

表 題 カナマイシン局所投与による片側性難聴マウスモデルにおける、
らせん神経節のマクロファージ抑制効果

論文の区分 論文博士

著 者 名 ディアス 茉莉

所 属 自治医科大学
耳鼻咽喉科学講座

2024年4月15日申請の学位論文

紹介教員 地域医療学系 専攻 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学
教授・伊藤 真人

目次

第1章 背景.....	2..
第2章 序文（研究の目的）	11
第3章 方法.....	13..
3.1 実験動物.....	15
3.2 聴力測定.....	16
3.3 組織解析.....	17
3.4 倫理審査.....	20
3.5 統計解析.....	20
第4章 結果.....	20
実験1：片側カナマイシン注射後の難聴と蝸牛損傷.....	20
実験2：カナマイシン注射後のSGNの変性.....	24
実験3：カナマイシン注射後のらせん神経節におけるマクロファージ の活性化.....	29
実験4：クロドロン酸配合リポソーム（CL）投与によるマクロファージ の枯渇の影響.....	31
第5章 考察.....	34..
第6章 結語.....	49..
謝辞.....	50
参考文献.....	51..

第1章 背景

難聴について

現在、全世界的に難聴が大きな社会問題となっている。世界人口の約 20%に相当する 15 億人以上が難聴の問題を抱えており、そのうち 4 億 3,000 万人が中等度以上の難聴であると推定されている。2050 年には難聴者人口は 25 億人に増加する可能性があるとも試算されており、今後難聴に対処できない場合、世界全体で年間 9,800 億ドル（日本円にして年間 153 兆円）以上のコストがかかると試算されている¹。

難聴には程度分類があり、25dB までが正常で、26dB 以上を難聴と定義している。26～40dB が軽度難聴、41～70dB が中等度難聴、71～90dB が高度難聴、91dB 以上は重度難聴とされる。（図 1）普通の会話は約 60dB 程度で、40dB 以上の中等度難聴になると聞き返しが自覚的にも増加し、補聴器などが必要になることが増える。90dB 以上の重度難聴となると補聴器での聞き取りに限界が生じ、人工内耳などの適応が考慮されるようになる。

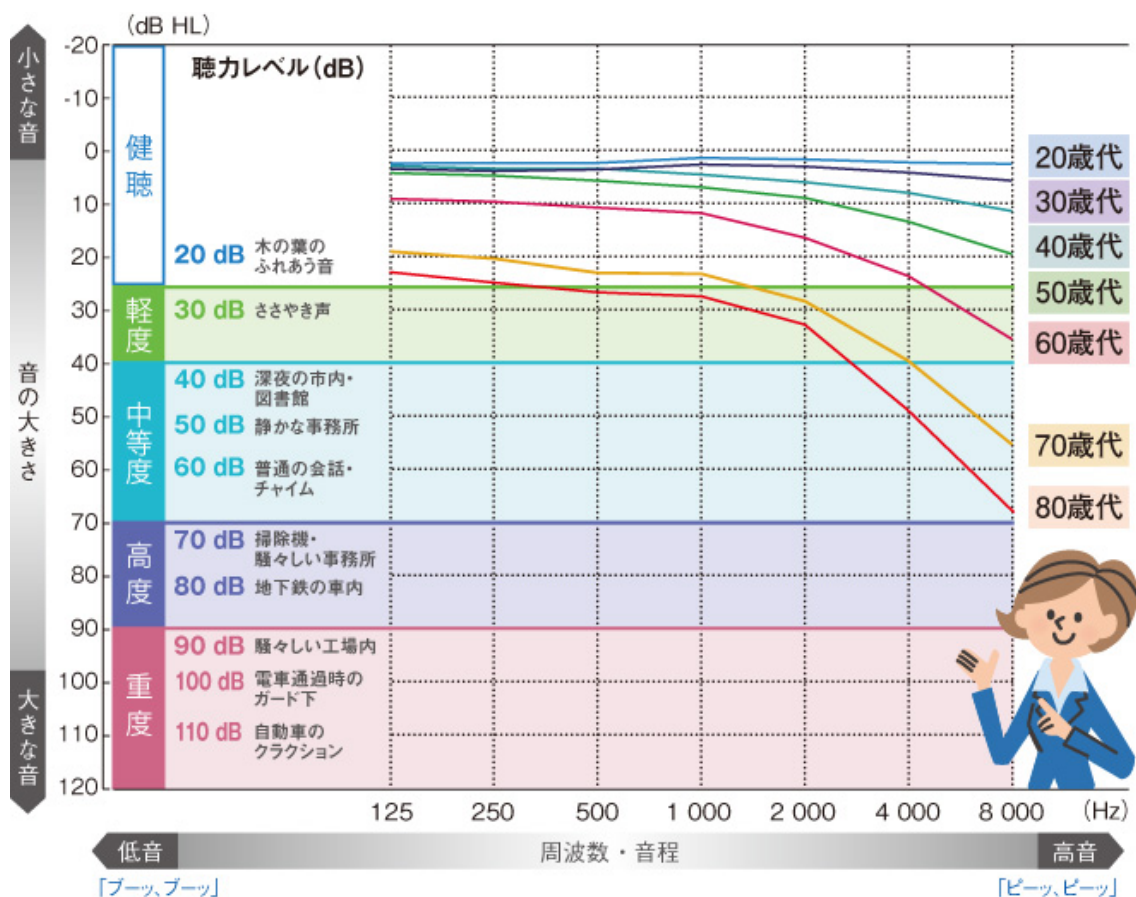


図1 難聴の程度 「よくわかる難聴」金原出版 立木孝 著

我々は、聴覚を通じて周囲の環境を把握し、他者とのコミュニケーションをとり、教育を受け、自分の考えを適切に表現することが可能となる。難聴患者は健聴者に比べて、社会的孤立、うつ病^{2,3}、認知症⁴など、健康への悪影響の有病率が高いことが示されている。また難聴児は、言語習得や社会性の獲得を含む教育の機会が減少するため⁵、成人後の失業率は健聴者に比べてはるかに高いことが知られている⁶。このように、難聴は適切な対処がなされなければ、言語発達、心理社会的幸福、生活の質、教育、経済的自立、メンタルヘルス、対人関係など、人生のさまざまな側面に悪影響を及ぼすことが知られてい

る。さらに片耳難聴であっても、環境雑音下での音声知覚や音の定位など、聞き取り能力が損なわれることから、様々な負の影響が示唆されている^{7,8,9}。

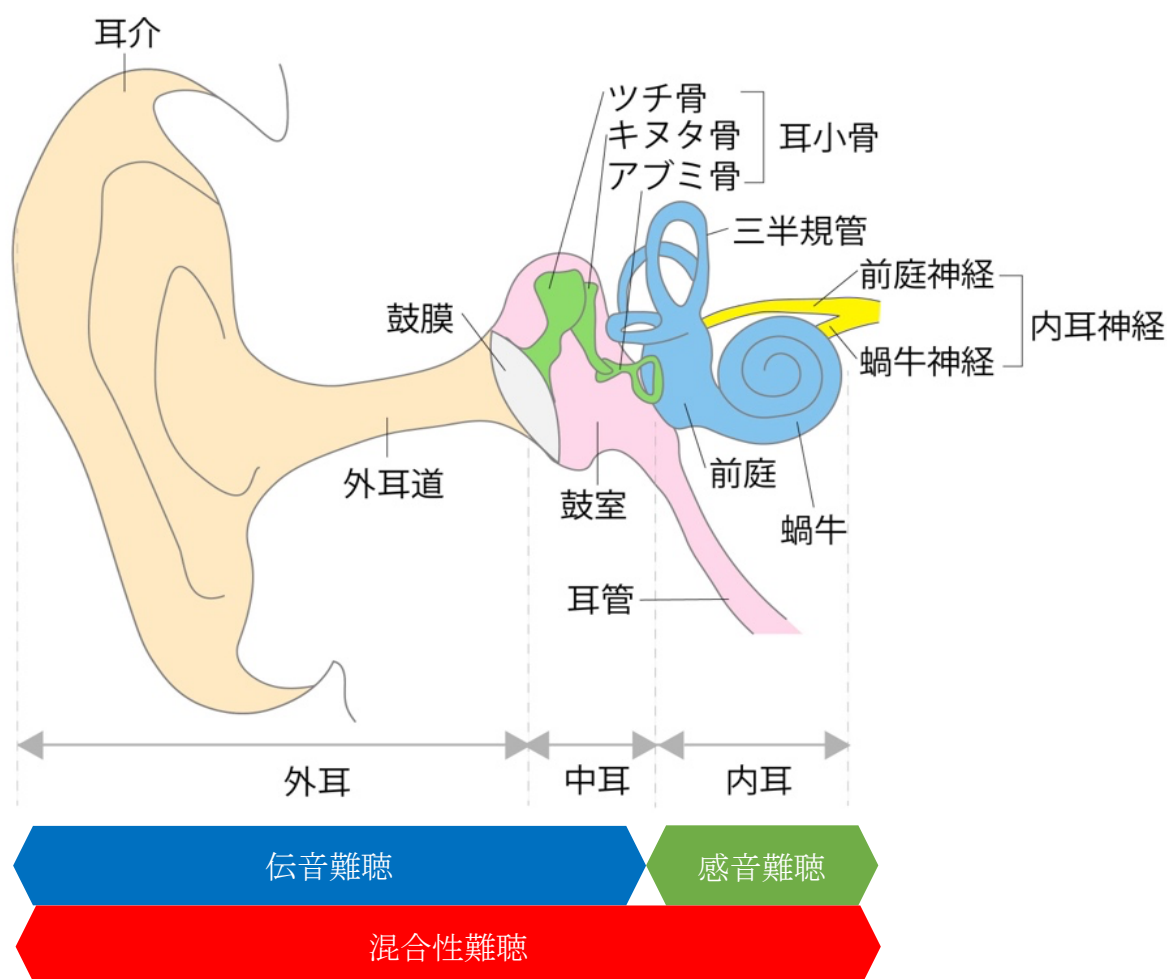


図2 耳の構造

難聴には伝音難聴、感音難聴、混合性難聴がある。伝音難聴は外耳から中耳までの伝音系の異常によってもたらされ、手術治療や補聴器が有効である。一方、感音難聴は内耳から聴覚中枢の異常によるもので、補聴器装用や各種の人工聴覚器の埋め込み手術が行われている。伝音難聴と感音難聴両方の要素があるものを混合性難聴という。(図2) このうち人工内耳は重度の内耳性難聴に

適応となり、内耳に埋め込んだ電極で直接蝸牛内の聴神経を電気刺激することで劇的な聴覚改善が得られる医療である。

内耳の解剖

内耳は音受容を担う蝸牛と平衡器官である前庭・半規管から構成され、蝸牛は螺旋状の3つの空間からなる。それぞれ、前庭階 (Scala vestibuli)、鼓室階 (Scala tympani)、中央階 (Scala media) と呼ばれている。音が耳小骨を介して卵円窓に伝わると、前庭階を流れる外リンパ液に振動が伝わり、蝸牛頂点を経て、鼓室階の外リンパ液へ振動が伝わっていく。中央階には内リンパ液が流れており、内・外リンパ液はイオン組成が異なっている。中央階の外側は血管条やらせん靱帯で構成されていて、これらは毛細血管で蝸牛環境の恒常性を保つ役割がある。蝸牛には脳血管関門のようなバリア機能があり、内耳血液迷路関門 BLB; Blood Labyrinth Barrier と呼ばれている。イオン組成やそれによる蝸牛内電位を調整しており、分子量の大きい物質や炎症細胞の蝸牛内への侵入を阻止するなどの機能を有している。

外リンパ液の振動は基底板といわれる膜状の細胞外基質を振動させ、その上についている音の感覚細胞である1列の内有毛細胞と周波数弁別や音受容の感受性に関わる3列の外有毛細胞およびその下にある支持細胞を揺らす。この音受容の構造をコルチ器という。有毛細胞の感覚毛が屈曲し、Mechanoelectrical Transduction Channel (MET Channel) が開口すると、内リンパ液から K^+ イオンが細胞内に流入し、有毛細胞膜の脱分極を起こし、有毛細胞

胞の求心性神経終末より神経伝達物質（Glutamate）が放出される。有毛細胞はラセン神経（一次聴神経）とシナプスを形成している。音の周波数により基底板の最大振幅域が異なっており、高周波数の音では基底回転側、低周波数では頂回転側に最大振幅が生じることでヒトの正常聴力では 20Hz から 20,000Hz の範囲で音を弁別することができる。（図3）

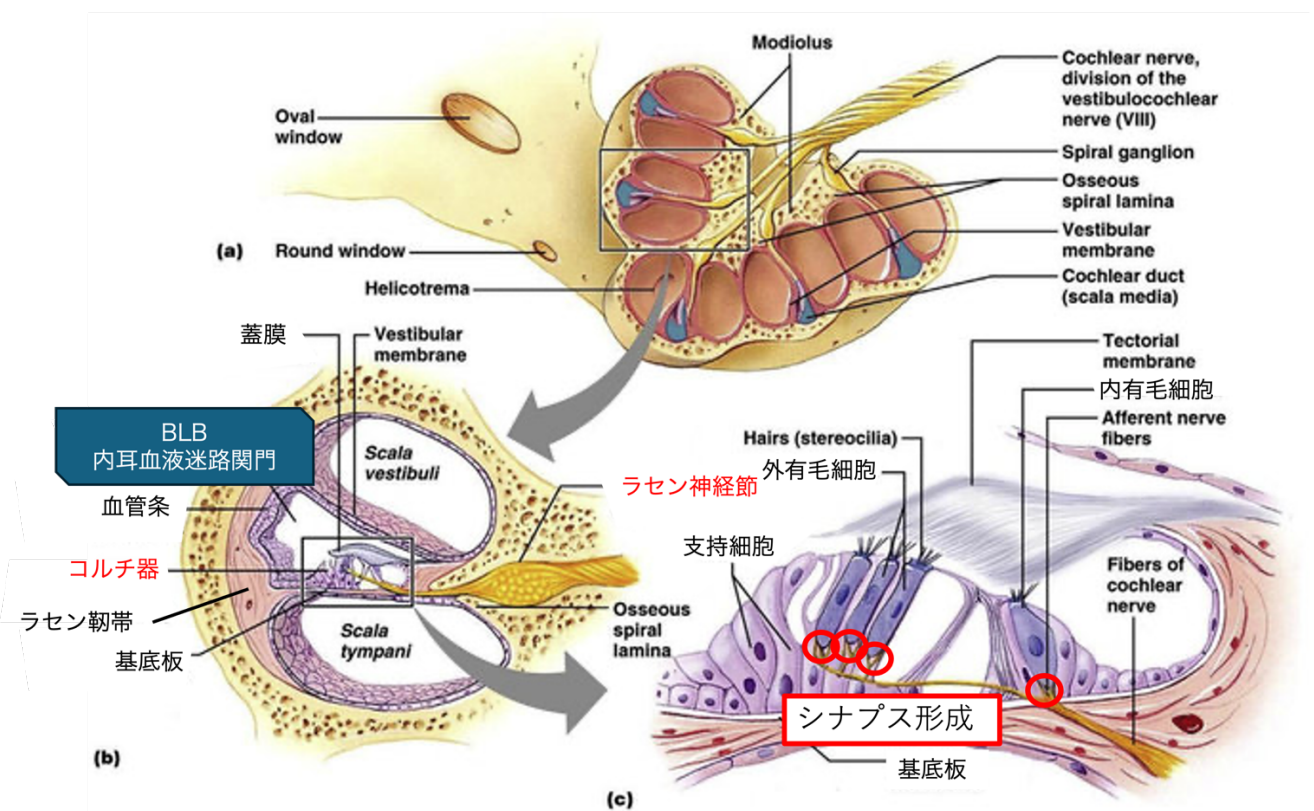


図3 内耳の解剖

Available via license: [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

難聴の原因は、遺伝性、子宮内感染、周産期の低酸素症、高ビリルビン血症、低出生体重、周産期感染症、中耳炎、髄膜炎、耳硬化症、加齢、神経変性疾患、突発性難聴、外傷性、騒音暴露、薬剤性、メニエール病、前庭神経鞘腫、自己免疫疾患など多岐にわたる。このうち、アミノグリコシド系抗菌薬や

