

博士論文

耳毒性物質による前庭神経節細胞障害に対する
神経栄養因子の神経保護効果についての研究

井上 亜希

目次

1. 要旨	3 ページ
2. 研究背景	4 ページ
3. 研究目的	10 ページ
4. 実験 1	12 ページ
5. 実験 2	23 ページ
6. 実験 3	35 ページ
7. 考察	49 ページ
8. まとめ	59 ページ
9. 謝辞	60 ページ
10. 参考文献	61 ページ

1. 要旨

神経栄養因子が前庭系に対しても神経保護効果を持つことが明らかとなっているが、その効果は発達に伴い変化している可能性が示唆された。本研究で外因性神経栄養因子による前庭神経節細胞に対する保護効果は主に生後早期に限定されていることを明らかとした。神経栄養因子の受容体の発現量の発達時期による変化について検討し、TrkB と TrkC の発現量は発達時期で変化しないが、p75^{NTR} の発現量は発達に伴い減少していることを明らかとした。耳毒性物質投与時の前庭神経節細胞障害に対する神経栄養因子の臨床応用に際しては、神経栄養因子の受容体の各細胞内シグナル伝達経路の発達に伴う変化の解明が必要であることが示唆された。

2. 研究背景

2.1 前庭系の解剖と生理

内耳は大きく蝸牛と前庭の二つに分けられ、蝸牛は聴覚の受容器であり、前庭が平衡機能の受容器である。前庭は三つの半規管（外側半規管と前半規管、後半規管）と二つの耳石器（卵形囊と球形囊）で構成され、それぞれ膨大部稜と平衡斑に感覚細胞が存在する。前庭神経節細胞（VGN）は双極性の一次ニューロンで、その末梢突起は前庭の感覚細胞を支配し、中枢突起は脳幹の前庭神経核に達する。前庭神経は前庭からの求心性繊維で構成され、内耳道内に上・下前庭神経節を有する。上前庭神経は外側・前半規管、卵形囊、球形囊の上部に分布し、下前庭神経は後半規管と球形囊に分布する（図1）。

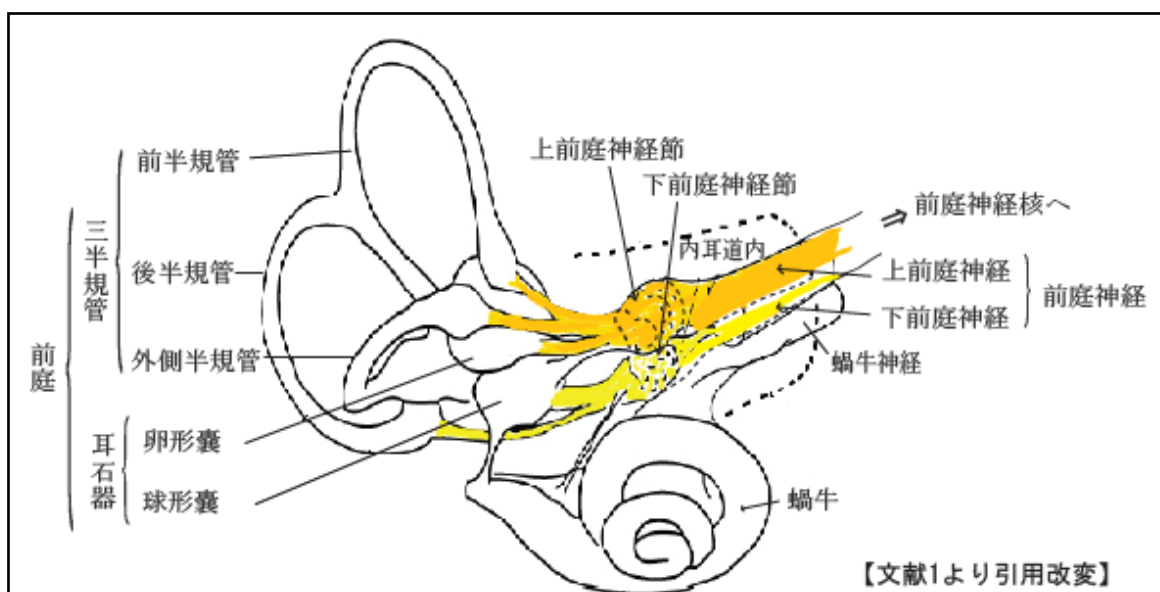


図1. 内耳の解剖

前庭は三半規管と耳石器で構成される。前庭神経節細胞（VGN）は双極性の一次ニューロンで末梢突起は前庭の感覚細胞とシナプス結合し、中枢突起は前庭核に達し前庭神経を形成する。

半規管の感覚細胞は頭部の回転加速度刺激を、耳石器の感覚細胞は頭部の重力加速度と直線方向の加速度を感受し、前庭反射を介し身体平衡を担っている。前庭反射は前庭動眼反射と前庭脊髄反射、前庭自律神経反射の3つに大別される。前庭動眼反射は頭部が動いている間の眼球の位置の維持を担い、前庭脊髄反射は前庭脊髄路を介し体平衡維持と姿勢の維持を担っている [2]。前庭自律神経反射によって前庭からの刺激によりめまい感や嘔気・嘔吐などの自律神経症状が引き起こされる。これらの反射経路のいずれかが障害されると身体の平衡維持が障害され、めまい・平衡障害を呈する。

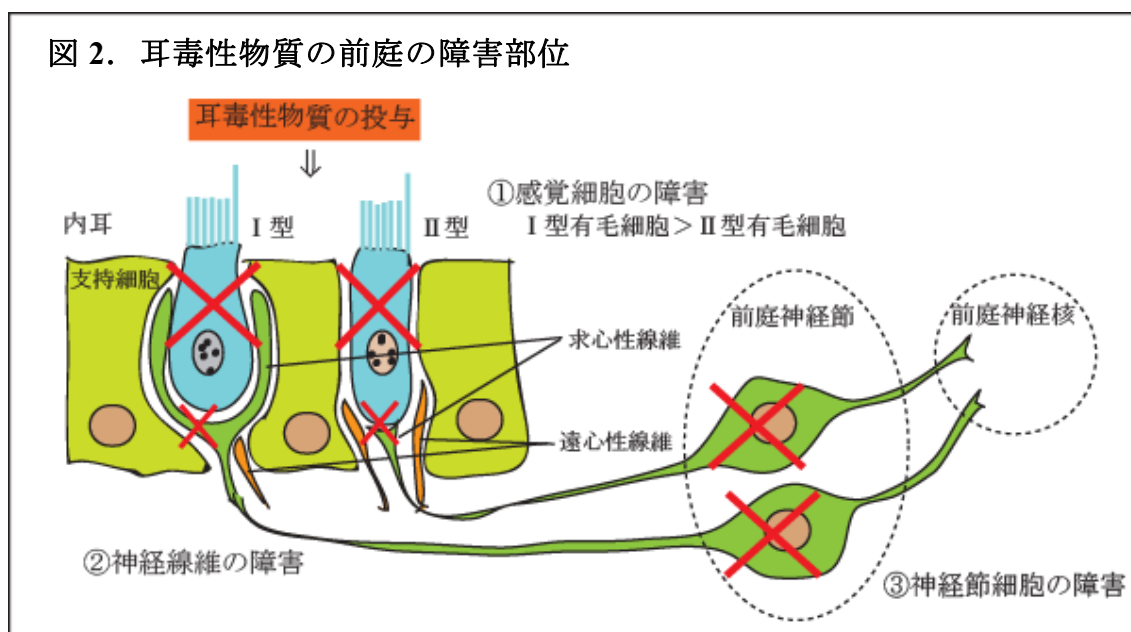
2.2 薬物による前庭障害

アミノ配糖体系抗生剤やバンコマイシン、抗腫瘍薬（特にプラチナを含む抗腫瘍薬）など様々な薬剤が耳毒性を持つことが知られており、これらの薬剤は内耳の感覚細胞である有毛細胞を障害し、聴覚系や前庭系に両側性の不可逆性の障害を起こしうる。急性感染症に対するアミノ配糖体系抗生剤による治療では、約15%で平衡機能障害が生じたと報告されている [3]。プラチナを含む抗腫瘍薬であるシスプラチン（Cis）は卵巣癌や精巣癌、膀胱癌、頭頸部癌などの治療において効果的な抗癌剤であるが、精巣癌の治療のため Cis を投与した症例では約20%の症例で耳毒性を呈したとの報告がある [4]。

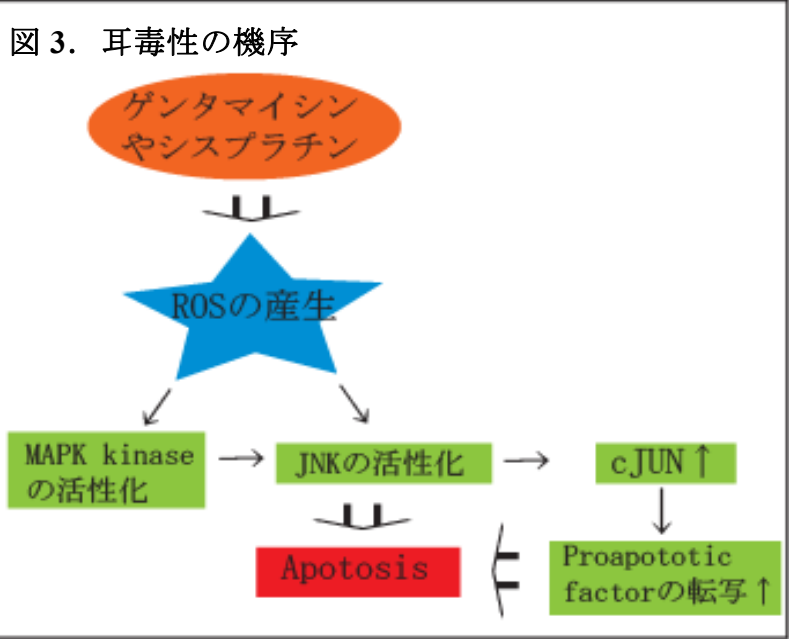
耳毒性物質の投与では、内耳の有毛細胞だけでなく一次ニューロンも障害されることが知られている。ゲンタマイシン（GM）やストレプトマイシンの投与により耳毒性を呈した症例の側頭骨標本の検討では、VGNの細胞数が有意に減少したと報告されている [5]。ラットのVGNを用いた培養実験においても、GMと

Cis の投与で VGN の細胞数の著明な減少を認めている [6]。

末梢感覚器の障害によって、その求心神経に二次的な変性が生じることがこれまで様々な神経系で示されている。聴覚系においても耳毒性物質によって有毛細胞が障害されると、その一次ニューロンであるラセン神経節細胞に様々な機能障害や細胞数の減少等の変化が生じることが知られている [7、8]。耳毒性物質投与により一次性だけでなく二次性にも前庭神経節細胞に機能障害や細胞数の減少等が生じるものと考えられる (図 2)。

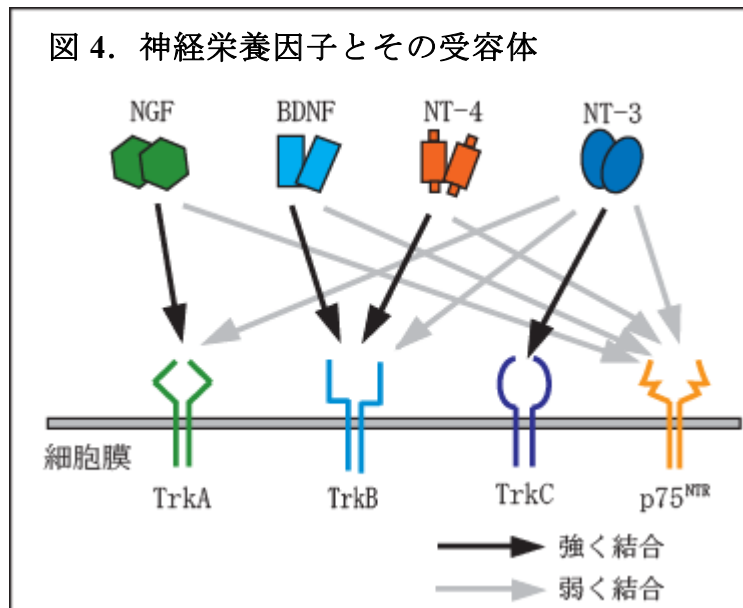


これらの薬剤の耳毒性の主要なメカニズムは活性酸素 (Reactive oxygen species : ROS) の産生に基づくものと近年考えられており [4、9、10] (図 3)、耳毒性物質からの末梢前庭の保護の方法について、ROS 抑制の観点から研究が進められてきている。モルモットを用いた実験では、フリーラジカルスカベンジャーにより GM による耳毒性が軽減したこと [10]、ラットのラセン神経節細胞を用いた実験では brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の投与で ROS の細胞内濃度を低下させ、Cis による耳毒性を軽減したことが示されている [11]。



