

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592560

研究課題名(和文) トランスレーショナルリサーチに向けた小型霊長類コモンマーモセットの聴覚障害モデル

研究課題名(英文) A primate model for hearing research using non-human primate common marmoset

研究代表者

藤岡 正人 (Fujioka, Masato)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70398626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：橋渡し研究の推進に際し、症例での病態生理を正確に反映した実験動物モデルは非臨床POC (Proof of Concept) 取得に極めて重要である。この観点から我々は齧歯類と比してヒトに近い霊長類モデルに注目し、小型で扱いやすいコモンマーモセットの聴覚障害モデル樹立を目標として研究を行った。本研究によって、側頭骨局所解剖の熟知、二つの内耳薬剤投与ルート(半規管ないし正円窓経由)の手術、コモンマーモセット聴覚の基礎情報(聴覚研究には準近交系が望ましい)、ABR, OAEの手法確立、聴覚研究用の飼育施設、手術室などハード面での整備を確立し、現在、音響外傷モデル樹立を行っている。

研究成果の概要(英文)：Model animals are indispensable for the success in translational research but there are always species differences in between rodent models, commonly used for ENT/audiology research to achieve non-clinical proof of concept studies, and human cases. Notably, this discrepancy may often lead to failures in the drug development. In the study, we are trying to establish a primate deafness model using a small non-human primate common marmoset to mind the species gap. We revealed a local anatomy of temporal bone, surgical roots for the drug discovery to the inner ear via semicircular canal and round window niche, basic information in its audiology. We prepared for the ABR and OAE recording, animal facility and OR for marmosets. We are going to achieve a noise-induced hearing loss model in the species near future.

研究分野：耳科学・聴覚医学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ 感音難聴 聴覚障害 霊長類モデル コモンマーモセット

## 1. 研究開始当初の背景

1960 年台に米国国立衛生研究所によってその枠組みが提唱され 90 年台前半に幅広く認知されるようになったトランスレーショナルリサーチ (基礎研究により治療標的を同定し、動物実験の結果を参照にして臨床応用する手法)は、分子生物学的理解に基づいた治療薬を数々産み出してきたものの、費用対効果の観点から見直しを余儀なくされている (Nature, 2008 (11)他)。最大の問題点は各々の疾患モデルの妥当性が往々にして不十分なことにあり、特にモデル動物(多くの場合嚙歯類)とヒトとの種間の違いは、動物実験で得られた結果が臨床治験において再現できないケースに直結する。そこでヒトに近い霊長類での疾患モデル樹立は難病への新規治療法開発に向けた急務と考えられてきたが、ほとんどの霊長類は大型で扱いづらく、また遺伝学的背景が均一でないため薬剤効果判定などには不向きであった。この問題を打破すべく本大学では実験中央研究所との共同研究で、比較的扱いやすい小型霊長類であるコモンマーモセット(Callithrix jacchus)の純系コロニー樹立とその遺伝子改変技術の確立を進めてきた (Nature, 2009(5)。)。申請者らはこの研究グループと耳科学・聴覚医学領域における次世代トランスレーショナルリサーチに向けた小型霊長類コモンマーモセットの聴覚系の基礎的解析を進めてきた。2 年間の学内での予備実験を出発点に、平成 21~22 年度には文科省科研費若手研究 B(代表:藤岡)の補助を受けて、末梢聴覚系・側頭骨に関する解剖学的検討、画像検討と局所解剖に基づいた耳科手術手技を postmortem で検討して(Fujioka et al, 2012 ARO Meeting)。その結果、コモンマーモセットでは鼓室内の構造はヒトに酷似すること、乳突洞は単一の大きな空間(モルモットなどの下等な哺乳類の Bulla に相当)が大半を占めること、従って耳後切開アプローチが容易で乳突洞へマイクロポンプを留置しうることや人工内耳も安全に挿入可能なことを確認してきた。また 7T-MRI にクライオプローブを装着して撮影した後、画像解析におけるパラメータを最適化することで、側頭骨内での神経線維描出に成功した。これにより、第 VIII 脳神経内における頂回転~基底回転由来の神経線維の走行パターンの分離描出や、1 型、2 型らせん神経節細胞由来の神経線維の選択的描出を実現した。