白金製剤、ループ利尿薬などの薬剤性難聴は医原性難聴であり、適正医療を行う上での制限因子と成るものである。

アミノグリコシド系抗菌薬による薬剤性難聴の病態について

アミノグリコシド系抗菌薬による内耳毒性は、両側性の重度感音（内耳性）難聴と一時的な前庭機能低下を引き起こすことが知られており、内耳の有毛細胞とらせん神経節ニューロンの変性を伴う不可逆性の難聴を呈する。アミノグリコシド系抗菌薬にはジヒドロストレプトマイシン、トブラマイシン、カナマイシン、アミカシン、ゲンタマイシンなどがある。カナマイシンは内耳の有毛細胞や腎臓の近位尿細管細胞に特異的に取り込まれやすく、これらの細胞は他の細胞に比べてアミノグリコシドを長期間保持する性質をもっている。これは、これらの細胞が高い代謝活性をもち、イオンチャネルやエンドサイトーシスを介した薬物の取り込みが活発であることに起因している¹⁰。In vitro の実験では、アミノグリコシドが有毛細胞上の不動毛の MET チャネルを通して有毛細胞に浸透することが示された。また、内リンパ液から有毛細胞にアミノグリコシドが取り込まれるかどうかを検証するために in vivo で鼓室階にアミノグリコシドを添加した人工外リンパ液を灌流したモデルでは、全身投与と比較して、基底側からの有毛細胞への取り込みが大幅に減少したことから、アミノグリコシドは主に BLB を通って、血管条に到達し、そこから内リンパに排出されて有毛細胞の上部から取り込まれることが示唆された¹¹。

さらにアミノグリコシドは側壁の繊維細胞、らせん神経節、コルチ器官の支持

細胞などにも取り込まれることがわかっている。アミノグリコシドは原核生物では 30S リボソームサブユニットの 16S rRNA の A 部位に結合し、mRNA からの情報の読み間違いを引き起こし、タンパク質合成を阻害する。また、ペプチジル tRNA の移動を妨げることでリボソーム活性を阻害する。これにより、細胞が不安定化し、細胞死に至る¹²。ヒト細胞においては、ミトコンドリア遺伝子 1555A→G 変異によりミトコンドリア立体構造が変化し、バクテリア類似となりアミノグリコシドの結合性が強くなることにより毒性が高くなる可能性がある^{13, 14}。

アミノグリコシドによる内耳障害は、まず基底部の外有毛細胞（outer hair cell; OHC）が主に冒され、次いで内有毛細胞（inner hair cell; IHC）や先端部の OHC へと変性が進む。さらに有毛細胞の変性に続いて支持細胞、神経線維、らせん神経節の変性が引き起こされる^{15, 16}。

感音難聴に対する治療は、基本的には補聴器装用、重度であれば人工内耳手術が適応になる。人工内耳治療では外耳にかけたマイクロフォンで音をひろい、これを電気信号に変えてインプラントに送信し、内耳に埋め込んだ電極で直接蝸牛内の聴神経を電気刺激することで劇的な聴覚改善が得られる。（図 4）

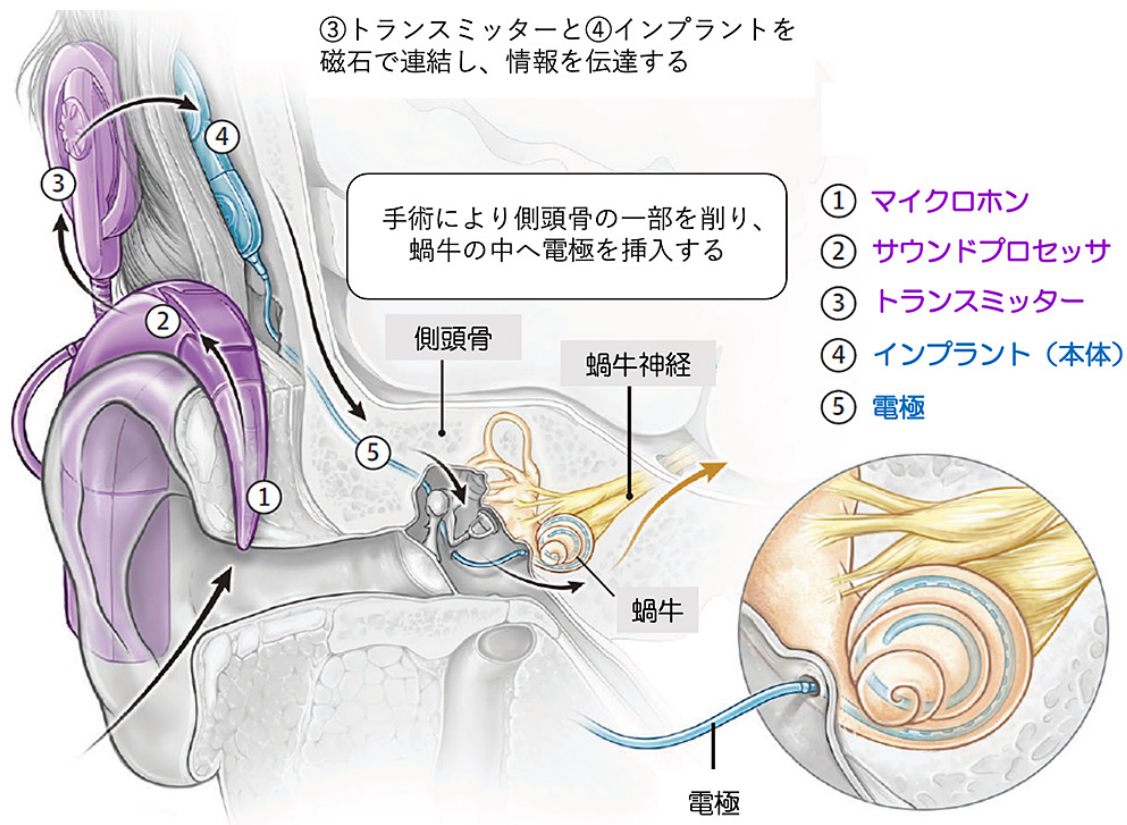


図4 人工内耳

内耳の免疫応答とマクロファージ

内耳が、難聴を引き起こす様々な要因（感染、強大音響、耳毒性薬剤性、人工内耳手術、加齢性難聴など）に暴露された場、内耳免疫細胞が急性および慢性の内耳傷害過程の免疫応答に関与していることが知られている。

蝸牛にはさまざまな内耳免疫細胞が存在するが、なかでもマクロファージは蝸牛に最も多く存在する免疫細胞である。一般的に、マクロファージは代表的な自然細胞免疫で、体に入り込んだ細菌やウイルスなどの病原体や異常細胞などを貪食して排除したり、抗原提示をしたりすることによって生体の恒常性を守っているが、内耳傷害後、内耳マクロファージの数は著しく増加し、マクロ

ファージの形態や表現型も変化する。蝸牛マクロファージには、卵黄嚢由来と骨髄由来があると考えられており、出生直後には主に卵黄嚢由来が存在し、徐々に骨髄由来の単球が分化したマクロファージに置き換わっていく。常在マクロファージの 62%が神経細胞に、36%がらせん靱帯や血管条、骨ラセン板に分布している。これまでの研究では、蝸牛マクロファージは傷害のタイプによって異なる表現型を示すことが示されている。蝸牛の急性傷害では、主に末梢血の単球に由来する浸潤マクロファージ（*1）の増加が主体であるが、蝸牛の慢性傷害では、蝸牛に定常状態で存在する組織マクロファージ（*2）の分化と活性化がみられる。騒音暴露やアミノグリコシドによる耳毒性で障害を受けると、らせん靱帯やらせん神経節にマクロファージが動員されることが報告されている。その他、感覚上皮の支持細胞も有毛細胞などコルチ器が壊れたあと、破片の除去に重要な役割を果たしていることが最近の研究でわかってきている。（図5）しかし、内耳のマクロファージの起源や蝸牛の損傷におけるマクロファージを介した免疫反応の役割について全容はまだ明らかになっていない。

*1:浸潤マクロファージは、傷害を受けた細胞に直接接触したり、サイトカインを分泌したりすることで、蝸牛の炎症反応を賦活化させることがある¹⁷。

*2:組織マクロファージは、らせん神経節、血管条、らせん板縁、らせん靱帯に分布し、多くの場合、紡錘形の細胞体と樹状の細胞突起を有する。

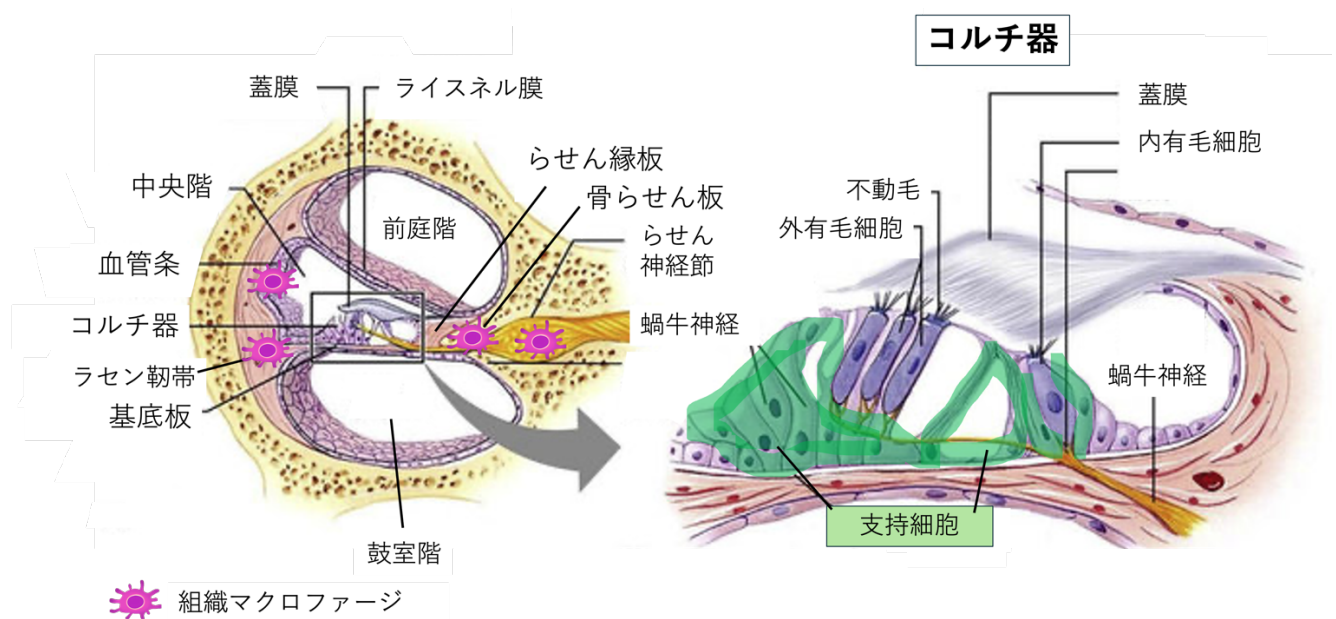


図5 内耳の免疫応答とマクロファージ

第2章 序文 (研究の目的)

内耳性難聴の病態には、蝸牛の損傷、コルチ器における有毛細胞死、らせん神経節での神経変性が含まれる¹⁸。らせん神経節の神経細胞死までいたると、人工内耳手術による聴力の回復も見込めなくなることから、らせん神経節細胞 (Spiral Ganglion Neuron:SGN) の保存は、聴覚能の維持に極めて重要である。生理的条件下では、内耳は血液内耳関門 (blood labyrinth barrier; BLB) によって炎症反応から保護されており、血管条にある高度に特化した毛細血管網がイオン、内因性因子、栄養分を選択的に蝸牛に通過させている¹⁹。しかし最近の研究では、免疫細胞であるマクロファージが蝸牛のさまざまな部位 (脳底膜、骨性らせん膜、らせん靱帯、脈管、らせん神経節など) に存在し、蝸牛環境の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになって

おり²⁰、損傷された有毛細胞を標的として、蝸牛の特定部位において、蝸牛組織マクロファージや蝸牛浸潤マクロファージの遊走と集積が誘導されることが報告されている^{21, 22, 23}。

マクロファージの機能は一般に、組織損傷時の M1（炎症性/毒性系）と M2（抗炎症性/組織修復系）に分類される²⁴。この分類はすべての病態に当てはまるわけではないが、薬剤性難聴の病態において、マクロファージが炎症促進的（M1）に働くのか、炎症収束的（M2）に働くのかはいまだに明らかになっていない。これまでの研究からマクロファージの M1 作用を示唆する報告が多数あり、マクロファージを制御することで、損傷した蝸牛の機能を維持できる可能性が示唆されている。例えば、騒音性難聴マウスモデルでは、蝸牛損傷後 3-7 日目にマクロファージの活性化が炎症性サイトカインである IL-1 β の誘導とともに観察され、蝸牛での M1 炎症促進作用が示唆され²⁵、さらにクロドロン酸配合リポソームを用いてマクロファージを枯渇させると難聴が抑制された。同様に騒音性難聴マウスモデルで、マクロファージに発現する IL-6 レセプターは炎症惹起に関わっているが、抗 IL-6 レセプター抗体によって IL-6 が阻害されると、蝸牛マクロファージの炎症反応が抑制され、その結果、らせん神経節が温存されることによって 4kHz における聴力を改善することが知られている²⁶。さらに薬剤性難聴モデルでは、単球やマクロファージに特異的なマーカー蛋白であるフラクタルカイン受容体 CX3CR1 を欠損させたノックアウトマウスでは、カナマイシン投与によりマクロファージの蝸牛への侵入が増加し、内耳有毛細胞の喪失率が増加する。すなわちマクロファージのフラクタルカイン受容体

CX3CR1 の発現がマクロファージ遊走を抑制し、有毛細胞を保護することが報告されている²³。

そこで本研究では、マクロファージを抑制することで蝸牛損傷を抑制し、聴力を温存することができるか検証することとした。研究の目的として、薬剤性難聴モデルでマクロファージが M1（炎症性／毒性系）作用なのか、M2（抗炎症性／組織修復系）作用なのかということに着目し、第一に、薬剤性難聴モデルにおけるマクロファージ抑制の効果について検討することにした。この実験を行うにあたり、従来の薬剤性難聴モデルでは作成に時間がかかり、致死率も高く、まず、安定したモデル作成技術が必要と考えられた。そのため、カナマイシンを内耳に局所投与して作るモデルが内耳の損傷を形態的に、かつ免疫組織学的に検証するにあたって有用かどうかをまず調べることにした。

第3章 方法

SGN 変性におけるマクロファージの役割を検討するために、カナマイシン局所投与による薬剤性片側難聴モデル（図6）を用いて、SGN におけるマクロファージの活性化状態と SGN の損傷を解析した。カナマイシン局所投与片側難聴モデルでは全身投与よりも速く、より重度の蝸牛損傷を引き起こすことができる²⁷。実験は4つのステップにわけて行った。まず、実験1-3で安定した高度難聴モデルの確立を目指した。実験1でカナマイシン局所投与難聴とコルチ器損傷の検証をした。次に実験2でコルチ器の損傷のあとに続いて起こるらせん神

経節の変性について検証した。実験3でらせん神経節の炎症とマクロファージ活性について、免疫組織学的に検証した。

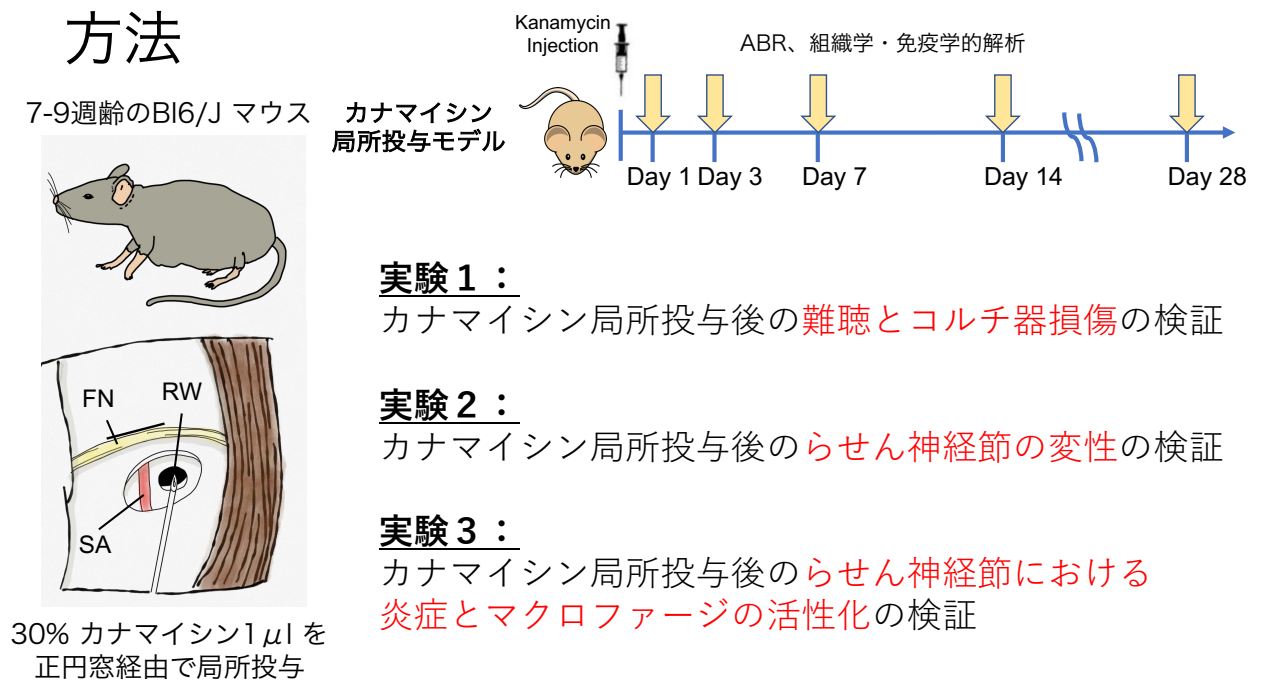


図6 実験1～3プロトコル

カナマイシン局所投与難聴マウスモデルの作成

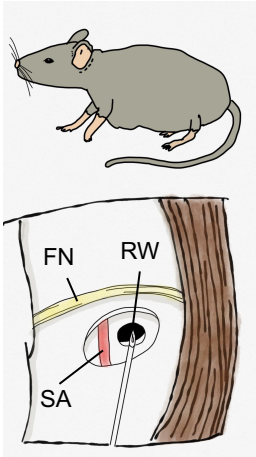
7-9 週齢のオスの BL6/J マウスの耳後部に切開をおき、顔面神経(FN)の下方でドリルで中耳骨包をあけ、あぶみ骨動脈(SA)の内側に存在する正円窓(RW)から30%カナマイシンを1 μ L局所注射した。シャムモデルについては生理食塩水を同様に投与した。day1, 3, 7, 14, 28 に、ABR を測定し組織学的・免疫学的解析を行なった。

