

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462555

研究課題名(和文) 先天聾モデル動物における聴覚中枢の周波数特異性の可塑性について

研究課題名(英文) The plasticity of the Tonotopic organization of auditory central nervous system in the congenital deaf model.

研究代表者

伊藤 真人 (Ito, Makoto)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50283106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が確立した新生児期蝸牛破壊モデル(ラット)を用いて、脳幹部聴覚中枢核の興奮性ニューロンの発生学的な変化(再構成)について検討した。新生児期に一側の蝸牛を機械的に破壊したのち、蝸牛神経核、上オリーブ核群におけるVGLUT1の発現の変化を検討した。また正常動物の脳幹部聴覚中枢核にみられるマイクログリアの発生学的な変化についても検討を行った。マイクログリアは神経細胞が障害を受けた場合には、壊れた神経細胞を貪食して周囲環境を整えるスカベンジャー機能があるが、発生の過程でも過剰に存在する神経細胞を減らして、神経回路の整理整頓を行う機能があるとされる。

研究成果の概要(英文)：Unilateral cochlear damage has profound effects on the central auditory pathways in the brain. We examined the effects of unilateral cochlear ablation on VGLUT1 expression in the cochlear nucleus (CN) and the superior olivary complex (SOC) in neonatal rats. VGLUT1 expression in the CN subdivisions (the AVCN, the PVCN and the DCN-deep layers) and the SOC (the MnTB, the LSO and the MSO) ipsilateral to the ablated side was significantly suppressed by unilateral cochlear ablation. Interestingly, VGLUT1 expression in the PVCN and the DCN-deep layers contralateral to the ablated side was also reduced. Our findings indicate that unilateral cochlear ablation affects VGLUT1 expression in the central auditory pathways not only ipsilateral but also contralateral to the ablated side.

研究分野：Otolaryngology

キーワード：central auditory system developmental glutamate microglia

1. 研究開始当初の背景

健聴者では優れた周波数弁別能があることが知られている。人工内耳の弱点とされる音階や音楽の聴き取りのために重要な機能のひとつが周波数弁別能である。聴覚中枢神経核には蝸牛の周波数帯域に一致した層状の周波数特異性(トノトピシティー)が各神経核に存在している。聴覚が障害された場合、後天聾の大脳皮質聴覚野では、トノトピシティーは不明瞭となる事が知られているが、後天聾の下丘以下の脳幹部聴覚中枢におけるトノトピシティーの変化は不明である。さらに、先天聾ではトノトピシティーが形成されるか否かについても、全くわかっていないのが現状である。

先天聾児に対する人工内耳医療の有用性は確立されており、手術年齢も若年化してきている。このことからヒトの先天聾では、その多くが中枢聴覚中継路の発達は正常に近いと期待されている。ところが、従来型の先天聾動物モデルにおける先天聾児に対する人工内耳医療の有用性は確立されており、手術年齢も若年化してきている。このことからヒトの先天聾では、その多くが中枢聴覚中継路の発達は正常に近いと期待されている。ところが、従来型の先天聾動物モデルにおける研究では、蝸牛破壊後に蝸牛神経核の著明な縮小がみられ、その他の聴覚中枢においても広範な変化が認められる。申請者らは、聴覚の開始(Hearing onset)前の新生児期蝸牛破壊による重度の先天聾モデルラットを作成し、その聴覚中枢発生の変化について検討し、聴覚中枢神経核間の投射やカルシウム結合タンパク発現の変化について報告してきた。(Acta Otolaryngol 2009, ARO meeting 2009, 2009年日本耳鼻咽喉科学会)。従来モデルでは内耳蝸牛軸を機械的に破壊し、ラセン神経節細胞の変性・消失(=内耳神経の消失)を伴う重度障害モデルであったため、上位中枢である蝸牛神経核に及ぼす影響も大きかったものと

推測される。つまり従来の先天聾動物モデルは、ヒトの先天性内耳性難聴の病態と大きくかけ離れた重度障害モデルであり、人工内耳の適応とされるラセン神経節細胞が生存しているような非破壊的内耳性難聴のモデルではない。一方、申請者らは人工内耳手術をおこなうような症例により近いモデルとして、蝸牛を破壊せずに内耳毒性を有するアミノグリコシド系抗菌薬であるアミカシンを、生後早期に全身投与することで薬剤性先天聾モデルラットを作成することができた。

