

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670722

研究課題名(和文)光遺伝学を活用した新しい蝸牛神経刺激法：光学人工内耳の開発に向けて

研究課題名(英文)New method for auditory nerve stimulation using optogenetics

研究代表者

鷹合 秀輝 (Takago, Hideki)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所感覚機能系障害研究部・研究室長

研究者番号：70401354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウス蝸牛神経から記録される応答(興奮性シナプス後電流の振幅)に多様性があることが知られてきたが、これが内毛細胞における単一シナプス小胞の融合および融合細孔のダイナミクスによって達成され得るという新規知見を見出し、国際誌に原著論文を発表した。また、難聴遺伝子otoferlinのコードする遺伝子産物が蝸牛神経応答の多様性の形成に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Heterogeneity of excitatory postsynaptic currents in the mammalian auditory nerve fibers is the hallmark of cochlear physiology. In the present study, we found that unquantal release of neurotransmitter glutamate through dynamic fusion pore controls the exocytosis at the inner hair cell afferent synapse. Furthermore we found that otoferlin (a causative gene for hereditary deafness DFNB9) plays an essential role for the heterogeneity of synaptic currents at this synapse.

研究分野：聴覚医学

キーワード：光遺伝学 オプトジェネティクス 人工内耳 蝸牛 蝸牛神経 パッチクランプ 国際情報交換(ドイツ)

1. 研究開始当初の背景

現行の人工内耳は蝸牛神経を一様に電気刺激するため、蝸牛神経の持つ入出力特性の多様性を再現できていない。本研究で用いる光遺伝学(光感受性タンパク質と遺伝学を組合せる研究手法)は、2005年に初めて神経科学研究に応用された(Boyden et al. (2005) *Nat Neurosci* 8:1263-1268)。翌2006年には、視覚障害モデルマウスの網膜神経節にチャンネルロドプシン2(ChR2)を導入し、視覚応答を回復させることが可能となった(Bi et al. (2006) *Neuron* 50:23-33)。しかしながら、研究開始当初において聴覚領域からの報告は無かった。

2. 研究の目的

本研究では光遺伝学を活用して蝸牛神経に光感受性タンパク質を遺伝子導入し、個々の細胞レベルでのタンパク質発現量の違いを利用することにより蝸牛神経応答の多様性の獲得を目指す。そして、生理的な蝸牛神経応答を再現し得る光学人工内耳の開発の可能性を検証する。具体的には、光感受性タンパク質であるチャンネルロドプシン2をマウス蝸牛神経に遺伝子導入し、青色光により光誘発性応答を引き起こす。そしてパッチクランプ法(個々の細胞からチャンネル由来電流や活動電位などを記録する手法)にて光誘発性応答の多様性を検証する。

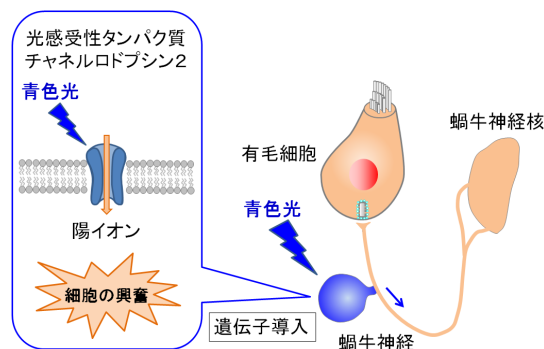


図1. 光遺伝学を活用した新しい蝸牛神経刺激法

光感受性タンパク質・チャンネルロドプシン2は、青色光刺激にて陽イオンを流入させて細胞を興奮させる働きを持つ。これを蝸牛神経に遺伝子導入して人工内耳の先端部より青色光を照射すれば、蝸牛神経が興奮して蝸牛神経核以降に活動電位が伝わっていく。

3. 研究の方法

本研究は以下のように進める。

- (1), 野生型マウスからのラセン神経節初代培養系/蝸牛組織培養系の確立と最適化
- (2), ChR2 遺伝子改変マウスからのラセン神経節初代培養系/蝸牛組織培養系の確立と最適化

(3), (2)の培養系からパッチクランプ法にて光誘発性応答を確認し、実験系を最適化する。

(4), アデノ随伴ウイルスベクターにより野生型マウス蝸牛神経に ChR2 を遺伝子導入する。

(5), ChR2 遺伝子導入後のマウス蝸牛神経からパッチクランプ法により光誘発性応答を確認し、時間分解能、空間分解能、応答の多様性について調べる。

4. 研究成果

(1), チャンネルロドプシン2 遺伝子改変マウスの蝸牛において、チャンネルロドプシン2の発現を示唆する Venus 蛍光を確認した(図2)。

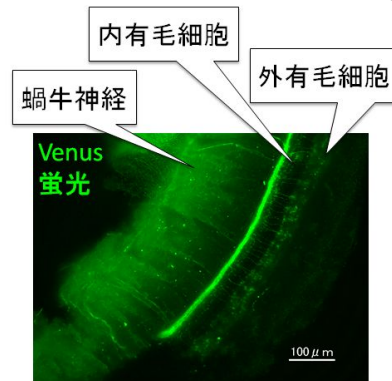


図2. 遺伝子改変マウス蝸牛における光感受性タンパク質(チャンネルロドプシン2)の発現

内・外有毛細胞、蝸牛神経に Venus 蛍光を認める。

(2), チャンネルロドプシン2 遺伝子改変マウスよりコルチ器を摘出して蝸牛神経を対象に青色光刺激を行ったが、有意な応答を得られなかった(図3)。

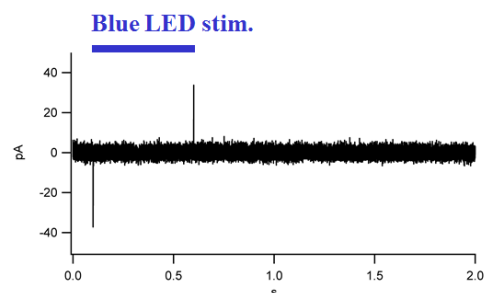


図3. 青色 LED によるチャンネルロドプシン2 遺伝子改変マウス蝸牛神経の刺激の試み
青色 LED により遺伝子改変マウス蝸牛神経を光刺激したが、有意な応答を確認できなかった。