さらに、実験4では、実験1-3と同様にカナマイシン局所投与を行ったあと、24時間後にクロドロン酸配合リポソームを腹腔内投与することで全身および蝸牛内のマクロファージを枯渇化させ、コルチ器の損傷、らせん神経節の

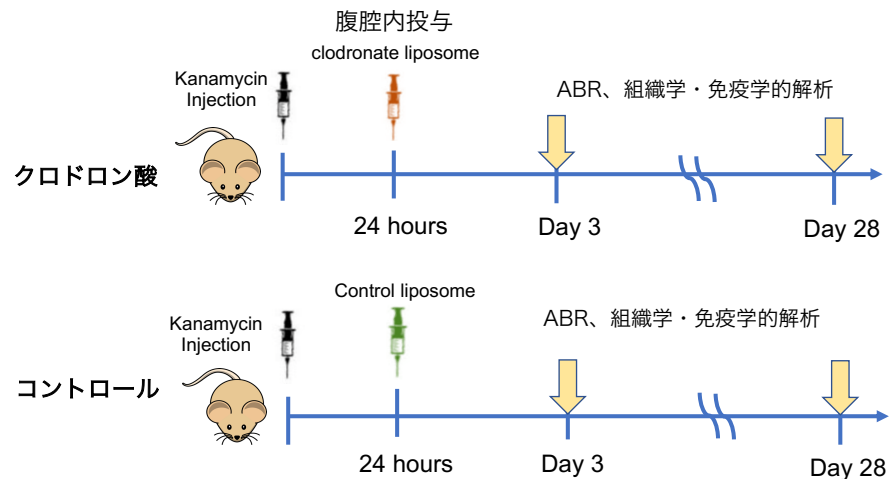
損傷、らせん神経節の炎症反応とマクロファージの活性にどのような影響があるか、また聴力障害について比較検討した（図 7）。

方法

7-9週齢のBL6/J マウス



30% カナマイシン1 μ l を
正円窓経由で局所投与



実験 4 :

クロドロン酸配合リポソーム投与による、
マクロファージの枯渇の影響の検証

図 7 実験 4

クロドロン酸抱合リポソーム (CL) 投与の有無による同モデルの比較検討
Day0 に RW にカナマイシンを投与し、24h 後に CL またはコントロールリポソームを投与した。Day 28 に ABR を測定し、day3 と day28 に組織学的解析を行なった。

3.1 実験動物

マウスは 7-9 週齢の雄の野生型 C57BL6/J（オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本）を用いた。感音難聴の発症率および重症度には性差があるとの報告があるため、本研究では雄マウスのみを用いた²⁸。マウスは搬入後、1 ケージあたり、4-5 匹で飼育を行った。マウスは 12 時間ごとの明暗サイクルで飼育

した。マウス飼育を行う空調室内の相対湿度は50～55%、温度は21～22℃に保たれていた。試験期間中、動物には飼料と水を自由摂取させた。

カナマイシンの蝸牛内注射

シャム手術以外のすべてのマウス (N=49) に対して、Heeringa らが行なった手法に倣って²⁹、正円窓膜からカナマイシンを局所投与した。動物は3種混合注射麻酔薬（塩酸メデトミジン 0.75mg/kg、ミダゾラム 4.0mg/kg、酒石酸ブトルファノール 5.0mg/kg）を腹腔内投与で麻酔したのちに、左耳後部を1cm程度切開し、皮膚を牽引して視野を確保し、中耳骨包を露出させた。骨包にマイクロドリルで小さな穴を開け、生理食塩水に溶解した1 μ Lの30%カナマイシンを微量注射器（33 G 75RN NEUROS SYRINGE HAMILTON Neuros Syringe）を用いて正円窓から蝸牛に局所注入した。正円窓からカナマイシンを注入した後、筋膜細片を正円窓の周りにパッキングし、正円窓を密閉して周囲へのリンパ液の漏れを防いだ。その後、骨包上の皮膚を縫合し、動物を保温マット上で自然覚醒させた（図6）。プラセボ（sham operation）群（N=10）は、カナマイシンの代わりに生理食塩水を蝸牛に注入して同様の処置を行い、注入術後3日目に神経細胞の初期ダメージのマーカである Activating transcription factor 3 (ATF3) の活性化を、術後7日目にSGNの変性について評価した。

3.2 聴力測定

聴力測定は、カナマイシン投与後1, 3, 7, 14, 28日目とシャム手術術後7

日目（各 5 匹）および CL とコントロールリポソーム群のそれぞれ 3 日目と 28 日目（各 4 匹）に行った。薬物投与後の聴力閾値の変化を評価するため、誘発電位検査装置（Tucker-Davis Technologies and Scope software, Alachua, FL, USA）を用いて聴性脳幹反応（Auditory brainstem response : ABR）を測定した。ABR の記録と評価は、盲検化され独立した研究者によって分析された。動物は前記 3 種混合注射麻酔薬の腹腔内投与で麻酔し、防音室にて測定を行った。ABR はマウスの耳介に差し込まれたスピーカーより発せられたトーンピップ音刺激により、耳介後方と頭頂部に刺入した皮下電極を用いて記録され、アース電極は尾部近くの背部に設置した。4、8、16、32kHz の音刺激を 100 から 10dB まで 10dB ステップで、最終的に閾値付近では 5dB 間隔で、加算回数 256 回の応答から平均波形を作成した。聴覚閾値は、再現性のある波形が得られる最小の刺激強度とした。波形は、刺激音の強度が小さくなるにつれて潜時が長くなり、振幅が小さくなることで聴覚誘発反応であることが確認された。

3.3 組織解析

シャム手術群 7 日目とカナマイシン注入術後 7 日目、術後 28 日目にそれぞれ 4 匹ずつ、およびクロドロン酸配合リポソーム投与後 28 日目とコントロールリポソーム投与後 28 日の群を 4 匹ずつ、HE 染色用に灌流固定した。マウスは、前記 3 種混合注射麻酔薬を腹腔内投与で麻酔した後、0.01M リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で経心灌流し、4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定した。断頭後、側頭骨を剖出して摘出した蝸牛骨包を 4%パラホルムアルデヒド

溶液で一晩浸漬固定後、0.12M エチレンジアミン四酢酸で脱灰、30%ショ糖液中で凍結保存した。蝸牛はPBSで洗浄し、70、80、90%エタノールで15分間、100%エタノールで30分間と60分間脱灰した。その後、キシレンで30分間、2回洗浄した。その後、標本を液体パラフィンに3回浸し、パラフィンケースで固形パラフィンを用いてブロックし、46-52°Cで1日間インキュベートした。組織を4 μ m 厚の切片に切り出し、Heamatoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。

免疫組織化学的解析は、カナマイシン投与後1日目、3日目、7日目、14日目、28日目、シャム手術3日目に各5匹ずつ、またクロドロン酸配合リポソーム投与術後3日目とコントロールリポソーム投与術後3日目にそれぞれ4匹ずつ用いて切片を作成した。組織を30%スクロースで凍結保護し、水平スライド式ミクロトームで10 μ m の厚さで切片作成した (n=24)。Activating transcription factor 3 (ATF3) (Abcam, Cambridge, UK カタログ #ab207434)、Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) (FUJIFILM, Tokyo, Japan カタログ #019-19741)、ニューロンマーカーである β III-チューブリン (MERCK Millipore, Darmstadt, Germany カタログ #AB9354) を用いて免疫組織染色を行った。核の対比染色としてDAPI (NACALAITESQUE, INC., Kyoto, Japan カタログ #19178-91) を用いた。Iba1 と DAPI および、 β III-tubulin と ATF3 は多重染色を行った。組織学的観察および画像取得はオリンパス BX51 顕微鏡 (オリンパス、京都、日本) を用いて行った。定量化のために、基底回転、中回転および頂回転に分けて、各回転におけるSGNを識別し、image J ソフトウェア (バージョン 1.50i、Wayne Rasband、National Institutes of

Health, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて、らせん神経節領域ごとに SGN の神経細胞数をカウントした。細胞数のカウントは、一個体につき 4 枚の切片を無作為に抽出し、その平均値をその個体の細胞数とした。組織学的評価は、手順を盲検化した独立した研究者によって解析された。解析に適した切片が十分数得られない個体もあったため、Iba1 および DAPI の多重染色はカナマイシン投与後 1 日目、3 日目、7 日目、4 日目で各 N=4、さらにクロドロン酸抱合リポソーム投与群とコントロールリポソーム投与群で各 N=4 からデータを得た。 β III-tubulin と ATF3 の多重染色は、術後 28 日目が N=3、術後 1 日目、3 日目、14 日目が各 N=4、術後 7 日目、シャム術後 3 日目が各 N=5、クロドロン酸抱合リポソーム投与群とコントロールリポソーム投与群で各 N=4 からデータを得た。

クロドロン酸抱合リポソームの投与

マクロファージの枯渇化はリポソームに封入されたクロドロン酸 (18 mg/mL) : クロドロン酸抱合リポソーム CL を腹腔内投与し、コントロール群として (PBS) カプセル化リポソームを投与した。CL およびコントロール (PBS) カプセル化リポソームは Hygieia Bioscience (大阪、日本) から購入し、使用まで -80°C で保存した。カナマイシン注射の 24 時間後に 200 μ L の CL またはコントロールリポソームを腹腔内注射した (各群 N = 8)。この投与量は、製造業者による推奨と既報告文献²⁵ に基づいて決定した。手術の 3 日後 (各群 N = 4) および 28 日後 (各群 N = 4)、マウスを麻酔下で灌流固定し、免疫組織化学分

析のために蝸牛を採取した。

また、カナマイシン注射 28 日後に灌流固定前に ABR を測定した（各 N = 4）。

3.4 倫理審査

すべての手順は、自治医科大学動物愛護管理委員会（21016-02）の監督および承認を受け、日本生理学会の動物愛護に関する施設審査委員会ガイドラインおよび ARRIVE ガイドラインに準拠した。

3.5 統計解析

統計解析は SPSS v. 26.0 software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) を用いて行った。らせん神経節における生存神経細胞、ATF3 陽性ニューロン、Iba1 陽性マクロファージの数は、一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて評価した。ABR の結果と、マクロファージを除去した群と対照群との SGN の比較解析は、二元配置分散分析で評価した。条件比較には post hoc Bonferroni 検定を用いた。すべての値は平均値±標準誤差で表し、 $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

第4章 結果

実験1：片側カナマイシン注射後の難聴と蝸牛損傷

片側カナマイシン注射後のマウスの難聴の程度を確認するため、カナマイシン投与後1日目、3日目、7日目、14日目、28日目に患側に対し、クリック音と4つの試験周波数（4、8、16、32kHz）で聴性脳幹反応（ABR）を測定した。（各

N=5) その結果、7 日目、14 日目、28 日目で明らかな閾値上昇をみとめ、7 日目以降の ABR の測定値には有意差を認めなかった。また、1 日目、3 日目の測定値にも有意差を認めなかった。そのため、術後 7 日目に高度難聴が完成すると考えられた。(図 8)

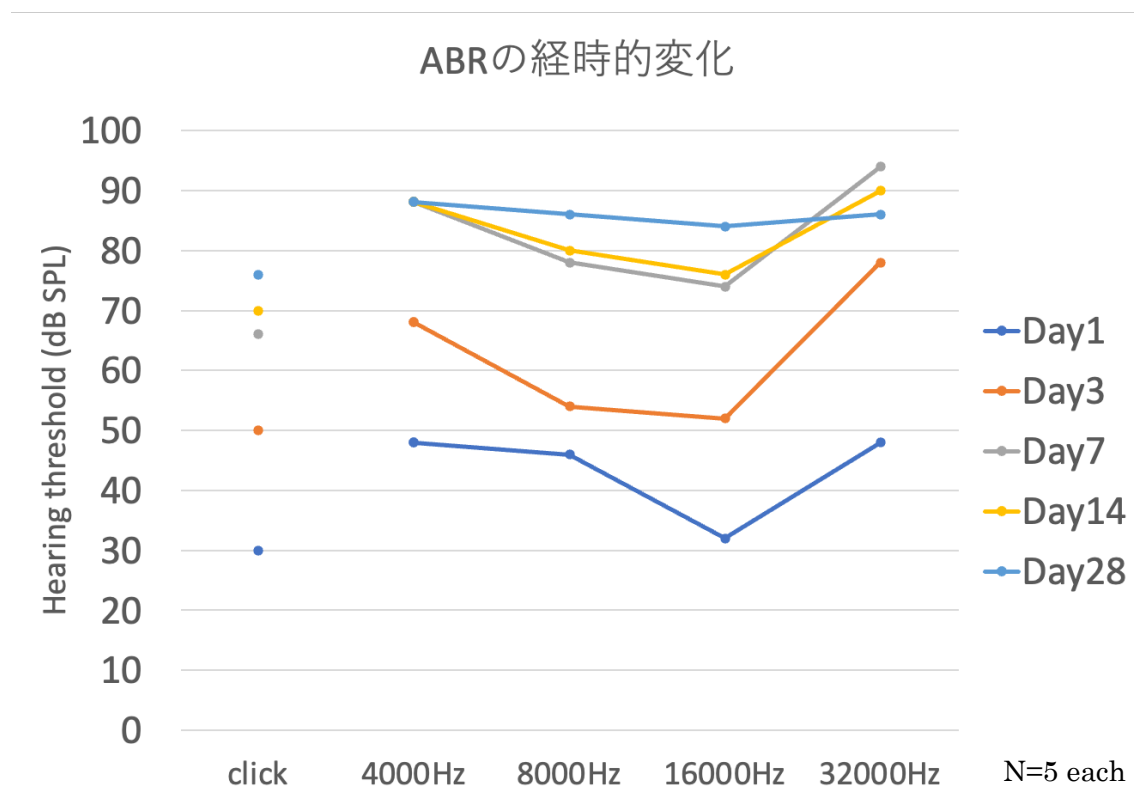


図 8 カナマイシン投与後の ABR の経時的変化

カナマイシン投与後 1 日目、3 日目、7 日目、14 日目、28 日目での Click, 4000Hz, 8000Hz, 16000Hz, 32000Hz の ABR を測定した。(N=5 each)

次に、7 日目に左耳（同側、難聴側）、右耳（対側）、プラセボ手術耳（生理食塩水注射耳）に対して、クリック音と 4 つの試験周波数（4、8、16、32kHz）で聴性脳幹反応（ABR）を測定した。難聴側では、どの周波数の刺激に対して

も、ABR 閾値が対側およびプラセボ手術を行った耳と比較して有意に上昇し (図 9a)、カナマイシン注射後の片側性難聴が高度であることが示された。これらの結果は、左蝸牛にカナマイシンを注射して 7 日後に重度難聴を報告したマウスの先行研究²⁶と一致していた。実験機器の制限から、対側の耳にマスキングを適用しなかったため、カナマイシンを投与した耳の ABR 結果は測定値よりも悪い可能性がある。