申請者らはこの先天聾モデル動物を用いて、下丘への聴覚系の上行性投射について検討し、先天聾における聴覚中枢発生の変化を報告してきた。(Hear Res, 2012)

2. 研究の目的

聴覚中枢の発生については未だ不明な点が多い。近年、先天聾小児の人工内耳手術が増加し、手術時期も低年齢化が進んでいる。しかし、先天聾における聴覚中枢の発生・発達が正常と比べてどのように異なっているかは解明されていない。聴覚中枢の正常発生と、先天聾によっておきる聴覚中枢の変化について知ることは、先天聾小児の人工内耳手術後に、より良い「聴く力」を獲得する上で重要であり、人工内耳医療の今後の可能性を探ることにつながる。本研究の目的は、先天聾によっておきる、聴覚中枢の神経結合の変化を検討することである。

3. 研究の方法

申請者らが確立した新生児期蝸牛破壊モデル(ラット)を用いて、脳幹部聴覚中枢核の興奮性ニューロンの発生的な変化について検討した。新生児期に一側の蝸牛を機械的に破壊したのち、蝸牛神経核、上オリブ核群におけるVGLUT1(Glutamate transporter 1)の発現の変化を検討した。

Immunohistochemistry was performed as described previously, with slight modifications. Both

ablated animals and naive control animals at P60 were deeply anesthetized and perfused transcardially with phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS at the same time. Brains were dissected, post-fixed in 4% PFA/PBS overnight, cryoprotected by two-day immersion in 30% sucrose, and embedded in Optimal Cutting Temperature compound (Tissue-Tek OCT; Sakura, USA). To distinguish sides of the brain ipsilateral and contralateral to the cochlear ablation, the thin needle was used to make a tiny whole which indicated the right cortex or the right brainstem. Coronal sections of 40µm thickness were made using a cryostat (CM 1850, Leica). After being treated with 2% skim milk and 0.5% Triton X-100 in PBS, the sections were incubated overnight with rabbit anti-VGLUT1 antibody (Synaptic Systems) at 4°C. The sections were washed, and incubated with Alexa 488-conjugated secondary antibody (Molecular Probe) and red-fluorescent Nissl stain (Invitrogen) for 2 hours. The sections were then washed and mounted. Epifluorescence microscopy was performed with an AxioImager A1 microscope (Carl Zeiss).

4 . 研究成果

その結果、一側の蝸牛破壊によって同側ばかりではなく、従来知られていなかった反対側の変化も見られることが明らかとなった。本研究結果を英文誌に投稿、受理された。

(The effects of unilateral cochlear ablation on the expression of vesicular glutamate transporter 1 in the lower auditory pathway of neonatal rats. *Auris Nusus Larynx* 2017)

We examined the effects of unilateral cochlear ablation on VGLUT1 expression in the CN and the SOC in neonatal rats. VGLUT1 expression in the CN subdivisions and the SOC ipsilateral to the ablated side was significantly suppressed by unilateral cochlear ablation. VGLUT1 expression in the PVCN and the DCN-deep layers contralateral to the ablated side was also reduced. Most importantly, our findings

indicate that unilateral cochlear ablation affects VGLUT1 expression in the central auditory pathways not only ipsilateral but also contralateral to the ablated side. These results suggest that neonatal cochlear damage leads to profound neurochemical changes in the central auditory pathway.

また、正常動物の脳幹部聴覚中枢核にみられるマイクログリアの発生学的な変化についての検討を行い、ラットの蝸牛神経核に於ける、Ionixed calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1) の変化を検討した。その結果、ラットの Hearing onset である生後 10 日目頃に Iba-1 の著名な一過性の増加が認められることが明らかとなった。マイクログリアは神経細胞が障害を受けた場合には、壊れた神経細胞を貪食して周囲環境を整える働きがあるが (スカベンジャー機能)、発生の過程でも過剰に存在する神経細胞を減らして、神経回路の整理整頓を行う機能があるとされる。この際に聴覚入力マイクログリア活性化の引き金となったのか、マイクログリアによる整理によって Hearing onset が起こるのかについては、次の研究課題である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- 1) Hasegawa H, Hatano M, Sugimoto H, Ito M, Kawasaki H, Yoshizaki T. The effects of unilateral cochlear ablation on the expression of vesicular glutamate transporter 1 in the lower auditory pathway of neonatal rats. *Auris Nasus Larynx*. 2017 Feb 23.
pii: S0385-8146(16)30582-X.
doi: 10.1016/j.anl.2017.01.007.
- 2) Nakamura K, Dias MS, Sasaki T, Sugimoto H, Hatano M, Ito M. Usefulness of reconstructed 3D images for cochlear implantation in a case with a facial nerve anomaly. *Auris Nasus Larynx*. 2018