## 2. 研究の目的

当該申請研究では上記研究を更に推し進め、末梢~中樞までの同時横断的研究を行うツールとしての基礎技術と実験系を確立する。言語コミュニケーションが発達しており皮質レヴェルでの聴覚中枢における解析が世界的に汎用されているマーモセットにおいて、この研究期間で、1)マイクロポンプ留置 2)人工内耳挿入を確立すると並行し 3)耳音響反射(OAE)を最適化して基礎データを収集し 4)難聴モデル樹立に取り組む。

これらを既存の大脳皮質における電気生理と組み合わせることで、末梢から中樞まで含めた同時横断的な聴覚生理・病態生理の検討を目指す。この研究は言語コミュニケーションが可能な動物種でのみ可能であり、嚙歯類とヒトとの大きなギャップを埋めるツールとなることが予想される。近い将来に遺伝子改変マーモセット技術との組み合わせで遺伝性難聴や各種急性感音難聴の霊長類モデルを樹立し、臨床応用を念頭とした基礎研究での有用な新規モデルを確立して、耳科学・聴覚医学における次世代トランスレーショナルリサーチの有用なツールとして、将来の発展に寄与することを目指す。

たとえば「内耳再生医療」のような霊長類と嚙歯類で種差が想定されるような新規治療法の臨床応用に際しては、ヒトでの治験に先立って霊長類モデルによる非臨床 POC の取得が橋渡し研究において極めて重要と考えられる。本研究の目的は、小型霊長類コモンマーモセットを用いた、包括的かつ横断的な霊長類難聴モデルを樹立・提唱することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) マーモセット聴覚系の基本情報の収集

さまざまな条件での測定差を検討すべく、異なった条件のマーモセットを用意して検討した。検討に際しては簡便な mimoso acoustics のシステムを用い、以下のパラメータにつき検討した

性差(オス、メス)  
年齢差(4ヶ月齢~3歳)  
測定場所  
麻酔(全身麻酔、局所麻酔;麻酔深度)  
固定条件(head holder 固定、固定なし)  
提示周波数と音圧(6kHz~16kHz)  
測定者(耳鼻科医師、動物技官の2名)

### (2) マーモセット聴力測定手技の確立

末梢、中樞両方を他覚的に評価できるよう、聴性脳幹反応(ABR)および耳音響反射(OAE)の測定系を確立した。

ABRの測定には Tucker Davis Technologies 社の MF1, RP2.1, PA5, ED1, RA16 を使用、スピーカーは鼓膜より 1cm に設置した。音刺激はクリック音で 0.1 msec pulses トーンバースト音で 1.0 ms duration とし、512 回加算平均を記録した。

### (3) 内耳への薬剤投与手術の確立

固定マーモセット頭部を用い、過去に固定側頭骨で得られたノウハウを基盤として、顕微鏡下、挿管下での手術手技を検討した。

### (4) マーモセット難聴モデルの作成

全身麻酔下で耳内にプローブを挿入し、音響外傷モデルを作成した。

## 4. 研究成果

### (1) マーモセット聴覚系の基本情報の収集

6kHz 前後から DPOAE を検出し得たが、12kHz 付近が最も大きな振幅の 2f1-f2 を安定して得ることができた。同一耳での複数回検討での再現性は比較的良好であった。検討した範囲では野生のマーモセットのほう

がinbredのコロニーよりも同一音提示での比較で2f1-f2振幅が大きい傾向にあった。

なお、head holder は不要であり、外耳道内へのプローブ挿入で体動を生じない程度の浅麻酔で十分だった。

この結果から、難聴モデルへの薬剤投与の効果を検討するに際しては、齧歯類同様、準近交系に相当するマーモセットコロニーを用いて研究を行う必要があることが明らかにされた。

#### (2) マーモセット聴力測定手技の確立

末梢、中枢両方を他覚的に評価できるよう、聴性脳幹反応(ABR)および耳音響反射(OAE)の測定系を確立した。クリック音刺激、トーンバースト刺激ともに再現性良好な波形が観察された。トーンバースト音では1, 4, 8, 16, 32, 64kHzで聴力閾値まで波形を取得でき、これらの周波数においては2個体ともに16kHzが最も聴力閾値が低かった。

#### (3) 内耳への薬剤投与手術の確立

固定マーモセット頭部を用い、過去に固定側頭骨で得られたノウハウを基盤として、顕微鏡下、挿管下での手術手技を確立した。

胸鎖乳突筋を挙上し、その内側の骨を削開すると、単洞の乳突洞に到達し、奥に外側半規管隆起を確認した。その前下方にドリルで小孔を作成して後鼓室開放を行うことで、正円窓窩を明視下に置くことが可能であった。