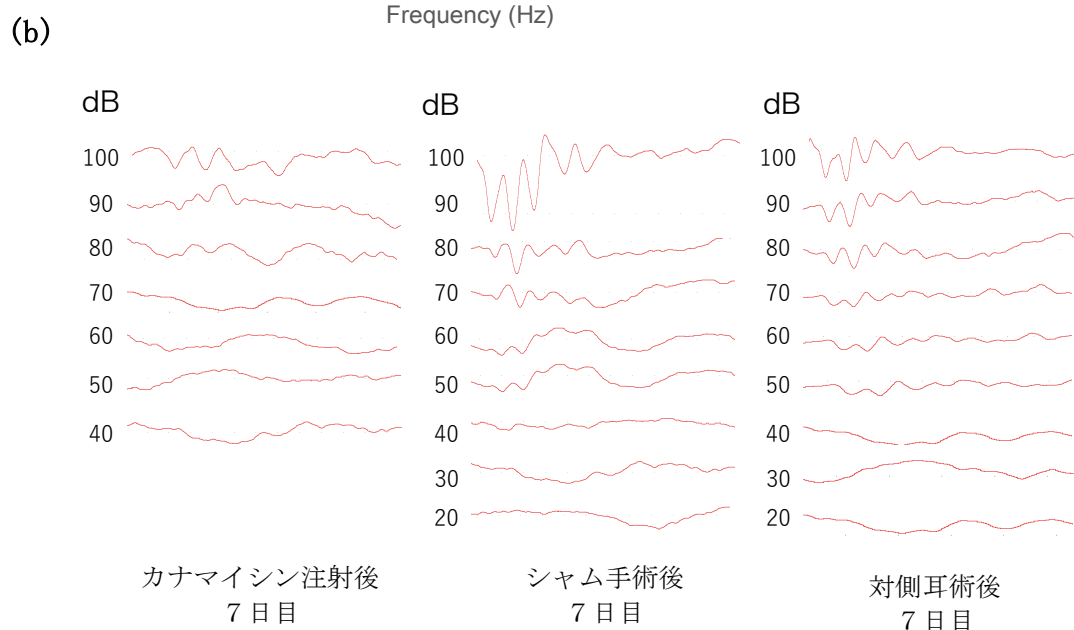
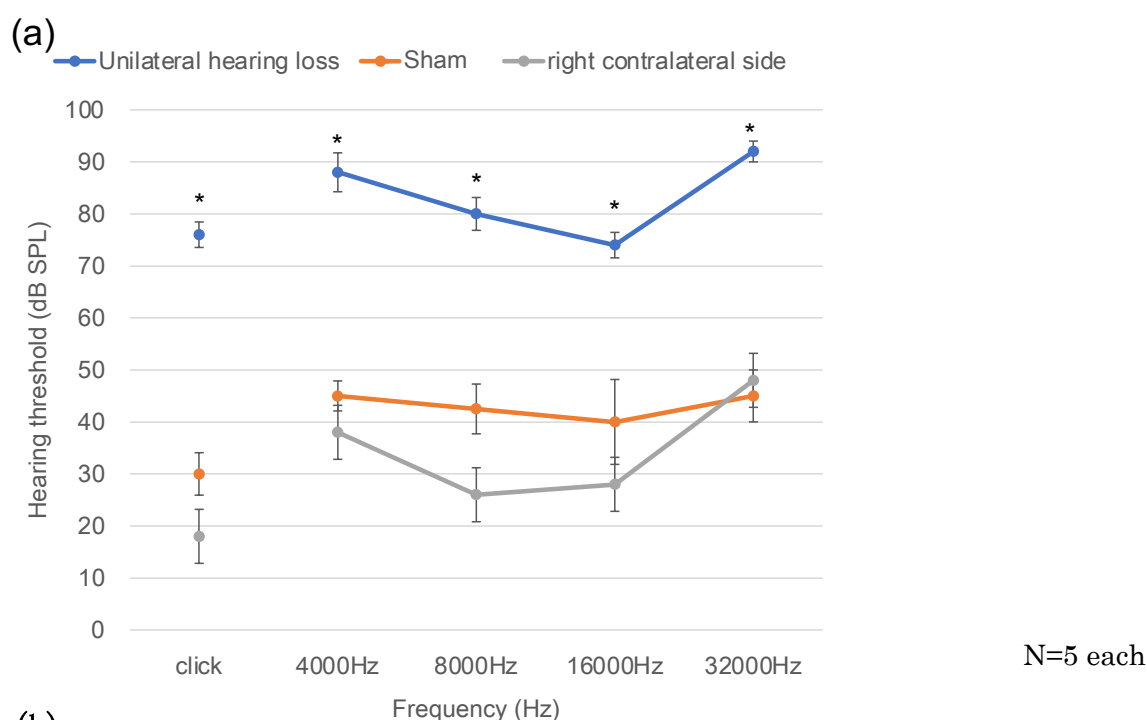


図9 カナマイシン注射後の難聴

(a) カナマイシン注射耳、対側耳およびシャム手術耳の術後7日目のABR

カナマイシン注射耳（青）の閾値は、シャム手術耳（橙）と比較し、すべての周波数において35-45dB SPL上昇している。データは平均値±標準誤差で表した。各群の代表的ABR波形（4000Hz）を示した。（各N=5、* $p < 0.05$ 二元配置分散分析）

(b) カナマイシン注射耳、対側耳およびシャム手術耳の術後7日目の4000Hzの代表的ABR波形

次に、カナマイシン注射7日後の蝸牛の形態学的変化を解析するためにヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。カナマイシンを注射したマウスのコルチ器官では、外有毛細胞と内有毛細胞が失われ、網状膜（reticular lamina）とコルチトンネルが破綻していたが、柱細胞（pillar cell）とその他の支持細胞は部分的に保存されていた（図10a-d）。基底部の上皮のほとんどは強く損傷されていたが、頂回転および中回転の上皮は、蝸牛によって損傷の程度が異なる傾向があった（データは示さず）。

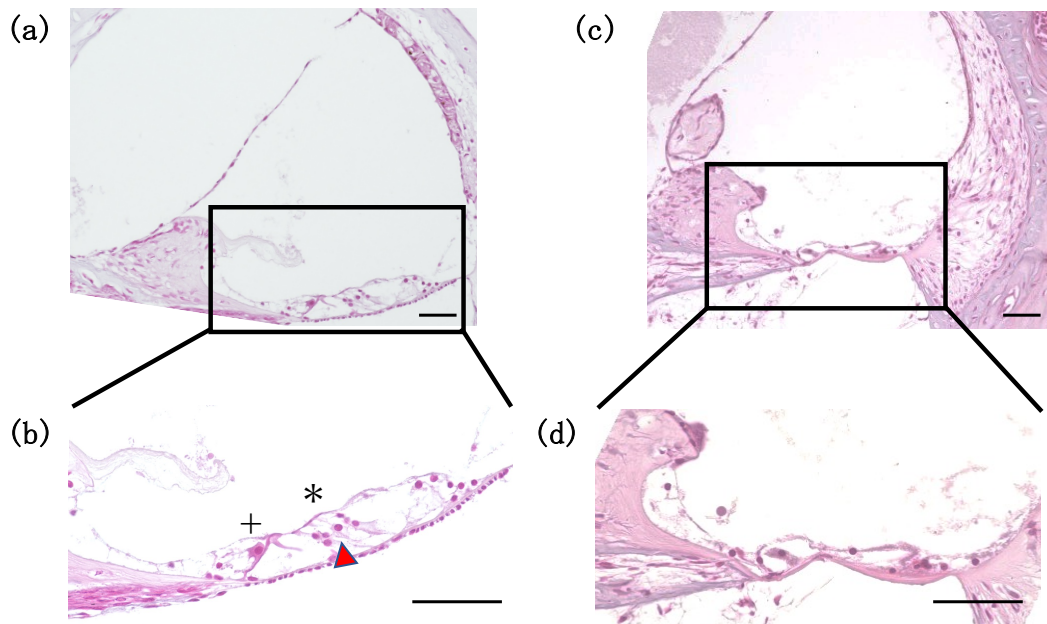


図 10 カナマイシン注射後の蝸牛構造の変化

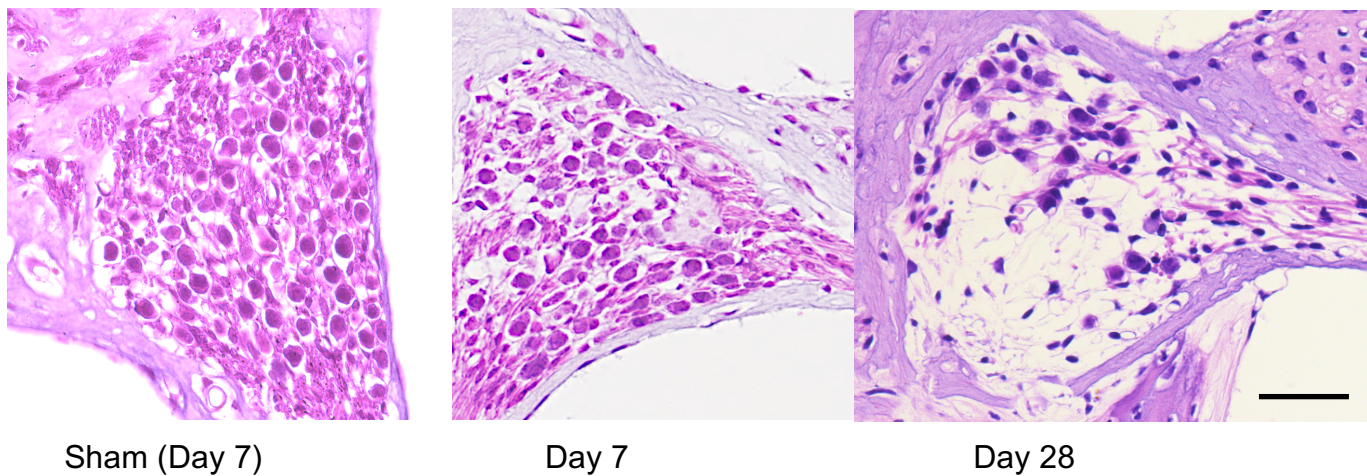
(a) 蝸牛基底回転の正常構造と (b) 外有毛細胞 (*), 内有毛細胞 (+)、Deiter 細胞 (赤矢頭)、(c) カナマイシン注射後 7 日目の蝸牛基底部の構造と (d) その拡大像。カナマイシンを注射した耳では内有毛細胞と外有毛細胞の消失、網状層とコルチトンネルの破裂が観察されるが、ピラー細胞と他の支持細胞は部分的に保存されている。スケール=50 μ m

実験 2 : カナマイシン注射後の SGN の変性

SGN の神経細胞の変性について HE 染色を用いて形態学的評価を行なった。カナマイシン注射後 7 日目でマウスは著しい難聴を示していたにもかかわらず、7 日目では SGN はよく保存されていた。カナマイシン注射後 28 日目では SGN の神経細胞は大幅に喪失し、まばらに観察された (図 11a)。定量化した結果を図 11b に示した。カナマイシン投与群では 28 日目に SGN の数が有意に減少してい

ることが確認された（図 11b）。カナマイシン注射後早期における SGN の損傷を評価するために、神経損傷早期に鋭敏に反応する損傷神経細胞のマーカーである activating transcription factor 3 (ATF3) (赤色)^{31, 32, 33} と神経細胞のマーカーである β III-チューブリン (緑色) を用いて、プラセボ手術マウスおよびカナマイシン誘発片側難聴の 1、3、7、14、28 日後マウス由来の切片を用いて免疫組織染色を行った（図 12）。ATF3 陽性ニューロンの数はカナマイシン注射後 3 日目にピークに達し、その後、蝸牛の頂回転、中回転、基底回転およびすべての回転の平均で減少した。一方、 β III-チューブリン陽性ニューロンの数は、カナマイシン注射後 28 日目でのみ減少し、これは HE 染色の結果と一致した。

(a)



(b)

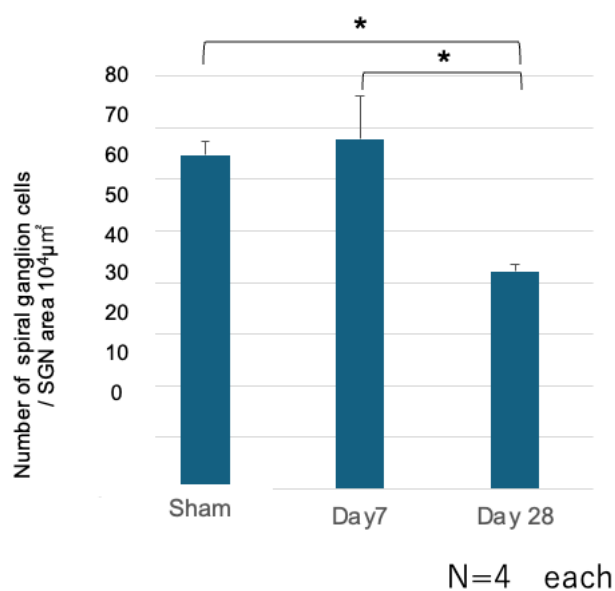
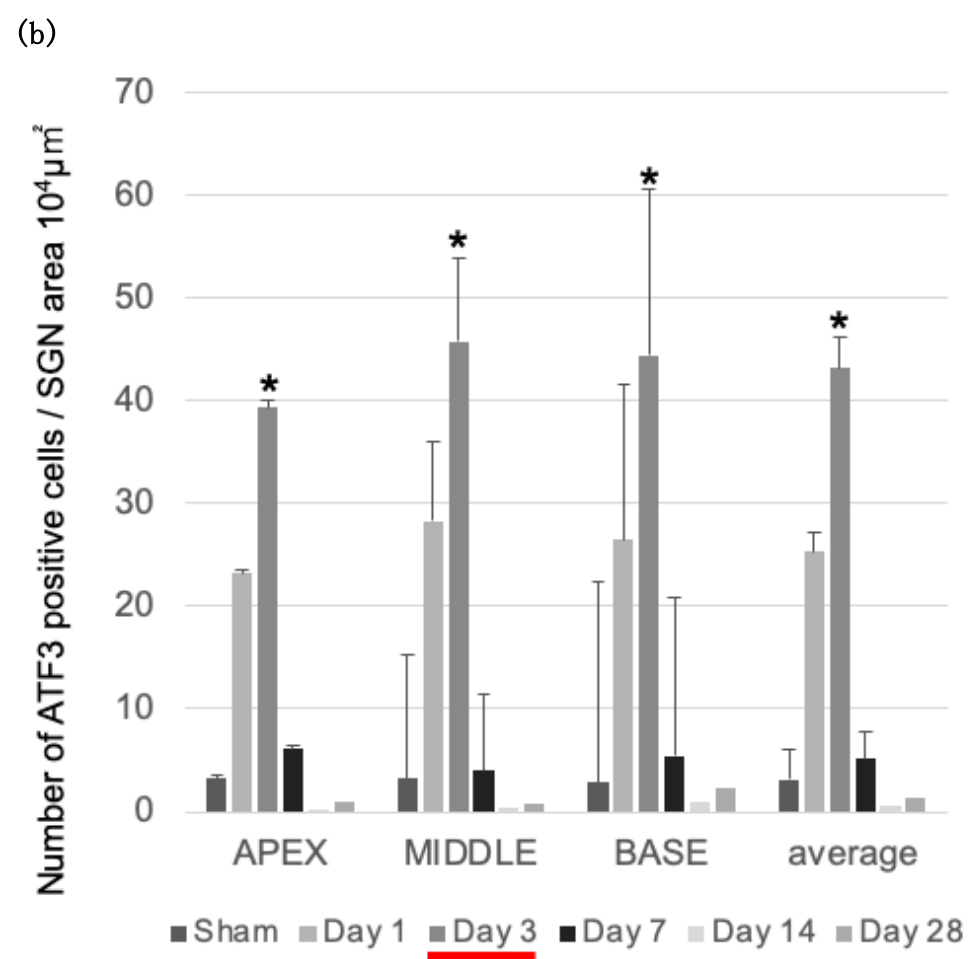
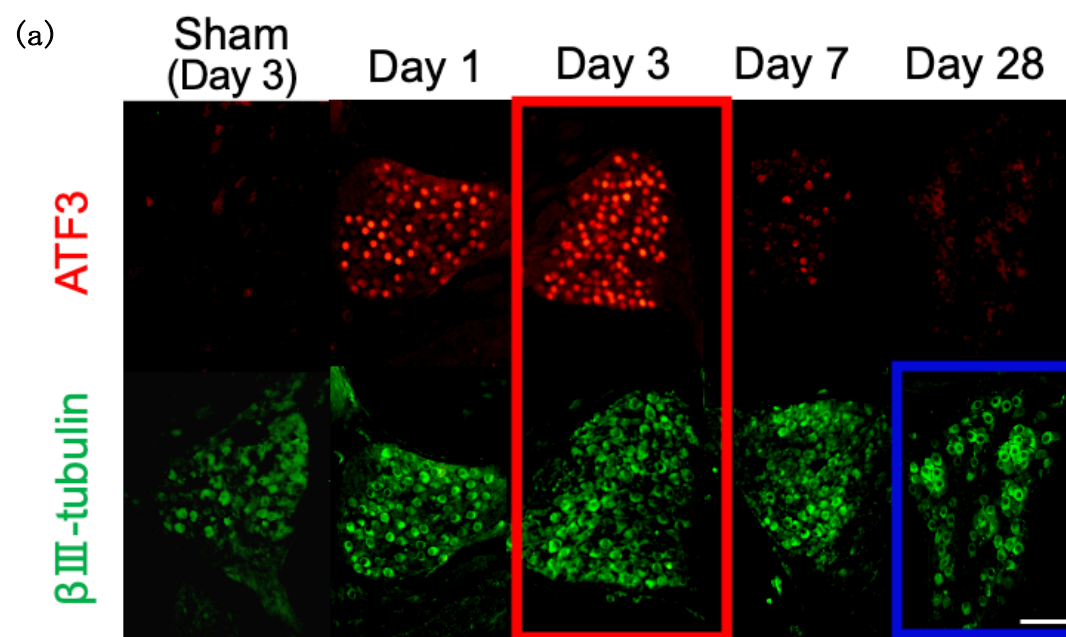


図 11 実験 2 カナマイシン局所投与モデルにおけるらせん神経節の変性

(a) プラセボ手術後 7 日目、カナマイシン注射後 7 日目および 28 日目の蝸牛基底回転のらせん神経節の HE 染色、SGN は 7 日目にはよく保存されていたが、28 日目には著明脱失している。スケール=50 μm (b) プラセボ手術後 7 日目、カナマイシン注射後 7 日目および 28 日目の蝸牛基底回転のらせん神経節の細胞数。N=4、* $p < 0.05$ 、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後、post hoc Bonferroni 検定。



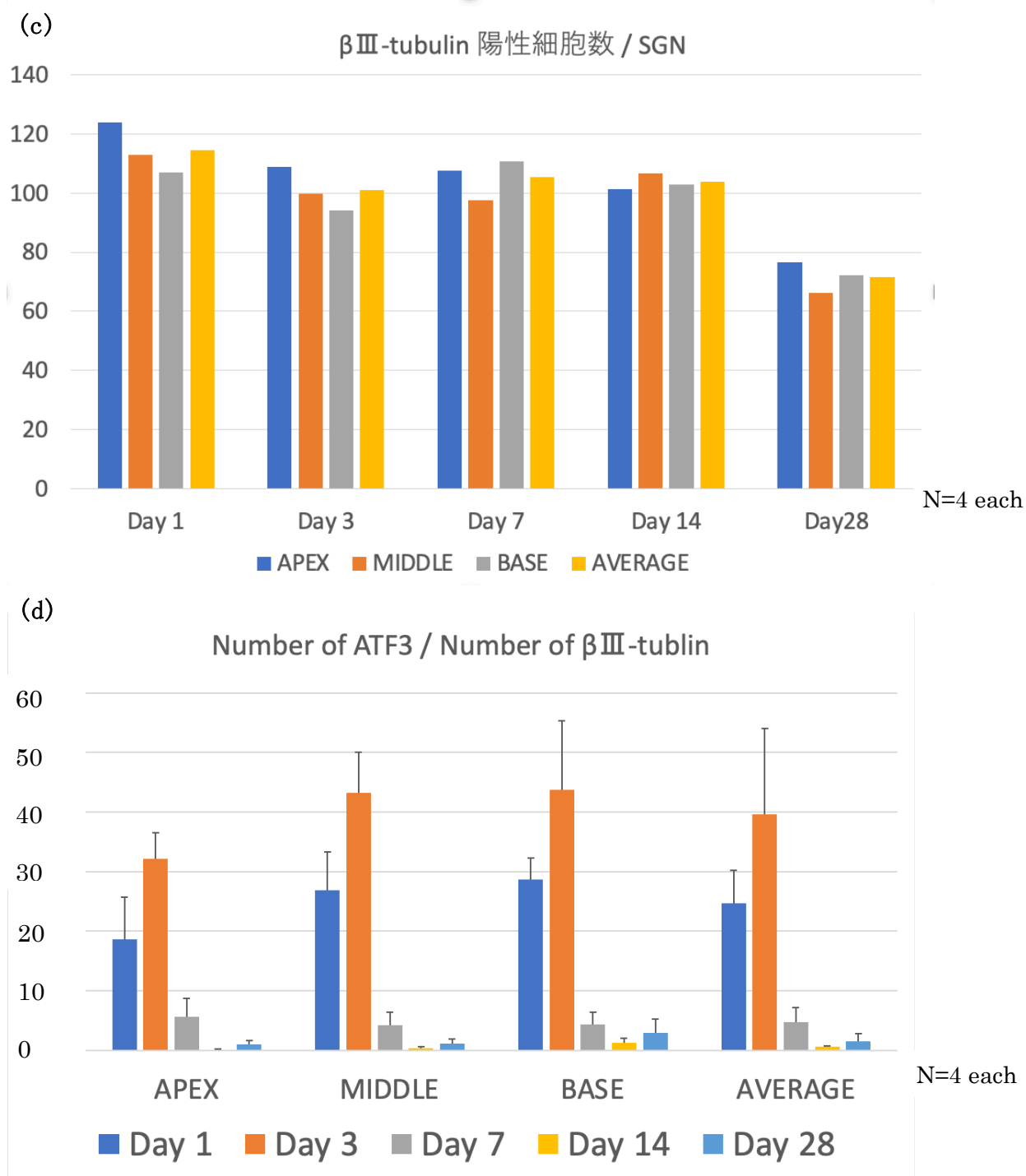


図 12 実験 3 カナマイシン局所投与モデルにおけるらせん神経節の炎症と神経障害

(a) プラセボ手術およびカナマイシン注射後の SGN における ATF3 (赤) と β III-tubulin (緑) の発現。スケール=50 μ m。 (b) 偽手術から 3 日目およびカナマイシン注射後 1, 3, 7, 14, 28 日目の、頂、中、基底回転における ATF3 陽性細胞数、および全回転の均。カナマイシン注射後 3 日目にその数が有意に多い。1 日目、3 日目、14 日目は N=4、シャム手術 3 日目、7 日目は N=5、28 日目は N=3。

(c) SGN あたりの β III-tubulin 陽性細胞数

(d) β III-tubulin 陽性細胞数あたりの ATF3 陽性細胞数の結果を示した。神経細胞マーカー β III-tubulin 陽性細胞は術後 28 日目のみ減少した。

実験 3 : カナマイシン注射後のらせん神経節におけるマクロファージの活性化

カナマイシン注射後のらせん神経節におけるマクロファージの活性化状態を評価するために、イオン化カルシウム結合アダプター分子 1 (Iba1) を用いて免疫組織染色を行った。Iba1 はミクログリアやマクロファージなどの免疫細胞の活性化や存在を示すマーカー蛋白で、神経炎症においてミクログリア/マクロファージの活性化を示すのに一般的に使用される。内耳領域の研究では、人工内耳挿入後のマクロファージの分布と出現率を検討した報告で螺旋靱帯とらせん神経節で Iba1 陽性細胞の密度が著しく高かったことが報告されており、マクロファージがこれらの特定の部位で増加していることが示唆された³⁴。Iba1 陽性細胞の数はカナマイシン注射後に増加し、注射 3 日後にピークに達した

(図 13)。さらに、らせん神経節の Iba1 陽性マクロファージは 3 日目に細胞体が大きくなり、アメーバ状となり、マクロファージの活性化を示唆した³⁵。

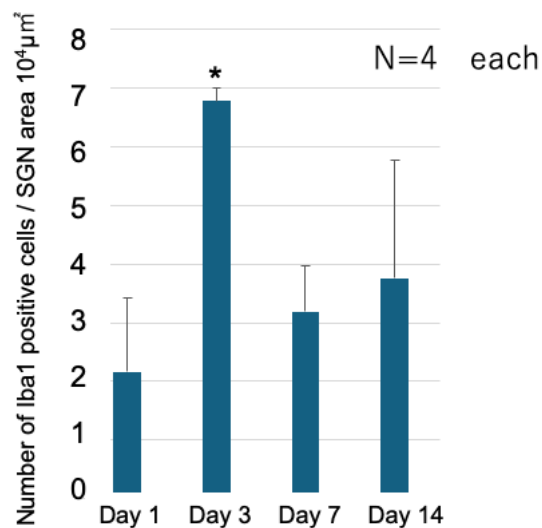
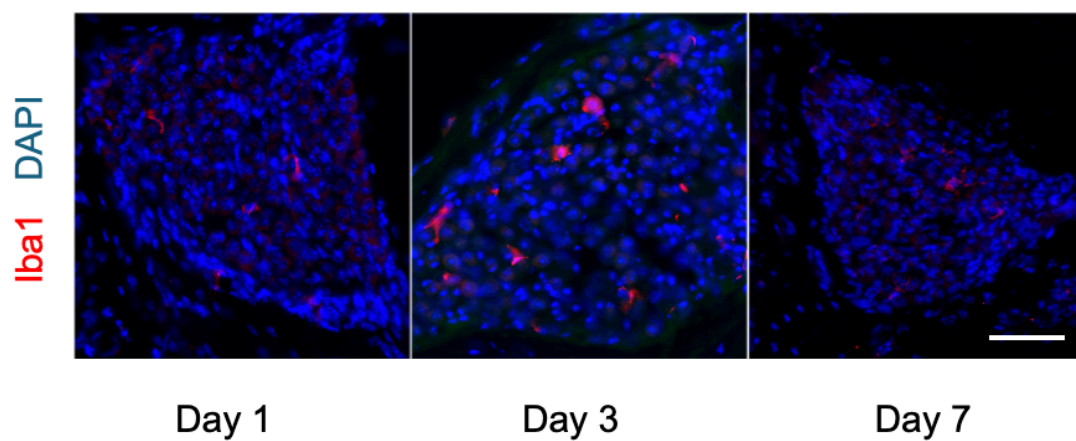


図 1 3 実験 3 カナマイシン局所投与モデルにおけるらせん神経節のマクロファージ活性

カナマイシン注射後、指定された日数における基底回転のらせん神経節における Iba1(赤)の発現。スケール=50 μm(f) 1 日目、3 日目、7 日目、14 日目

の脊髄神経節における Iba1 陽性細胞の数。N = 各 4、*p < 0.05 one-way ANOVA と Bonferroni post hoc test。

実験 4：クロドロン酸配合リポソーム (CL) 投与によるマクロファージの枯渇の影響

カナマイシン注射後の SGN におけるマクロファージの役割を調べるために、クロドロン酸配合リポソーム (CL) をカナマイシン注射の 24 時間後に 3.6mg CL/マウスで投与した。免疫組織化学的解析の結果、Iba1 陽性マクロファージは、カナマイシン注射の 3 日後にはほとんど観察されなかった (図 14a)。さらに、HE 染色により、カナマイシン注射後 28 日目には、SGN は CL 投与マウスでは保存されていたが、コントロール群の (PBS) カプセル化リポソーム投与マウスでは SGN は変性消失した (図 14b)。コルチ器については、コントロールリポソームを投与したマウスは、有毛細胞だけでなく、コルチトンネルや支持細胞などの他の構造にも強い損傷を示したが、CL 投与マウスでは、有毛細胞の変性がみられたが、コルチトンネルと支持細胞の構造は比較的よく保たれていた (図 14c)。

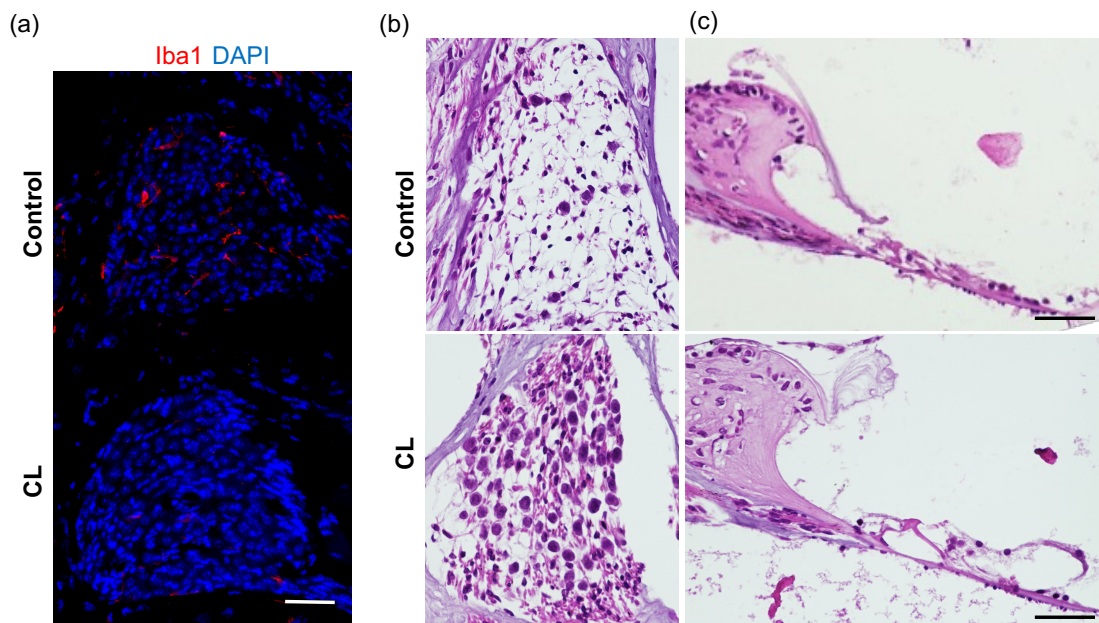
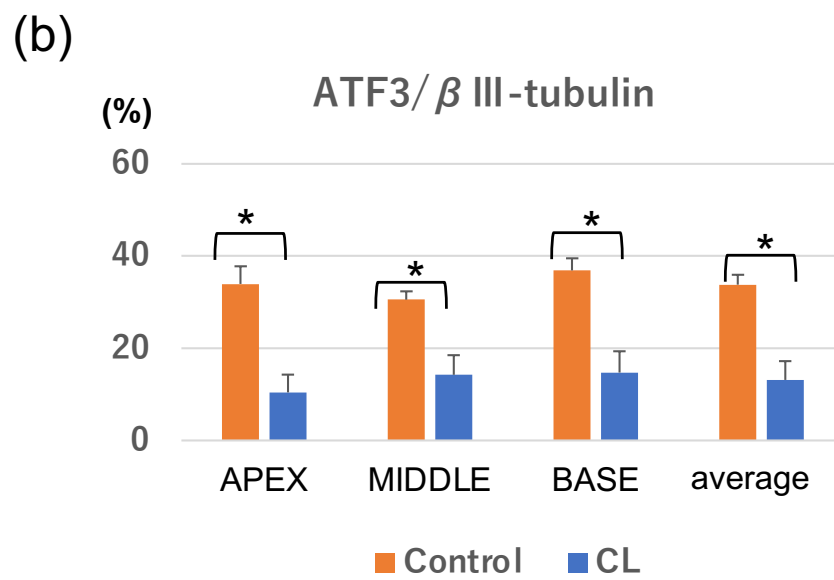
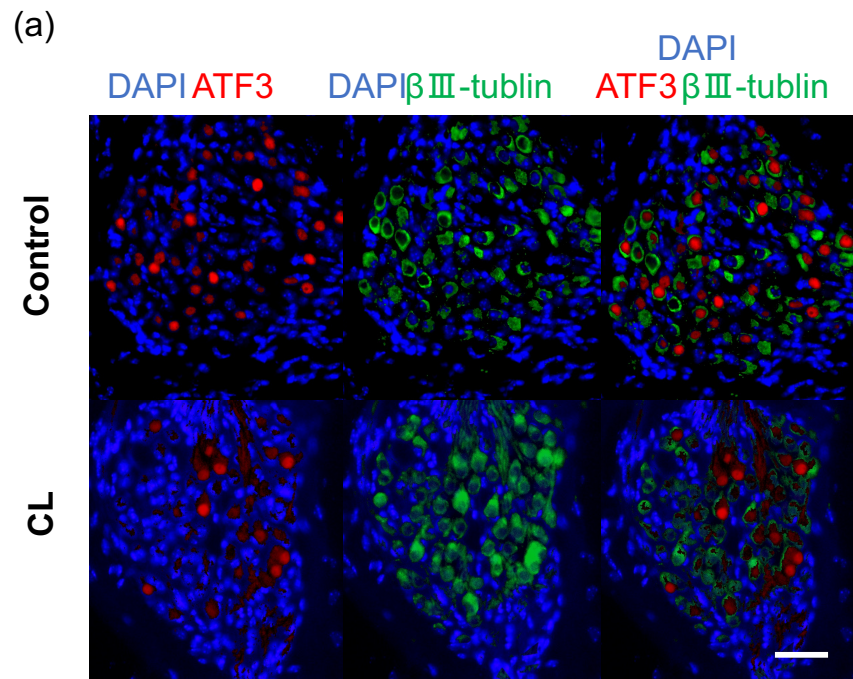


図 14 カナマイシン注射後のマクロファージの消失と SGN の保存

(a) カナマイシン注射後 3 日目のらせん神経節における基底回転での Iba1 (赤) と DAPI (青) の免疫組織化学染色。Iba1 陽性マクロファージの数は CL を投与したマウスではかなり少ない。スケール=50 μ m。 (b, c) カナマイシン注射後 28 日目のコントロールマウスと CL 投与マウスのらせん神経節 (b) とコルチ器官 (c) の HE 染色。画像は蝸牛の基底回転からのものである。スケール=50 μ m。