(3), 野生型マウス蝸牛神経から記録される応答(興奮性シナプス後電流の振幅)に多様性があることが知られてきたが、これが内有毛細胞における単一シナプス小胞の融合および融合細孔のダイナミクスによって達成され得るという新規知見を見出し、国際誌に原著論文を発表した(ドイツ・ゲッティンゲン大学耳鼻科との国際共同研究、図4)

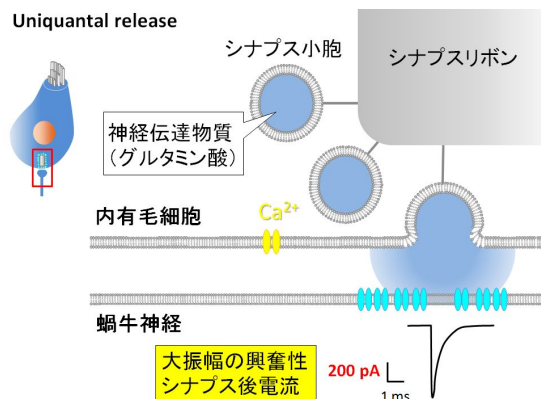


図4 . 単一シナプス小胞による神経伝達物質放出 (uniquantal release) 内有毛細胞から放出される単一シナプス小胞内の神経伝達物質により、蝸牛神経に大きな振幅の興奮性シナプス後電流が生じ得る。

(4), 共同研究先であるドイツ・ゲッティンゲン大学耳鼻科より輸入した難聴マウス (*otoferlin* 遺伝子改変マウス) を対象に実験を行ったところ、難聴遺伝子 *otoferlin* のコードする遺伝子産物が蝸牛神経応答の多様性の形成に関与することが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yoshimoto R, Iwasaki S, Takago H, Nakajima T, Sahara Y, Kitamura K (2015). Developmental increase in hyperpolarization-activated current regulates intrinsic firing properties in rat vestibular ganglion cells. *Neuroscience* 284:632-642. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.10.034.

Chapochnikov NM*, Takago H*, Huang CH, Pangršič T, Khimich D, Neef J, Auge E, Göttfert F, Hell S, Wichmann C, Wolf F, Moser T (2014). Uniquantal release through a dynamic fusion pore is a candidate mechanism of hair cell exocytosis. *Neuron* 83:1389-1403. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuron.2014.08.003. (* 共同筆頭著者)

〔学会発表〕(計8件)

鷹合 秀輝、マウス内有毛細胞リボンシナプスにおける *Otoferlin* による神経伝達物質放出の制御、第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2015 年 5 月 15-17 日、東京

鷹合 秀輝、大島 知子、Tobias Moser、*Otoferlin* はマウス内有毛細胞リボンシナプスにおいてエキソサイトーシスのモードを変える、第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21-23 日、神戸

Takago H, Moser, T. *Otoferlin* alters mode of exocytosis at the inner hair cell ribbon synapse. The 1st annual meeting of the society for bioacoustics, December 13-14, 2014, Ohtsu.

Takago H, Moser T. Evaluation of synaptic function of *otoferlin* at the mouse inner hair cell ribbon synapse by postsynaptic recording. Inner Ear Biology 2014 in Kyoto, November 1-4, 2014. Kyoto.

Yoshimoto R, Iwasaki S, Takago H, Nakajima T, Sahara Y, Kitamura K. Developmental increase in hyperpolarization-activated current regulates intrinsic firing properties in rat vestibular ganglion cells. Inner Ear Biology 2014 in Kyoto. November 1-4, 2014, Kyoto.

鷹合 秀輝、マウス内有毛細胞リボンシナプスにおける神経伝達物質放出様式、第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2014 年 5 月 15-17 日、福岡

鷹合 秀輝、Tobias Moser、マウス内有毛細胞求心性シナプスにおける *otoferlin* の機能の分析、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16-18 日、鹿児島

吉本 亮一、岩崎 真一、鷹合 秀輝、喜多村 健、培養前庭神経節細胞における過分極誘発カチオンチャンネルの特性、第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会、2013 年 11 月 24-26 日、宮崎

鷹合 秀輝、マウス内有毛細胞リボンシナプスにおける Bassoon とシナプスリボンによるシナプス伝達の制御、第 114 回日本耳鼻咽喉科総会・学術講演会、2013 年 5 月 16-18 日、札幌

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷹合 秀輝 (TAKAGO, Hideki)
国立障害者リハビリテーションセンター・
研究所感覚機能系障害研究部・研究室長
研究者番号：70401354

(2) 研究分担者

大島 知子 (OSHIMA-TAKAGO, Tomoko)
国立障害者リハビリテーションセンター・
研究所感覚機能系障害研究部・流動研究員
研究者番号：50731783