- pii: S0385-8146(17)30977-X. doi:
10.1016/j.anl.2018.02.002. [Epub ahead of print]
- 3) Ito M, Takahashi H, Iino Y, Kojima H, Hashimoto S, Kamide Y, Kudo F, Kobayashi H, Kuroki H, Nakano A, Hidaka H, Takahashi G, Yoshida H and Nakayama T. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Otitis Media with Effusion (OME) in Children in Japan, 2015. *Auris Nasus Larynx*. 2017
doi: 10.1016/j.anl.2017.03.018.
 - 4) Hatano M, Ito M, Sugimoto H, Noda M, Hasegawa H, Yoshizaki T. Soft-wall reconstruction of the canal wall with retrograde mastoidectomy for pediatric cholesteatoma: Long-term results. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016. 91: 159-165.
DOI:10.1016/j.ijporl.2016.10.029
 - 5) Noda M, Sugimoto S, Ito M and Yoshizaki T. Salivary gland choristoma of the middle ear with alopecia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol Extra*. 2016 14; 15-19.
DOI: 10.1016/j.pedex.2016.10.002
 - 6) Ito M, Maruyama Y, Kitamura K, Kobayashi T, Takahashi H, Yamanaka N, Harabuchi Y, Origasa H, Yoshizaki T. Randomized Controlled Trial of Juzen-taiho-to in Children with Recurrent Acute Otitis Media. *Auris Nasus Larynx*. pii: S0385-8146(16)30450-3.
doi: 10.1016/j.anl.2016.10.002.
 - 7) Shimada D. M, Nakamura K, Sasaki T, Sugimoto H, Ito M. A Case of Congenital Unilateral Facial Nerve Aplasia. *Acta Otolaryngol Case Report*. 2016. 1(1):102-105.
DOI: 10.1080/23772484.2016.1247648)
 - 8) Sasaki T, Iino Y, Masuda M, Ito M. Intratympanic membrane cholesteatoma: a case report. *Acta Otolaryngol Case Report*. 2016; 1: 75-78.
DOI:10.1080/23772484.2016.1241662
 - 9) Ishikawa E, Sugimoto H, Hatano M, Nakanishi Y, Tsuji A, Endo K, Kondo S, Wakisaka N, Murono S, Ito M, Yoshizaki T. Effects of sodium thiosulfate for cisplatin-mediated ototoxicity in patients with head and neck cancer. *Acta Otolaryngol*. 2015. 135, 09, pages 919 - 924.
DOI: 10.3109/00016489.2015.1035797
 - 10) Sugimoto H, Hatano M, Yoshida S, Sakumoto M, Kato H, Ito M, Yoshizaki T. Efficacy of concurrent superselective intra-arterial chemotherapy and radiotherapy for late-stage squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Clinical Otolaryngology*. 2015 40(5): 500-504.
DOI: 10.1111/coa.12431.
 - 11) Moriya S, Hasegawa M, Inamasu J, Kogame H, Hirose Y, Higashi R, Ito M, Imai F. Neuroprotective effects of pregabalin in a rat model of intracisternal facial nerve avulsion. *Journal of Neurosurgical Sciences* 2015 Mar
 - 12) Sugimoto H, Ito M, Hatano M, Yoshizaki T. Persistent stapedia artery with stapes ankylosis. *Auris Nasus Larynx* 2014; 41 (6): 582-585
 - 13) Ueno T, Endo K, Kondo S, Wakisaka N, Murono S, Ito M, Yoshizaki T. Factors Affecting Outcomes of Alternating Chemoradiotherapy for Nasopharyngeal Cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2014; 123(7): 509-516
 - 14) Aga M, Kondo S, Yamada K, Wakisaka N, Nakanishi S. W, Tsuji A, Endo K, Murono S, Ito M, Muramatsu M, Kawano M, Yoshizaki T. Immunoglobulin class switching to IgG4 in Warthin's tumor and analysis of serum IgG4 levels and IgG4-positive plasma cells in the tumor. *Human pathology*. 2014; 45 (4): 793-801
- 〔学会発表〕(計 件)
- 〔図書〕(計 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 件)
- 名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 真人 (ITO, Makoto)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：50283106

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()