HE 染色の結果と一致して、免疫組織化学的に、CL 投与マウスではカナマイシン注射後 3 日目に ATF3 陽性ニューロンの数が有意に少ないことが明らかになり、このモデルにおける CL の神経保護効果が示唆された (図 15a、b)。

さらに ABR 解析を行ったところ、CL 投与マウスでは閾値がわずかにシフトしたことから、CL による聴覚機能の部分的回復が示唆された (図 15c)。



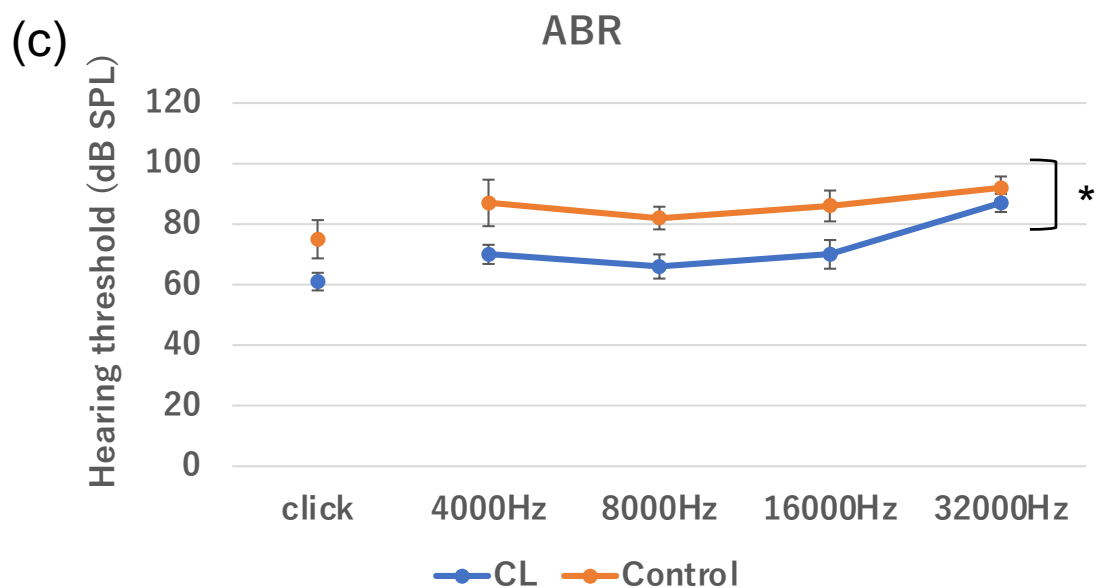


図 1 5 カナマイシン注射後のコントロールマウスと CL 投与マウスにおける SGN の変性

(a) カナマイシン注射 3 日後の SGN における ATF3 (赤) と β III-チューブリン (緑) の発現。スケール=50 μ m。 (b) カナマイシン注入 3 日後の、頂、中、基底回転における ATF3 陽性細胞数/ β III-チューブリン陽性細胞数、および全回転の平均。全回転で CL 投与マウスで有意に低い。N = 4 each, * $p < 0.05$ by two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. (c) カナマイシン注射 28 日後のコントロールマウスと CL 投与マウスの ABR の変化。CL 投与マウス (青) の ABR 閾値は、すべての周波数において、コントロールマウス (橙) より 10-15 dB SPL 程度低下した。

第 5 章 考察

本研究ではまず、使用した動物モデルの検証のため、片側カナマイシン注射後の難聴と蝸牛損傷の程度について確認した。その結果、カナマイシンの蝸牛内局所投与によって、7 日後には広範囲の周波数に及ぶ難聴が引き起こされるとともに、コルチ器の有毛細胞と網状膜、コルチトンネルの破壊が確認された

(実験 1)。次に、カナマイシン投与後の SGN の変性を検証したところ、投与後 7 日目でマウスは著しい難聴を示していたにもかかわらず、SGN はよく保存されていた。その後、カナマイシン投与後 28 日目において SGN の神経細胞は大幅に消失した。さらに、カナマイシン投与後の神経変性過程におけるマクロファージの活性化状態と SGN の損傷について検討したところ、カナマイシン投与後 3 日目に初期神経障害を示す ATF3 陽性ニューロン数がピークに達し、その後は減少した。一方、神経細胞マーカーである β III-チューブリン陽性細胞数は、カナマイシン注射後 28 日目でのみ減少していた (実験 2)。これは HE 染色結果と一致しており、初期の神経障害 (ATF3 陽性) に引き続いて、遅れて神経細胞死が惹起されることが確認された。さらにミクログリアやマクロファージなどの免疫細胞のマーカーである Iba1 染色によって、らせん神経節の Iba1 陽性免疫細胞はカナマイシン投与後 3 日目には細胞体が増大し、細胞数も最大となりマクロファージの活性化が起きたことを示していた。これは、ATF3 発現によって示された初期神経障害とほぼ同じ時期であり (実験 3)、マクロファージの活性化によって神経障害が惹起されたことを示唆している。次に、CL を用いてマクロファージを薬理的に枯渇化させると、聴覚機能は部分的な改善にとどまったものの、SGN は変性から保護された。この結果は、カナマイシン注射後の SGN 変性の初期段階におけるマクロファージの毒性的役割を示唆している。CL 投与マウスではカナマイシン注射後 3 日目に ATF3 陽性ニューロンの数が有意に少ないことから、このモデルにおける CL の神経保護効果が示唆された (実験 4)。

耳毒性薬剤による難聴モデルについて

これまでの耳毒性薬剤による難聴の報告は全身投与モデルがほとんどであった。従来の全身投与モデルは、1週間程度、薬剤投与を腹腔経由や静脈経由で連日行うもので、手技も煩雑な上に時間がかかり、さらに腎機能障害などで致死率が非常に高いことも問題であった。様々なマウスの耳毒性モデルを比較した報告では、ネオマイシンや高用量のカナマイシン（800mg/kg/12時間、皮下投与）はマウスにおいて高い死亡率が示され、特にネオマイシン投与による死亡率は71%にも達したことが報告されている。アミカシンは最も低い死亡率（25%）であったものの、聴力障害は軽微であった³⁶。

全身投与と比較して、カナマイシンの局所投与は、速やかに難聴とミクログリア／マクロファージの動員を含む炎症を誘導することができる³⁷。モルモットの内耳にカナマイシンとフロセミドを局所投与した実験では、局所投与による有毛細胞の損失とらせん神経節の変性が特に蝸牛の基底回転で顕著に確認されており、薬剤が基底回に作用していると考えられている。全身投与モデルでは聴覚喪失が不完全であったり、可逆的であったりする一方、局所投与モデルでは安定して、不可逆的な難聴モデルを作成することが可能であることが示された³⁸。さらにこのモデルは、腎毒性をはじめとした致死的なカナマイシンの副作用を最小限に抑え、死亡率を低下させることができる³⁹ことから、内耳性難聴モデルとして有用であることが示唆された。（図16）⁴⁰また、一側聾モデルを作成することができるのも利点であると考えられた。臨床における薬剤性難聴は通常、全身的に投与された薬剤が血流を通じて内リンパ液を通じて MET チャ

ネルを介して有毛細胞に達し、結果として難聴をきたすことが多い。一方で、正円窓から直接注入されたアミノグリコシドは、外リンパ液を拡散し、その後内リンパ液に移行したのちに有毛細胞に取り込まれるため、局所投与では全身的な薬剤動態や毒性の影響が十分に再現できない可能性に留意する必要がある。

投与方法による相違点

・局所投与

- ・ RWM→鼓室階の外リンパ液→基底膜側の骨内の穿通小管→ローゼンタール管→モダイオラス→コルチ器官
- ・ 高濃度の薬剤が直接蝸牛に入る
- ・ 直接障害（酸化ストレスなど）

・全身投与

- ・ 血流→BLB→内リンパ液→METチャネル→有毛細胞
- ・ 低濃度の薬剤がゆっくりと有毛細胞まで到達する
- ・ 炎症反応による慢性的な障害
- ・ 腎障害などによる高い致死率

図 16 投与方法による相違点

実臨床で遭遇することの多い耳毒性薬剤全身投与や外傷モデルは、安定したモデル作成が難しく、内耳を観察する目的では、健側との対比ができないことなどが制約となる。また、聴器毒性を有する局所用薬剤は少なからずあり、例えばクロルヘキシジングルコン酸エタノール（ヒビテン）、ポピドンヨード液、ピオクタニン液、ブロー液（13%酢酸アルミニウム溶液）、アミノグリコシド系抗菌薬（ゲンタマイシン等）などが挙げられる。これらの薬剤を鼓膜穿孔を伴う症例に使用し、内耳障害を発症する事例があり、日本耳科学会からも

注意喚起が出されており、本研究のモデルはこのような臨床における耳毒性薬剤の局所投与による難聴の病態に即したものである。

クロドロン酸によるマクロファージ枯渇モデルのメカニズムとその限界

本研究において、カナマイシン投与後早期にマクロファージの活性化が惹起されるとともに、ATF3 陽性の初期神経障害が認められ、遅れて SGN の神経細胞死が観察されたが、この反応はクロドロン酸（ジクロロメチレンビスホスホネート）投与によって抑制された。クロドロン酸は細胞内で ATP 類似体として、ATP 代謝を阻害することが知られている。臨床では、破骨細胞を壊して骨吸収を阻害するので、第一世代のビスホスホネート製剤として骨粗鬆症の治療に用いられてきた⁴¹。さらに、kato らは、クロドロン酸がプリン作動性化学伝達の開始に重要な分子である小胞ヌクレオチド輸送体の阻害を介して、骨粗鬆症とは無関係な神経障害性疼痛や炎症性疼痛を有意に抑制することを報告している⁴²。クロドロン酸配合リポソームは、マクロファージに取り込まれやすいリン脂質二重膜にクロドロン酸を封入したもので、マクロファージに取り込まれたあと、リポソーム部分はリソソームホスホリパーゼによって消化されるが、クロドロン酸はマクロファージに留まることになる。クロドロン酸配合リポソームがマクロファージに摂取され続けると、クロドロン酸はマクロファージ内に蓄積し最終的にはマクロファージのアポトーシスを誘導することで、マクロファージを枯渇化する作用があることが知られている。(図 17)

🟡 クロドロン酸 (CL)によるマクロファージの枯渇

- 細胞内でATP類似体として**ATP代謝を阻害**
- 破骨細胞の枯渇化により、骨吸収を阻害する
⇒ 骨粗鬆症治療薬として利用（ビスホスホネート製剤）
- クロドロン酸をリポソームに内包化することでマクロファージの貪食および細胞透過性を促進し、マクロファージを枯渇することができる。

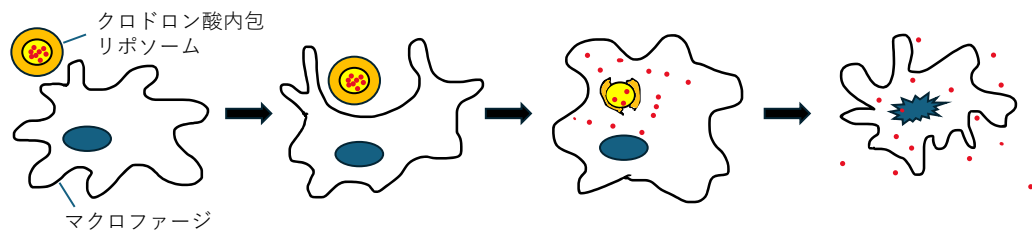


図17 クロドロン酸によるマクロファージの枯渇

クロドロン酸によるマクロファージの枯渇

クロドロン酸がマクロファージに蓄積し、マクロファージをアポトーシスに誘導することにより、マクロファージを枯渇する。

これまでに、クロドロン酸は、小胞ヌクレオチド輸送体の阻害を介して、骨粗鬆症とは無関係な神経障害性疼痛や炎症性疼痛を有意に抑制することが報告されている⁴²。

Maらは、中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルマウスのみクログリアをCLで枯渇させると、急性炎症期におけるみクログリアの活性化が抑制され脳障害が予防されたと報告している⁴³。また、騒音性難聴マウスモデルにおいては、CLによる外有毛細胞の保護と長期的な聴力機能の維持が示されたとの報告もある²⁵。本研究で用いたカナマイシン内耳局所投与モデルにおいて、なぜCLによってコルチ器の形態と聴力機能が部分的にのみ回復したのかは不明であ

るが、本研究ではカナマイシンを直接蝸牛に注入した後、有毛細胞の初期神経損傷が急速に惹起されたために、24時間後に投与したCLの効果は遅れてゆっくりとすすんだSGNの変性・障害に対してのみに限定されたのではないかと推測している。したがって、有毛細胞への影響を確認するためには、カナマイシン局所投与後に、さまざまなタイミングでCL投与を行う検証が必要であるかもしれない。これまでの報告では、蝸牛に障害がおきると、有毛細胞の喪失後に炎症および免疫応答がおこり、その後、神経変性を起こすことが示されている⁴⁴。マクロファージはコルチ器でも有毛細胞以外の支持細胞や基底膜などに集積していることが報告されており⁴⁵、これらの部位でのマクロファージの役割は組織修復や炎症抑制、異物や損傷細胞の除去などが主と考えられており、マクロファージの種類や集積する場所によって異なる働きをする可能性が示唆されている。したがって、マクロファージの種類に関係なくマクロファージ全体を枯渇化させてしまうクロドロン酸の働きは、逆に有毛細胞を保護する役割をしているマクロファージを除去してしまっている可能性も否定できない。

アミノグリコシド投与モデルでのマクロファージ活性化について

Chaiらは、鼓室内にリポ多糖（LPS）を注射し、急性中耳炎（AOM）モデルマウスを作成し、LPS誘発AOMは内耳における炎症反応を引き起こし、アミノグリコシドの取り込みを増加させることを報告した。その際、特にコルチ器やらせん靱帯でのマクロファージ浸潤と炎症性サイトカインの増加がIba1

の増加により示された。(図 18)

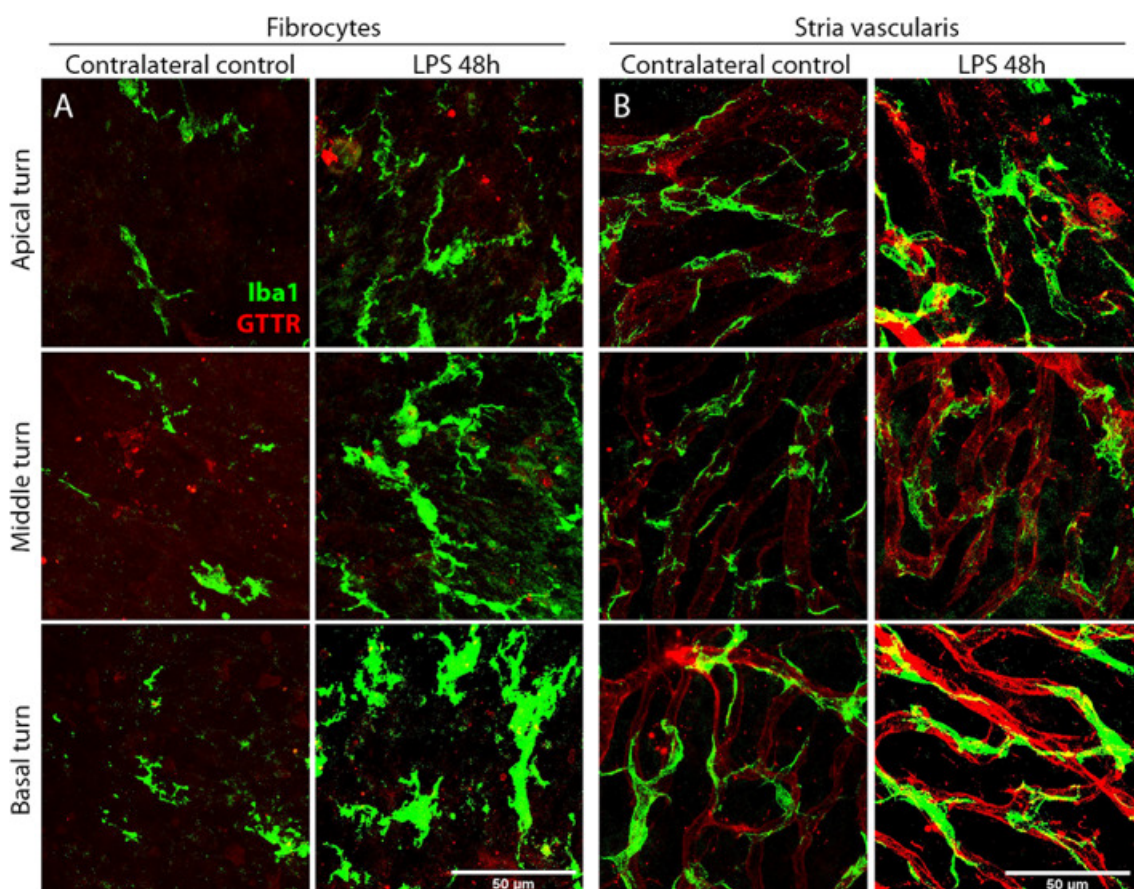


図 18 文献 44 より抜粋

LPS 処理後 24、48、72 時間で内耳の血管条や有毛細胞への蛍光標識されたゲンタマイシン (GTTR) の取り込みが著しく増加し、特に 48 時間後のグループで顕著であった。