このアプローチにより、外側半規管経由、正円窓窩経由での内耳への薬剤投与経路が担保された。

他方、マーモセットは内耳が中耳に比して大きいいため、蝸牛基底回転および顔面神経水平部の張り出しが大きく、アブミ骨は両者の間にはさまる形で存在する。アブミ骨底板を明視下に置くことは現実的に不可能であり、卵円窓へのアプローチを行うには不向きな動物と考えられた。

#### (4) マーモセット難聴モデルの作成

全身麻酔下で耳内にプローブを挿入し、音響外傷モデルを作成した。これまでに30dB SPLのthreshold shiftを伴う一過性閾値上昇モデルを得られており、現在恒久的閾値上昇モデルの作成を進めている。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Suzuki N, Hosoya M, Oishi N, Okano H, Fujioka M, Ogawa K. Expression pattern of wolframin, the WFS1 (Wolfram Syndrome-1 gene) product, in common marmoset (*Callithrix jacchus*) cochlea. Neuro Report, in press (査読有)

Hosoya M, Fujioka M, Okano H, Ogawa K. Distinct expression pattern of a deafness gene, KIAA1199, in a primate cochlea. Bio Medical International, in press (査読有)

Hosoya M, Fujioka M, Okano H, Ogawa K, Distinct Expression Patterns Of

Genes Responsible For Hereditary Progressive Hearing Loss In Non-Human Primate Cochlea. Scientific Reports 2016,26;6 22250 (査読有)

Hosoya M, Fujioka M, Kobayashi R, Okano H, Ogawa K. Overlapping expression of anion exchangers in cochlea of a non-human primate suggests functional compensation. Neuroscience Research 2016, S0168-0102(16) 300006-2. (査読有)

Mizutani K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge AS. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma.

Neuron, 2013, 9;77(1) 58-69 (査読有)

〔学会発表〕(計13件)

Masato Fujioka

Cochlear disease modeling and drug discovery by using human iPSC-based technologies

The 16<sup>th</sup> Japan-Korea Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区), 2016/3/29

Masato Fujioka

Expression pattern of Wolframin, the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product, in Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) inner ear.

The 13<sup>rd</sup> Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology- Head and Neck Surgery 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区), 2015/12/4,

Masato Fujioka

Translating back and forth in between benchside and bedside by hiPS based-technology and a primate model

The 13<sup>rd</sup> Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology- Head and Neck Surgery 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区), 2015/12/4,

藤岡正人

コモンマーモセット蝸牛における SLC26A および SLC4A ファミリー陰イオン交換輸送体の発現パターンの検討

第60回日本聴覚医学会総会学術講演会 京王プラザホテル(東京都新宿区), 2015/10/21~23

藤岡正人

再生医学的アプローチと幹細胞医学による内耳性難聴の研究

日本耳科学会学術講演会 聴覚生理研究会 長崎ブリックホール(長崎県長崎市) 2015/10/8~10

藤岡正人

コモンマーマセツ蝸牛における CRYM 遺伝子、CONNEXIN31 遺伝子および COCH 遺伝子の発現パターンの検討  
長崎ブリックホール（長崎県長崎市）  
2015/10/8～10

Masato Fujioka

Expression pattern of GRHL2, an age-related hearing impairment gene, in Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) inner ear

IEB2015 Rome (Italy), 2015/9/12～15

Masato Fujioka

Expression pattern of Wolframin, the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product, in Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) inner ear.

IEB2015 Rome (Italy), 2015/9/12～15

藤岡正人

Notch 情報伝達系阻害による蝸牛有毛細胞の機能的再生

第 23 回日本耳科学科総会・学術講演会（宮崎県宮崎市）2013/11/24

Masato Fujioka

Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma

Politze Society Meeting

Antalya (Turkey) 2013/11/14

藤岡正人

内耳再生医療研究の最先端～有毛細胞再生から疾患特異的 iPS 細胞まで～

金沢市医師会 第 38 回学術セミナー（新潟県金沢市）2013/8/24

Masato Fujioka

Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma.

Molecular Biology of Hearing and Deafness CA (USA) 2013/6/24

Masato Fujioka

Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma

International Otopathology Society Meeting (a.k.a. The Schuknecht Society)

Massachusetts (USA) Eye and Ear Infirmary  
2013/6/11

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keio-ent.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤岡 正人 (FUJIOKA, Masato)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：70398626

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし