

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791930

研究課題名(和文) 蝸牛内完全埋込み型人工コルチ器作製へむけた人工シナプス形成を確立するための研究

研究課題名(英文) Artificial Synapse Formation for the Implantable Artificial Organ of Corti

研究代表者

増田 正次 (Masuda, Masatsugu)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：20317225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究の目的は人工物とラットの蝸牛らせん神経節(SG)細胞の軸索との間に人工シナプスを形成させることである。今回分かり得た事項は以下の通りである。1.神経成長因子でコーティングしたビーズと何もコーティングしてないビーズの作用を比較した場合、前者に対してSG細胞の軸索が接触し易かった。2.コルチ器周囲の細胞群がSG細胞の伸長を妨げた。3.軸索とビーズの接触点にシナプス特異的分子の確実な発現は示せなかった。4.SG細胞をとりまく環境(蝸牛恒常性)維持が蝸牛内細胞、組織再生に非常に重要である。5.上記結果を考慮するとやはり難聴後の治療に加え、難聴発症の予防と要因の研究が重要であると再認識させられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to form synapses between the spiral ganglion (SG) neurons and beads. I got following results. 1. SG neurons formed more neuronal fiber adhesion to beads coated with neurotrophic factor than to those without any chemicals. 2. Neurite outgrowth was impeded by cells around the organ of Corti. 3. A reliable evidence of synaptic marker expression was not obtained at beads contacted with neurites. 4. Cochlear homeostasis is critical for regeneration of cochlear cells. 5. Taken together, I again realized that prevention of hearing loss and revealing the mechanism of hearing loss are important in addition to treatments, because achieving a complete recovery of sensorineural hearing loss seems to be very hard.

研究分野：耳科学

キーワード：らせん神経節 内耳 蝸牛 シナプス 神経成長因子 聴力 蝸牛恒常性

1. 研究開始当初の背景

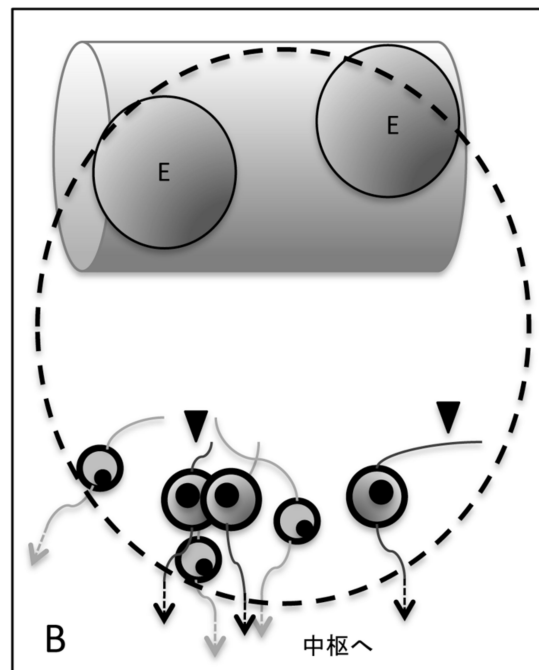
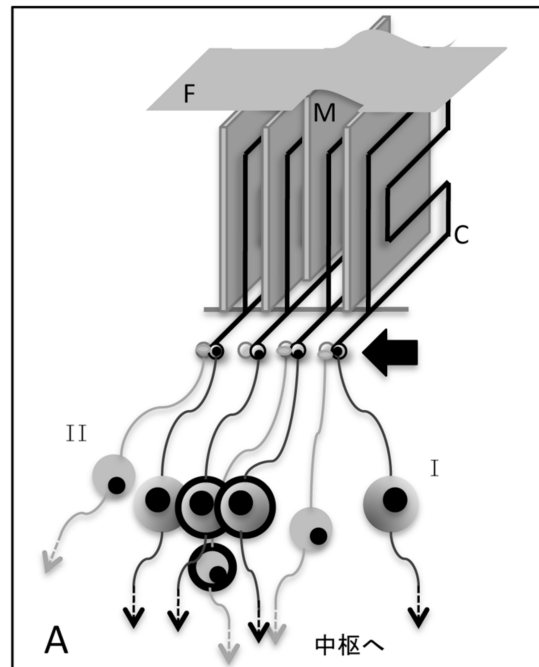
現在普及している人工内耳は電池の他、大きさが数 cm あるスピーチプロセッサ、体外ヘッドピース、側頭骨内埋め込みレシーバを必要とする。一方、本研究を発展させた人工コルチ器はこれらの粗大パーツを一切必要としない。人工コルチ器を完成させる最大のポイントの一つは、人工コルチ器とらせん神経節(SG)細胞とがシナプス様の結合(人工シナプス形成)をすることであると私は考えた。これにより、電池不要、中枢からの遠心性支配も再現し、周波数高分解能な蝸牛内埋込み型人工コルチ器が現実のものとなるからである。

研究開始当時に想定していた人工コルチ器(A)と従来からある人工内耳(B)の概念図を示す。

A:人工コルチ器とI型、II型SG細胞がI型特異的、II型特異的人工シナプスを形成している(太矢印部)。I型とII型細胞は人工シナプス上で互いに干渉することも可能である。外界からの音刺激により、蝸牛内リンパ動態が変化し浮動膜(F)が変形する(*部)。それに伴い、変形浮動膜に接合された磁性体(M)が移動する。磁界の変化により隣接するコイル(C)に微弱電流が流れ、電流の発生したコイルとシナプスを形成していたSG細胞のみ(太い輪郭線の3個のSG細胞)が脱分極し、周波数特異的な聴覚情報を中枢へ送る。B:一方、従来の人工内耳では、SG細胞は人工内耳の電極(E)から離れたSG細胞を刺激するために人工コルチ器より大きな電場(点線円)を要する。更にこの電場は不特定多数のSG細胞(図B中全てのSG細胞)を脱分極させるため、外界から入ってきた音とは無関係な周波数域の情報までもが中枢に送られる。

過去には、胎仔ラットの海馬ニューロンが poly-D-lysine や poly-L-lysine でコーティングした人工物(ポリスチレンビーズ)とシナプス

を形成することが報告されていた(Lucido et al., 2009)。



2. 研究の目的

本研究は、どのような無機物質、有機物質が人工シナプス形成を促進し、人工コルチ器を構成する材料として適しているかを検討することを第一の目的とした。また、本研究を施行するにいたった根本原因は感音難聴の発症原因やその予防法が分かっていないことにある。よって、それらの点についても常に情報網を張り巡らせ、実験系に取込める

知見がないか探索を続けた。

3. 研究の方法

- (1) 生後 3~4 日(P3~4)のマウスもしくはラットのらせん神経節組織を摘出し、細胞接着を促進する物質(poly-L-lysin, PLL)によりコーティングしたディッシュ上で培養した。
- (2) SG 組織とコルチ器は、本来は隣接し結合している組織である。これをあえて一度分離した後に、同一領域(同一ウェル)内で培養し、SG 細胞から延びる軸索が聴覚感覚細胞(有毛細胞)へと向かって延びるかを観察した。
- (3) SG 細胞の軸索と有毛細胞との接合部に発現している可能性のあるシナプス特異的マーカーが、免疫染色法により高い信頼性で確認できるかを確認した。
- (4) SG 組織を培養しているウェル内に PLL でコーティングしたビーズ(ポリスチレンビーズ、直径 6-7 μ m, PLL-ビーズ)と何もコーティングしていないビーズ(コントロールビーズ)を入れ、SG 細胞の軸索がビーズと接合し、シナプス特異的マーカーを発現するか確認した。
- (5) SG 組織を培養しているウェル内に神経成長因子でコーティングしたビーズ(Neurotrophic Factor-ビーズ, NF-ビーズ)と何もコーティングしていないビーズを入れ、SG 細胞の軸索がビーズと接合するか確認した。軸索伸長領域内における一定の数のビーズ(4 個以上)からなるビーズ塊に対して軸索が接合しているかを定量した。
- (6) 感音難聴の発症原因のメカニズムや予防に関するヒト、動物の知見について機会