カナマイシンによる薬剤性難聴の発症機序については、カナマイシン投与後のらせん神経節におけるマクロファージの活性化と神経変性の過程において、神経細胞とマクロファージの相互作用が重要な役割を果たしている可能性がある。Kaur らは、神経細胞とマクロファージ間のフラクタルカイン (CX3CL1) / CX3CR1 シグナル伝達が、マクロファージの遊走と SGN の変性からの保護に重要

な役割を果たしていることを明らかにした^{37, 45}。有毛細胞損傷後のマクロファージには、このような神経保護機能と今回示された神経毒性機能の両方があることになるが、このことはマクロファージの保護／毒性の運命を決定する複数のシグナル伝達経路が存在することを示唆している。

マクロファージの蝸牛での働きについては、様々な報告があり、傷害モデルも多岐にわたる。病態モデル、介入した部分、介入の時期などによって、マクロファージの働きが真逆に報告されている文献も散見される。(図 19)

障害モデル	有毛細胞	ラセン靱帯	血管条	リボンシナプス	らせん神経節
騒音障害	変性 食作用	炎症促進	BLB維持	修復作用	保存
耳毒性薬剤 (DT全身投与)	変性 食作用 再生	炎症促進			保存
耳毒性薬剤 (カナマイシン局所投与)	変性				変性・脱落
加齢	変性 食作用		BLB維持		
選択的有毛細胞除去	食作用				保存
選択的ラセン神経節細胞除去					修復
人工内耳手術	抗炎症	炎症促進			抗炎症

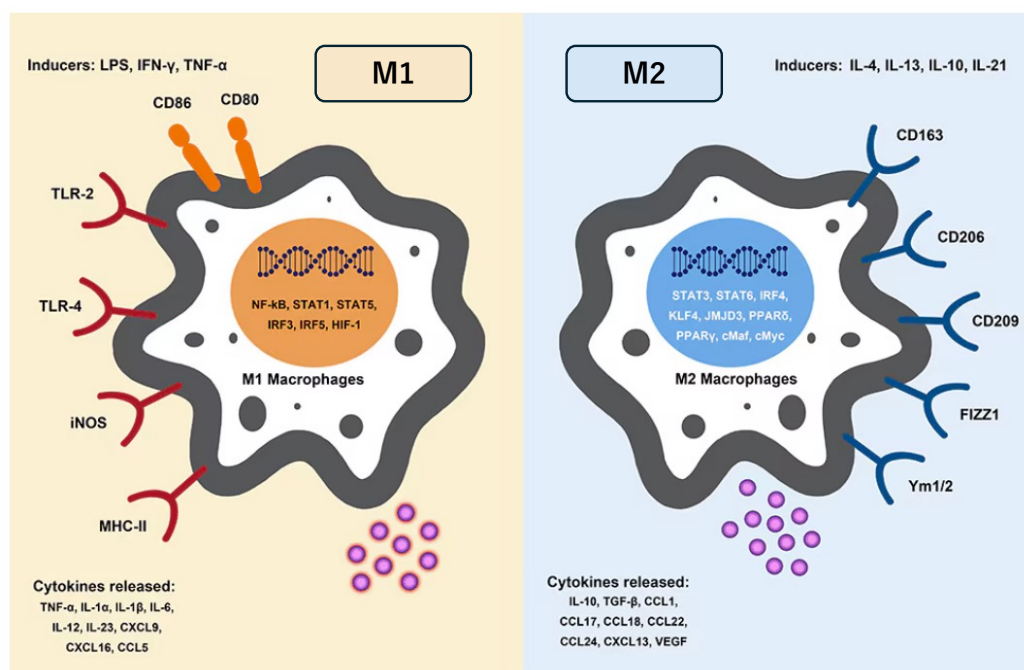
Zhang et al. Front. Cell Dev. Biol. 9:631904.(2021) 改変

図 19 異なる障害モデルによるマクロファージの働きの違い

我々の今回の結果とは逆にマクロファージが M2 (神経保護) に働くという報告は他にもいくつかあり、ジフテリアトキシン難聴モデルでは、マクロファージの動員によりらせん神経節細胞が保護され、リボンシナプスの回復が促進された⁴⁵という報告や、アミノグリコシド投与した鳥類モデルでマクロファージ数の増加が有毛細胞前駆体増加に先行した⁴⁷という報告のほか、生後 7-14 日のマ

ウスにフラクタルカイン受容体阻害剤投与により、マクロファージのリボンシナプスの刈り込みを抑制すると、シナプスが異常に残り、聴力の増悪をみとめた⁴⁸という報告もある。

今回、神経損傷に関連する転写因子である ATF3 が、マクロファージの活性化とほぼ同じタイミングで誘導されたことは注目に値する。ATF3 は、酸化ストレス、細胞アポトーシス、小胞体ストレスなど、さまざまなストレスに対するストレスハブ遺伝子として機能し、後根神経節ニューロンの神経毒性を含む各種疾患の治療標的となる可能性がある⁴⁸。マクロファージには病原体や細胞の破片の認識のほか、食作用及び分解の役割があり、さらに抗原提示を行い、サイトカインとケモカインを放出することで、炎症を引き起こしたり、食作用で組織の恒常性の維持に働いたり、修復に向かうサイトカインを放出したり、さまざまな働きを持っており、これらのシグナル伝達経路はマクロファージの複雑な働きを制御したり、賦活化したりしている。(図 20)



参考：Thermo Fischer SCIENTIFIC

図 20 マクロファージと様々なシグナル伝達経路

最近の研究では、シスプラチンをマウスに腹腔内投与したモデルで、multiplex immunohistochemistry (mIHC) 技術を用いて、蝸牛内のマクロファージを多重免疫染色し、マクロファージの分類とその分布を示したものが報告されている。その中で、6種類のマクロファージマーカー (F4/80, CD68, CD206, CD86, Iba1, CD163) を用いて、マクロファージを M0 (非活性型)、M1 (炎症促進型)、M2 (抗炎症型)、および M1/M2 (混合型) に分類している。M0 は F4/80 のみを発現するマクロファージで、M1 は 1 つまたは 2 つの M1 マーカーのみを発現するマクロファージ、M2 は 1 つまたは 2 つの M2 マーカーのみを発現するマクロファージ、混合型はすべてのマーカーを発現するか、少なくとも 1 つの M1 マーカーと 1 つの M2 マーカーを発現するマクロファージと

された。モダイオラス、らせん神経節、聴神経、血管条、コルチ器官に存在するマクロファージをそれぞれ画像分析で定量化したところ、正常時の内耳では、ほとんどマクロファージが M0 状態にあり、少数の活性化した M1/M2 混合マクロファージが存在した。8 日目に聴神経領域において M1/M2 混合マクロファージが優位に増加したものの、15 日目には回復を認めた。脈絡膜やコルチ器における活性化マクロファージには有意差を認めなかった。M1/M2 混合マクロファージの増加に伴い、Iba1 の発現も優位に増加していた⁵⁰。

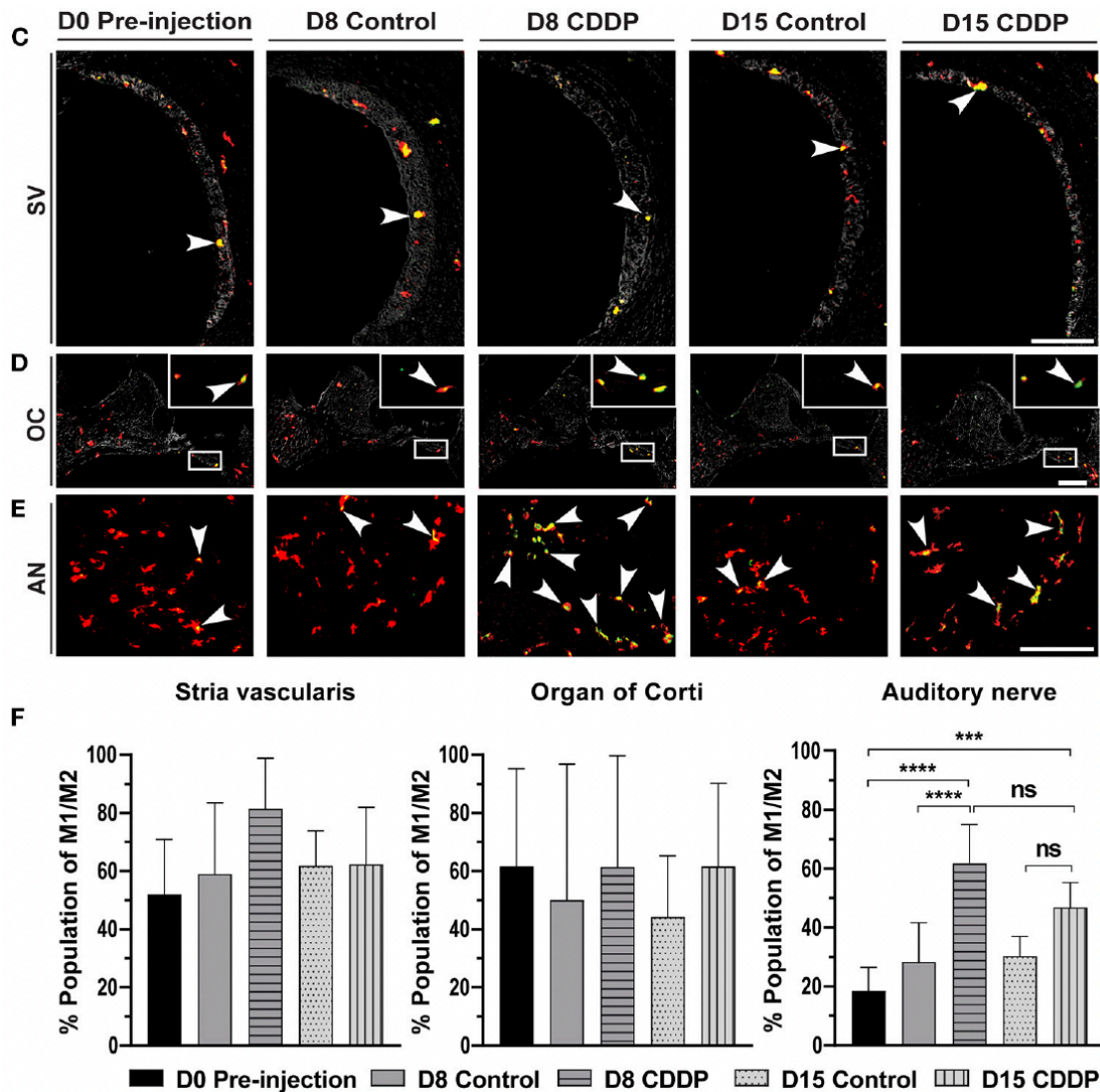


図 21 文献 48 より抜粋

シスプラチン全身投与難聴モデルにおいて、マクロファージ活性化を mIHC で解析した報告。(C) 血管条における活性化マクロファージ (D) コルチ器における活性化マクロファージ。(拡大領域にはコルチ器内のマクロファージが示されている。)(E) 聴神経における活性化マクロファージ。矢じり (黄緑色) は活性化マクロファージを示す

シスプラチン注射 8 日後には聴神経領域の活性化マクロファージが顕著に増加しているが、これは一時的なもので、15 日目には減少した。(F) 各蝸牛部位における活性化マクロファージの比率の統計解析。血管条およびコルチ器では、活性化マクロファージの数に有意な差は診られなかったが、聴神経では 8 日目に有意な増加がみられた (N=10)。

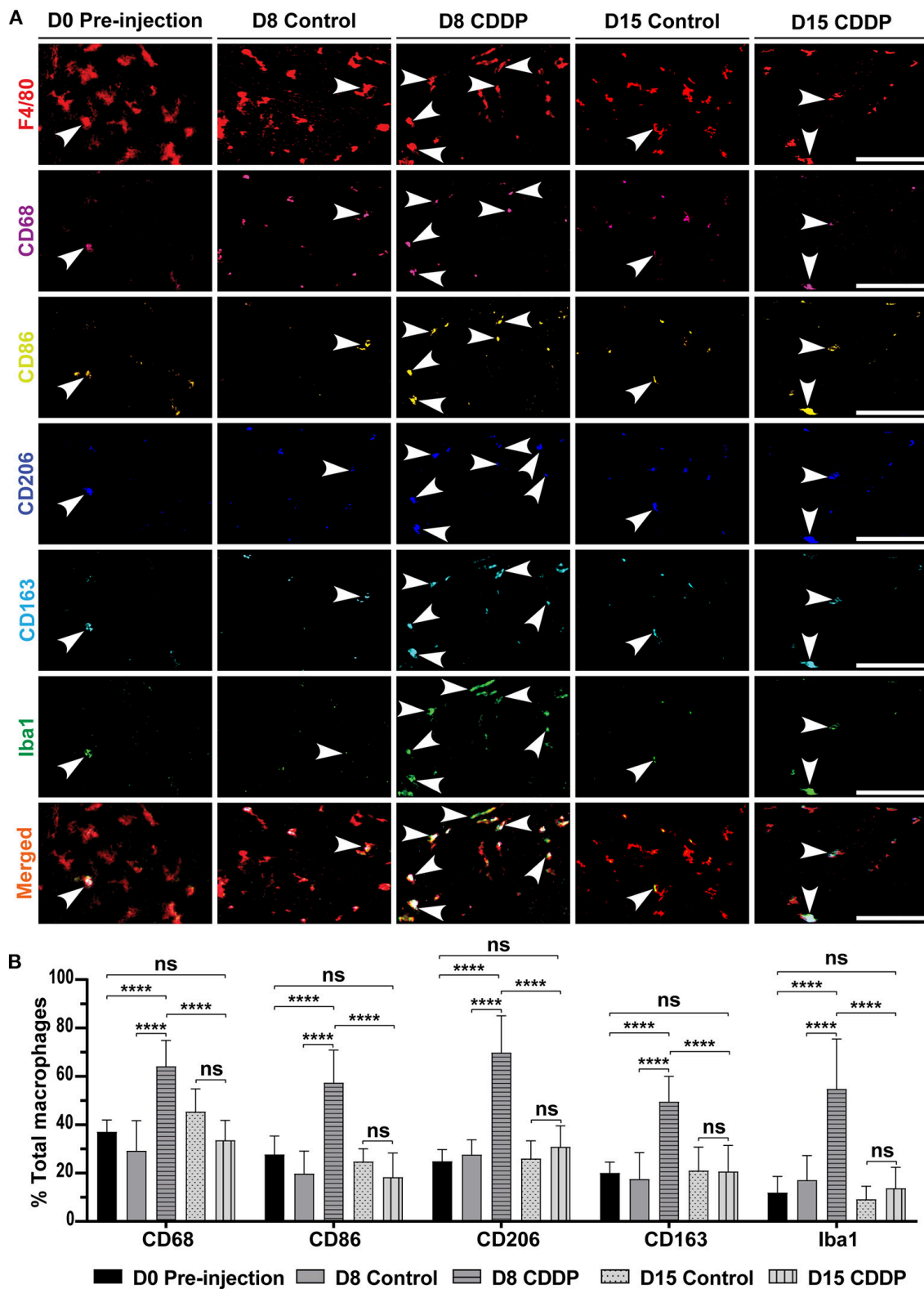


図 22 文献 48 より抜粋

(A) マクロファージマーカーの発現。シスプラチン投与後 8 日目に、M1 マーカ

ー (CD68 と CD86)、M2 マーカー (CD206 と CD163)、および Iba1 の発現が著しく増加した。この増加は一時的であり、15 日目には回復が見られた。この発現の増加は、一時的な聴神経の炎症を示唆している。対照群ではマーカーの発現に差は見られなかった。

(B) F4/80+マクロファージにおける各マーカー発現の比率の統計解析。すべてのマーカーにおいて、シスプラチン投与マウスの 8 日目 (N=10) での発現比率が、8 日目の対照群 (N=8)、投与前の 0 日目 (N=6)、および 15 日目のシスプラチン投与マウス (N=8) と比較して有意に増加した。

蝸牛障害時のマクロファージの働きの全容はまだ不明な部分が多く、蝸牛損傷によって誘発される免疫反応、炎症反応を詳細に分類し、どの反応経路が神経保護的なのか、神経毒性なのかを解明していくことが今後の課題である。

