄養因子である neurotrophin-3 (NT-3) と brain derived neurotrophic factor (BDNF) がシナプス保護・再生効果を持つとの報告があり、申請者もウイルスベクターを用いて内有毛細胞へ NT-3 を過剰発現させることで騒音障害から内有毛細胞シナプスが保護されることを示した (Hashimoto K. et al., *Sci Rep.*, 2019)。一方、海馬ではストレス負荷により視床下部-下垂体-副腎系を介して増加した血中コルチゾールに神経細胞が曝露されると BDNF の分泌量が低下することや (Nestler E.J. et al, *Neuron*, 2002)、ストレス負荷によりグルタミン酸受容体の発現率やこれらの受容体に依存的なシナプス伝達効率が変化すること (Popoli M. et al, *Nat Rev Neurosci.*, 2012) が報告されており、ストレスは神経栄養因子とその受容体、グルタミン酸受容体を介して内有毛細胞シナプスの可塑性にも影響を及ぼすと推測される。睡眠障害によるストレスが cochlear synaptopathy の発症に及ぼす影響を検討した報告はあるが (Pengjun L. et al, *Front Neurosci*, 2019) ストレスが蝸牛における神経栄養因子とその受容体、グルタミン酸受容体の発現に影響を及ぼすかについては解析されていない。

2. 研究の目的

神経栄養因子受容体の内有毛細胞シナプス周囲での局在、ストレス負荷による蝸牛内の神経栄養因子とその受容体、グルタミン酸受容体の発現の変化を解析した報告はない。これらを明らかにし、音響曝露実験を加えることで、cochlear synaptopathy の発症にストレスが関与する機序を解明する。

具体的には以下の 3 つを目的とする。BDNF と NT-3 の受容体である TrkB と TrkC の内有毛細胞とその周囲での局在を解明する。急性・慢性ストレス負荷による蝸牛での BDNF と NT-3、TrkB と TrkC、グルタミン酸受容体の発現の変化を解析する。急性・慢性ストレス負荷後に音響曝露を行い、内有毛細胞シナプスの変化と の解析結果の相関性を解析する。

3. 研究の方法

実験動物には CBA/CaJ マウスおよび C57BL/6 マウスを用いる。まず初めに、cochlear synaptopathy を来す音響曝露の条件を設定する。続いて、音響曝露によって生じる内有毛細胞シナプス障害の程度に差異を来すようなストレス負荷の手法とその条件を設定する。TrkB と TrkC の局在の解明: cochlear whole mount 法と切片法で蝸牛の標本作製後、抗 TrkB 抗体、抗 TrkC 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察する。ストレス負荷 (急性・慢性の拘束浸水ストレス) による BDNF と NT-3、TrkB と TrkC、グルタミン酸受容体の変化の解析: ストレス負荷の有無による蝸牛内の BDNF と NT-3 の発現量の変化を Western blotting、ELISA、定量 RT-PCR など で定量評価する。TrkB と TrkC、グルタミン酸受容体の発現の変化を と同様に蛍光免疫染色で観察する。ストレス負荷後の音響曝露実験: 音響曝露後に内有毛細胞シナプスを共焦点顕微鏡で観察し、3D 画像解析ソフトにより解析する。音響曝露前のストレス負荷の有無による内有毛細胞シナプス障害の差異と の結果の相関性を解析し、ストレスが cochlear synaptopathy 発症に関与する機序について検討する。

4. 研究成果

(1) Cochlear synaptopathy を来す音響曝露の条件の設定

8-16kHz の octave band noise を、8 週齢・オスの CBA/CaJ マウスに対しては 90、92、94、96、98、100dB SPL、4 週齢・オスの C57BL/6 マウスに対しては 78、80、82、84、86dB SPL の各々の条件で 2 時間曝露し、8 週齢・オスの CBA/CaJ マウスでは 92dB SPL、4 週齢・オスの C57BL/6 マウスでは 86dB SPL が cochlear synaptopathy を生じさせる最も適切な音響曝露条件であることを見出した。

(2) TrkB と TrkC の局在の解明

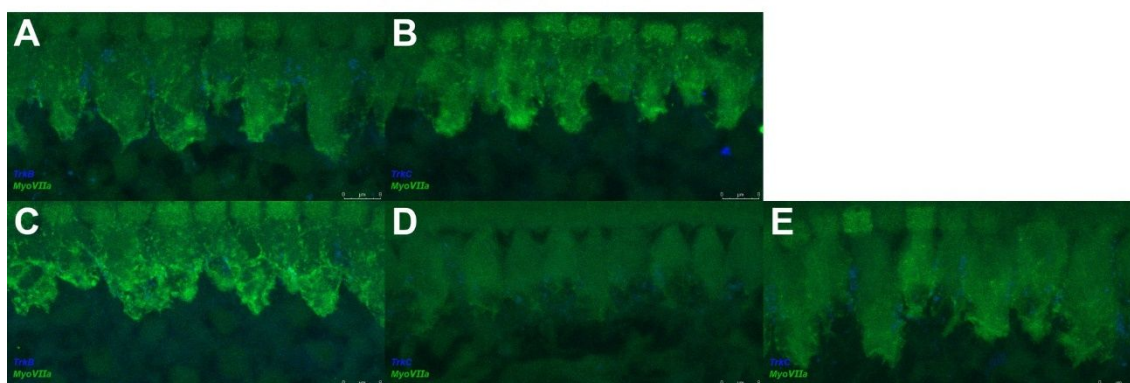
コルチ器、特に内毛細胞周囲での TrkB と TrkC の局在の解明を試みるため、cochlear whole mount 法で作成した 6 週齢・オスの CBA/CaJ マウスの蝸牛標本を蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。標本の固定にはグリオキサルを用いた。今回使用した抗 TrkB 抗体、抗 TrkC 抗体は以下の通りである。

TrkB [p Tyr817] Antibody (SC0556) NBP2-67578, Novus Biological 社 (図 A) TrkC Antibody NB100-98829, Novus Biological 社 (図 B) IHC-plus™ Polyclonal Rabbit anti-Rat NTRK2 / TRKB Antibody (aa1-429, IHC, WB) LS-B2544, LSBio 社 (図 C) IHC-plus™ Polyclonal Rabbit anti-Human NTRK3 / TRKC Antibody (IHC, WB) LS-B13888, LSBio 社 (図 D) TrkC Polyclonal antibody 11999-1-AP, Proteintech 社 (図 E)

上記の各抗体と抗 Myosin a 抗体を用いて染色した。

いずれの標本においても内毛細胞底部の細胞膜に沿って TrkB と TrkC に対応した蛍光を確認することが出来た。現在はこれらの局在の拘束浸水ストレス負荷と音響曝露による変化を解析する実験を進めている。

図 内毛細胞周囲のTrkBとTrkCの局在



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hemmi Tomotaka, Suzuki Jun, Kagawa Yoshiteru, Honkura Yohei, Ikeda Ryoukichi, Hashimoto Ken, Suzuki Chitose, Kawase Tetsuaki, Abe Takaaki, Owada Yuji, Katori Yukio	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of Ndufs4 Deletion on Hearing after Various Acoustic Exposures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	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） 10.1620/tjem.2023.J031	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 研
2. 発表標題 公募テーマセッション2 「「Hidden hearing loss」の病態解明・治療法開発に向けた内耳基礎研究」 蝸牛シナプス障害モデル動物を用いた研究に必要な実験手技
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 橋本 研
2. 発表標題 教育セミナー（基礎）1 マウスを用いた内耳の研究 - 立ち上げから実験系の確立まで -
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------