があるごとに文章としてまとめた。

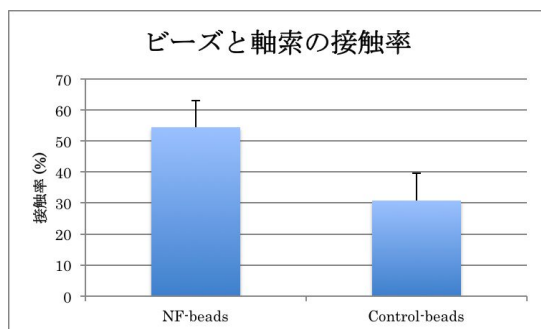
4. 研究成果

- (1) 本申請者がアメリカにおいて使用していた SG 組織培養条件(従来法)では、組織が期待したほど十分に成長しなかった。培養条件を検討した結果、従来法で組織成長に重要であった培養調整液の N2 supplement が今回は十分に機能していなかった。別の培養調整液 B-27 を添加することでこの問題が解決することが判明した。ニューロンの生存維持には周囲の環境のわずかな変化が多大な影響を与えることを示唆している。
- (2) PLL に関して、高分子 PLL では組織成長が阻害されることが分かり、低分子 PLL を使用することで組織成長を促進することが判明した。
- (3) SG 組織とコルチ器を分離後に同一ウェル内で培養したところ、コルチ器周囲の細胞が成長し、SG 組織の成長を阻害した。このことは、蝸牛障害が生じ、一定期間以上が経つと瘢痕組織によって組織再生が困難になることを示唆していると考えた。
- (4) 複数の文献で使用されているシナプス特異的マーカーの免疫染色が、本研究のように組織培養を行った後の染色においては十分な信頼性をもって機能しなかった。
- (5) PLL-ビーズがコントロールビーズと違い、SG 細胞と機能性シナプスを形成するという現象は観察できなかった。Lucido らの報告によるとラット胎仔海馬ニューロンでは PLL-ビーズが同ニューロンの軸索と機能性シナプスを形成することが報告されている(Lucido et al., 2009)。使用したニューロンの発達段階と

部位が違ったために Lusido らの報告を再現できなかったと考えている。単なる接着分子の PLL だけで機能的シナプスが形成された背景には、胎仔海馬ニューロンの可塑性の高さが関係しており、生後ラット SG 細胞にはそこまでの可塑性がないのではないかと推測した。

(6) NF-ビーズ(NF-beads)はコントロールビーズ(Control-beads)に比較して、SG 細胞軸索と接合し易いという現象を観察した。一定の大きさのビーズ塊に対する軸索の接触をカウントすることが可能であった。カウントしたビーズ塊は以下①～のパターンにあてはまるものである。

軸索先端が接している、 軸索がビーズ塊の中を通過している、 軸索がビーズ塊に接して走行している、 軸索伸長範囲内にあるビーズ塊であるにも関わらず全く軸索と接合していない。接触の程度は接触率 = $(\text{+} +) \div (\text{+} + + +) \times 100 (\%)$ で算出した。NF-beads 群と Control-beads 群との間に統計学的な有意差を認めた (Mann-Whitney test, $P < 0.05$)。次に結果をグラフで示す。



<引用文献>

Aletsee, C., Brors, D., Mlynski, R., Ryan, A. F. and Dazert, S. (2003) 'Branching of spiral ganglion neurites is induced by focal application of fibroblast growth factor-1', *The*

Laryngoscope 113(5): 791-6.

Lucido, A. L., Suarez Sanchez, F., Thostrup, P., Kwiatkowski, A. V., Leal-Ortiz, S., Gopalakrishnan, G., Liazoghli, D., Belkaid, W., Lennox, R. B., Grutter, P. et al. (2009) 'Rapid assembly of functional presynaptic boutons triggered by adhesive contacts', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(40): 12449-66.

5. 主な発表論文等

雑誌論文 (1 件)

Correlations of Inflammatory Biomarkers with the Onset and Prognosis of Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Otology & Neurotology* (33), 2012, 1142-1150. 査読あり. 10.1097/MAO.0b013e3182635417

海外学会発表 (共同発表者として) (1 件)

The hearing level change of the versatile gene modulation mouse (NKCC1-tetO mouse).

Association for Research in Otolaryngology. 2015, Baltimore, Maryland, U.S.A.

ホームページ

杏林大学 大学院医学研究科 研究室、研究グループ紹介

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/otolaryngology/>

6 . 研究組織

研究代表者

増田正次 (MASUDA, Masatsugu)

杏林大学、耳鼻咽喉科学教室、講師

研究者番号 20317225