さらに、アミノグリコシドは哺乳類細胞で小胞体 (Endoplasmic Reticulum:ER) ストレス応答 (unfolded protein response:UPR) を活性化することが報告されている⁵¹。アミノグリコシドを鼓室内に投与するとマウスの高周波数領域での難聴が引き起こされるが、有毛細胞は維持されたまま、らせん神経節細胞とシナプスリボンの密度が低下した。さらに同じモデルにおいて、分子シャペロンのタウロソデオキシコール酸を同時に投与すると難聴が軽減したことから、蝸牛の小胞体(ER) ストレスを抑制することでSGNを保護できる可能性が示唆されている⁵²。神経細胞とマクロファージの相互作用、および蝸牛損傷後のマクロファージの神経保護／神経毒性作用における ATF3 の役割を明ら

かにするためにはさらなる研究が必要であるが、SGN とマクロファージの相互作用に加えて、CL によるコルチ器の保護が間接的に SGN の生存率を向上させる可能性があると推測される。Hayashi らは、コルチ器の支持細胞がマクロファージ様細胞として機能し、隣接する有毛細胞を病原体から守ることを示している⁵³。同様に、薬剤性有毛細胞障害モデルにおいて、支持細胞がヒートショックプロテイン 70 (HSP70) を分泌して有毛細胞を保護したとの報告もある⁵²。

人工内耳の効果を最大化するための免疫細胞を利用した SGN 温存法

臨床の場合において、高度-重度感音性難聴に対する最も一般的で成功した外科的アプローチの 1 つが人工内耳埋め込み術であるが、これは聴神経 (SGN) を直接電気刺激するものである⁵⁵。人工内耳は残存する SGN を刺激する装置であるから、SGN の保護が手術成績の向上につながる可能性がある^{56, 57}。本研究において、片側カナマイシン内耳投与後に、SGN の初期神経細胞損傷とほぼ同じタイミングでマクロファージの活性化が観察されたことから、SGN の神経細胞とマクロファージの相互作用が示唆された。さらに、CL を用いてマクロファージを薬理学的に減少させると、SGN は変性から保護されたことから、難聴症例に対して CL などのマクロファージ活性化抑制因子による内耳 SGN 保護効果の臨床応用も期待される。

第 6 章 結語

以上本研究では、

1. 薬剤性難聴においてマクロファージの内耳毒性作用が示唆された。

2. クロドロン酸抱合リポソームによるマクロファージの枯渇化によって SGN が保護されたが、治療のタイミングが重要である可能性が示唆された。
3. 内耳損傷時のマクロファージと神経細胞の相互作用に関与する要因や経路をさらに明らかにしていくことによって、他の各種神経傷害に対する治療法や予防策の開発につながるものであると考えられる。

本研究結果の応用は多岐にわたり、新しい治療法やアプローチが将来的に実用化され、患者の健康状態の向上に寄与することが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導いただきました金沢大学医学部神経解剖学講座 堀修教授、自治医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座 伊藤真人教授、野田昌生先生に厚くお礼申し上げます。またこの基礎研究遂行にあたり、自治医科大学耳鼻咽喉科の甲州亮太先生をはじめとした先生方に大変お世話になりました。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

1. Shield, B. EVALUATION OF THE SOCIAL AND ECONOMIC COSTS OF HEARING IMPAIRMENT.
2. Monzani, D., Galeazzi, G., Genovese, E., Marrara, A. & Martini, A. Psychological profile and social behaviour of working adults with mild or moderate hearing loss. *Acta Otorhinolaryngol Ital* **28**, 61-66 (2008).
3. Kramer, S. E., Kapteyn, T. S., Kuik, D. J. & Deeg, D. J. H. The association of hearing impairment and chronic diseases with psychosocial health status in older age. *J Aging Health* **14**, 122-137 (2002).
4. Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, c., Banerjee, S. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet* **396**, 413-446 (2020).
5. Olusanya, B. O. & Newton, V. E. Global burden of childhood hearing impairment and disease control priorities for developing countries. *Lancet* **369**, 1314-1317 (2007).
6. Jung, D. & Bhattacharyya, N. Association of hearing loss with decreased employment and income among adults in the United States. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **121**, 771-775 (2012).
7. Kitterick, P. T., Lucas, L. & Smith, S. N. Improving health-related

- quality of life in single-sided deafness: a systematic review and meta-analysis. *Audiol Neurotol* **20 Suppl 1**, 79-86 (2015).
8. Olusanya, B. O., Neumann, K. J. & Saunders, J. E. The global burden of disabling hearing impairment: a call to action. *Bull World Health Organ* **92**, 367-373 (2014).
 9. Nordvik, Ø., Heggdal, P.O.L., Brannstrom, J., Vassbotn, F., Aarstad, A.K., Aarstad, H.J. Generic quality of life in persons with hearing loss: a systematic literature review. *BMC Ear Nose Throat Disord* **18**, 1 (2018).
 10. Jiang M, Karasawa T, Steyger PS. Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity: A Review. *Front Cell Neurosci*. 2017 Oct 9;11:308.
 11. Li, H., and Steyger, P. S. Systemic aminoglycosides are trafficked via endolymph into cochlear hair cells. *Sci. Rep.* 1:159, (2011).
 12. Rivetti, S.; Romano, A.; Mastrangelo, S.; Attinà, G.; Maurizi, P.; Ruggiero, A. Aminoglycosides-Related Ototoxicity: Mechanisms, Risk Factors, and Prevention in Pediatric Patients. *Pharmaceuticals* **16**, 1353, (2023).
 13. Hutchin T, Haworth I, Higashi K, Fischel-Ghodsian N, Stoneking M, Saha N, Arnos C, Cortopassi G. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* **21**:4174-4179, 1993.

14. Cortopassi G, Hutchin T. A molecular and cellular hypothesis for aminoglycoside-induced deafness. *Hear Res* 78: 27-30, 1994.
15. Huizing, E. H. & Groot, J. C. M. J. de. Human Cochlear Pathology in Aminoglycoside Ototoxicity-A Review. *Acta Oto-Laryngologica* (1987)
16. Lee JH, Lee MY, Chung PS, Jung JY. Secondary Degeneration of Auditory Neurons after Topical Aminoglycoside Administration in a Gerbil Model. *Biomed Res Int.* 1;2018:9158187 (2018).
17. Liu, Y.-C. & Xu, K. Macrophage-related immune responses in inner ear: a potential therapeutic target for sensorineural hearing loss. *Frontiers in Neuroscience* **17**, (2024).
18. Ding, D., Jiang, H. & Salvi, R. Cochlear spiral ganglion neuron degeneration following cyclodextrin-induced hearing loss. *Hearing Research* **400**, 108125 (2021).
19. Shi, X. Pathophysiology of the cochlear intrastrial fluid-blood barrier (review). *Hear Res* **338**, 52-63 (2016).
20. Zhang, Y., Li, Y., Fu, X., Wang, P., Wang, Q., Meng, W., Wang, T., Yang, J., Chai, R. The Detrimental and Beneficial Functions of Macrophages After Cochlear Injury. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, (2021).
21. Hirose, K., Rutherford, M. A. & Warchol, M. E. Two cell populations participate in clearance of damaged hair cells from the sensory

- epithelia of the inner ear. *Hearing Research* **352**, 70-81 (2017).
22. Hirose, K., Discolo, C. M., Keasler, J. R. & Ransohoff, R. Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *J Comp Neurol* **489**, 180-194 (2005).
23. Sato, E., Shick, H. E., Ransohoff, R. M. & Hirose, K. Expression of Fractalkine Receptor CX3CR1 on Cochlear Macrophages Influences Survival of Hair Cells Following Ototoxic Injury. *J Assoc Res Otolaryngol* **11**, 223-234 (2010).
24. Ponzoni, M., Pastorino, F., Di Paolo, D., Perri, P. & Brignole, C. Targeting Macrophages as a Potential Therapeutic Intervention: Impact on Inflammatory Diseases and Cancer. *Int J Mol Sci* **19**, 1953 (2018).
25. Mizushima, Y., Fujimoto, C., Kashio, A., Kondo, K. & Yamasoba, T. Macrophage recruitment, but not interleukin 1 beta activation, enhances noise-induced hearing damage. *Biochem Biophys Res Commun* **493**, 894-900 (2017).
26. Wakabayashi, K., Fujioka, M., Kanzaki S., Okano, H. J., Shibata, S., Yamashita, D., Masuda, M., Mihara, M., Ohsugi, Y., Ogawa, K., Okano, H. Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neurosci Res* **66**, 345-352 (2010).
27. Imamura, S. & Adams, J. C. Distribution of Gentamicin in the Guinea

- Pig Inner Ear after Local or Systemic Application. *J Assoc Res Otolaryngol* **4**, 176-195 (2003).
28. Willott, J. F. Effects of sex, gonadal hormones, and augmented acoustic environments on sensorineural hearing loss and the central auditory system: insights from research on C57BL/6J mice. *Hear Res* **252**, 89-99 (2009).
 29. Heeringa, A. N., Stefanescu, R. A., Raphael, Y. & Shore, S. E. Altered vesicular glutamate transporter distributions in the mouse cochlear nucleus following cochlear insult. *Neuroscience* **315**, 114-124 (2016).
 30. Zeng, C., Nannapaneni, N., Zhou, J., Hughes, L. F. & Shore, S. Cochlear Damage Changes the Distribution of Vesicular Glutamate Transporters Associated with Auditory and Nonauditory Inputs to the Cochlear Nucleus. *J Neurosci* **29**, 4210-4217 (2009).
 31. Hunt, D., Raivich, G. & Anderson, P. N. Activating transcription factor 3 and the nervous system. *Front Mol Neurosci* **5**, 7 (2012).
 32. Parsadanian, A., Pan, Y., Li, W., Myckatyn, T. M. & Brakefield, D. Astrocyte-derived transgene GDNF promotes complete and long-term survival of adult facial motoneurons following avulsion and differentially regulates the expression of transcription factors of AP-1 and ATF/CREB families. *Exp Neurol* **200**, 26-37 (2006).
 33. Tsujino, H., Kondo, E., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Miki, K.,

- Yonenobu, K., Ochi, T., Noguchi, K. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci* **15**, 170-182 (2000).
34. Okayasu T, Quesnel AM, O'Malley JT, Kamakura T, Nadol JB Jr. The Distribution and Prevalence of Macrophages in the Cochlea Following Cochlear Implantation in the Human: An Immunohistochemical Study Using Anti-Ibal Antibody. *Otol Neurotol*. 41(3):e304-e316. (2020)
35. Lier J, Streit WJ, Bechmann I. Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells*. 28;10(9):2236. (2021).
36. Murillo-Cuesta, Silvia & Contreras, J & Cediél Algovia, Rafael & Varela-Nieto, Isabel. Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice. *Laboratory animals*. 44. 124-31. (2009).
37. Kaur, T., Ohlemiller, K. K. & Warchol, M. E. Genetic Disruption of Fractalkine Signaling Leads to Enhanced Loss of Cochlear Afferents Following Ototoxic or Acoustic Injury. *J Comp Neurol* **526**, 824-835 (2018).
38. Bako P, Gerlinger I, Wolpert S, Müller M, Löwenheim H. The ototoxic effect of locally applied kanamycin and furosemide in guinea pigs. *J Neurosci Methods*. 15;372:109527. (2022).
39. Murillo-Cuesta, S., Contreras, J., Cediél, R. & Varela-Nieto, I.

- Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice. *Lab Anim* **44**, 124-131 (2010).
40. Alec N. Salt, Stefan K. Plontke; Principles of Local Drug Delivery to the Inner Ear. *Audiol Neurotol* 1 November; 14 (6): 350-360. (2009)
41. Kanis, J. A., McCloskey, E. V. & Beneton, M. N. C. Clodronate and osteoporosis. *Maturitas* **23**, S81-S86 (1996).
42. Kato, Y., Hiasa, M., Ichikawa, R., Hasuzawa, N., Kadowaki, A., Iwatsuki, K., Shima, K., Endo, Y., Kitahara, Y., Inoue, T., Nomura, M., Omote, H., Moriyama, Y., Miyaji, T. Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E6297-E6305 (2017).
43. Ma, Y., Li, Y., Jiang, L., Wang, L., Jiang, Z., Wang, Y., Zhang, Z., Yang, G. Y. Macrophage depletion reduced brain injury following middle cerebral artery occlusion in mice. *Journal of Neuroinflammation* **13**, 38 (2016).
44. Rahman, M. T., Bailey, E. M., Gansemer, B. M., Pieper, A. A., Manak, J. R., and Green, S. H. Anti-inflammatory therapy protects spiral ganglion neurons after aminoglycoside antibiotic-induced hair cell loss. *Neurotherapeutics* **20**, 578-601. (2023).
45. Kaur, T., Zamani, D., Tong, L., Rubel, E. W., Ohlemiller, K. K., Hirose, K., Warchol, M. E. Fractalkine Signaling Regulates Macrophage

- Recruitment into the Cochlea and Promotes the Survival of Spiral Ganglion Neurons after Selective Hair Cell Lesion. *J Neurosci* **35**, 15050-15061 (2015).
46. Chai Y, He W, Yang W, Hetrick AP, Gonzalez JG, Sargsyan L, Wu H, Jung TTK, Li H. Intratympanic Lipopolysaccharide Elevates Systemic Fluorescent Gentamicin Uptake in the Cochlea. *Laryngoscope*. 131(9):E2573-E2582. (2021).
 47. Bhawe SA, Oesterle EC, Coltrera MD. Macrophage and microglia-like cells in the avian inner ear. *J Comp Neurol*. 24;398(2):241-56. (1998)
 48. Song X, Li Y, Guo R, Yu Q, Liu S, Teng Q, Chen ZR, Xie J, Gong S, Liu K. Cochlear resident macrophage mediates development of ribbon synapses via CX3CR1/CX3CL1 axis. *Front Mol Neurosci*. 28;15:1031278. (2022).
 49. Yin, Y., Qi, X., Qiao, Y., Liu, H., Yan, Z., Li, H., Liu, Z. The Association of Neuronal Stress with Activating Transcription Factor 3 in Dorsal Root Ganglion of in vivo and in vitro Models of Bortezomib- Induced Neuropathy. *Curr Cancer Drug Targets* **19**, 50-64 (2019).
 50. Bedeir MM, Ninoyu Y, Nakamura T, Tsujikawa T, Hirano S. Multiplex immunohistochemistry reveals cochlear macrophage heterogeneity and local auditory nerve inflammation in cisplatin-induced hearing loss.

Front Neurol. 20;13:1015014. (2022)

51. Milon, B., Shulman, E. D., SO, K. S., Cederroth, C. R., Lipford, E. F., Sperber, M., Sellon, J. B., Sarlus, H., Pregernig, G., Shuster, B., Song, Y., Mitra, S., Orvis, J., Margulies, Z., Ogawa, Y., Shutls, C., Depireux, D. A., Palermo, A. T., Canlon, B., Burns, J., Elkon, R>, Hertzano, R. A cell-type-specific atlas of the inner ear transcriptional response to acoustic trauma. *Cell Rep* **36**, 109758 (2021).
52. Oishi, N., Duscha, S., Boukari, H., Meyer, M., Xie, J., Wei, G., Schrepfer, T., Roschitzki, B., Boettger, E. C., Schacht, J. XBP1 mitigates aminoglycoside-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell death. *Cell Death Dis* **6**, e1763 (2015).
53. Hayashi, Y., Suzuki, H., Nakajima, W., Uehara, I., Tanimura, A., Himeda, T., Koike, S., Katsuno, T., Kitajiri, S., Koyanagi, N., Kawaguchi, Y., Onomoto, K., Kato, H., Yoneyama, M., Fujita, T., Tanaka, N. Cochlear supporting cells function as macrophage-like cells and protect audiosensory receptor hair cells from pathogens. *Sci Rep* **10**, 6740 (2020).
54. May, L. A. Kramarenko, I.I., Brandon, C.S., Voelkel-Johnson, C., Roy, S., Truong, K., Francis, S. P., Monzack, E.L., Lee, F., Cunningham, L.L. Inner ear supporting cells protect hair cells by

- secreting HSP70. *J Clin Invest* **123**, 3577-3587 (2013).
55. Svirsky, M. Cochlear implants and electronic hearing. *Physics Today* **70**, 52-58 (2017).
56. Shearer, A. E., Eppsteiner, R.W., Frees, K., Tejani, V., Sloan-Heggen, C.M., Brwon, C., Abbas, P., Dunn, C., Hansen, M.R., Gantz, B.J., Smith, R.J.H. Genetic variants in the peripheral auditory system significantly affect adult cochlear implant performance. *Hear Res* **348**, 138-142 (2017).
57. Skinner, M. W., Ketten, D.R, Holden, L.K., Harding, G.W., Smith, P.G., Gates, G.A., Neely, J.G., Kletzker, G.R., Brunsden, B., Blocker, B. CT-derived estimation of cochlear morphology and electrode array position in relation to word recognition in Nucleus-22 recipients. *J Assoc Res Otolaryngol* **3**, 332-350 (2002).