2.3 神経栄養因子の役割とその受容体

神経栄養因子は中枢神経系、末梢神経系の両方で神経細胞の生存や細胞死、樹状突起の伸長などに重要な役割を果たしていることが知られており [12、13]、哺乳類では nerve growth factor (NGF)、BDNF、neurtorphin-3 (NT-3)、neurotrophin-4 (NT-4)、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) などが同定されている。神経栄養因子は高親和性の tropomyosin receptor kinases (Trk) 受容体と低親和性の p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) を介したシグナル伝達経路を介して作用を発現する。Trk 受容体には TrkA、TrkB、TrkC が含まれ、BDNF と NT-3 は各々 TrkB、TrkC と強い親和性をもち、p75^{NTR} はすべての神経栄養因子と弱い親和性をもち [12、13]。また NT-3 は TrkC より親和性は低下するものの、TrkA と TrkB とも結合して作用を発現することがわかっている [13] (図 4)。BDNF と NT-3、TrkB、TrkC、p75^{NTR} の mRNA はラットの胎生期の VGN に発現している [14、15] だけでなく、生後も各受容体が存在していることが判明している [16]。



2.4 前庭神経節細胞の細胞生存と軸索伸長における神経栄養因子の重要性

近年ノックアウトマウスを用いた実験で、胎生期の VGN の細胞生存や軸索伸長に対する BDNF と NT-3 の重要性が示されている [17、18、19、20]。BDNF のノックアウトマウスでは 80-85% の VGN が欠損し [17、18]、TrkB のノックアウトマウスでは 56-85% の VGN が欠損したことが報告されている [20]。また、NT-3 のノックアウトマウスでは生後 10-15 日で VGN の 34% が欠損し [18]、TrkC のノックアウトマウスでは 16-29% の VGN が欠損したことが報告されている [19、20]。これらの研究により VGN の生存には特に BDNF と NT-3、TrkB、TrkC が関与しており、BDNF と TrkB の方が NT-3 と TrkC より VGN の細胞生存に対する作用が強いことが示されている。また BDNF のノックアウトマウスでは VGN の軸索の前庭感覚細胞への分布が障害され [21]、NT-3 遺伝子に BDNF を組み込んだマウスでは NT-3 を発現している前庭の感覚上皮細胞以外にも軸索の分布が見られたこと [22] より、VGN の軸索の伸長にも BDNF と NT-3 が重要であるものと考えられる。

2.5 耳毒性物質による前庭神経節細胞障害に対する神経栄養因子の保護効果

耳毒性物質からの内耳保護について、ROS の産生の抑制の観点から様々な研究が行われているが、いまだ有効な治療法は確立していない。神経栄養因子が中枢神経系と末梢神経系の両方で神経細胞の生存や樹状突起の伸長などに重要な役割を果たしていることから、近年神経栄養因子の全身投与を用いた神経疾患に対する臨床的治療の試みが行われている [23]。ROS の産生の抑制に加え神経保護効果の観点からも、神経栄養因子の耳毒性からの神経保護因子としての可能性が示唆され、臨床応用についても研究が進められており、モルモットの *in vivo* の実験で、アミカシンの投与によるラセン神経節細胞の減少が NT-3 の投与により軽減されたことが報告されている [24]。耳毒性物質投与時の前庭神経節細胞障害に対しても、生後 5 日のラットを用いた実験で神経栄養因子の投与による生存神経節細胞数の増加が示されおり [6]、耳毒性物質投与による末梢前庭障害からの神経節細胞保護に対する神経栄養因子の臨床応用の可能性が示唆されている。

3. 研究目的

神経栄養因子が神経細胞の生存や樹状突起の伸長などに重要な役割を果たしており、神経保護効果を持つことが明らかとなって以降、様々な神経疾患の治療への応用研究が進められている。内耳障害に対する治療への応用についても様々な検討がされてきている [25、26、27] が、いまだ確立された治療法はない。前庭神経障害に対する神経栄養因子の保護効果についても生後 5 日のラットを用いた実験で報告されている [6] が、胎生期において BDNF と NT-3 の VGN に対する神経細胞に対する作用が発達段階に依存していることが示されており [28]、耳毒性物質による前庭障害からの神経保護効果も生後の発達に伴い変化している可能性が示唆される。そのため耳毒性物質投与による前庭神経節障害からの外因性神経栄養因子による神経保護効果の臨床応用を検討するにあたっては、神経保護効果の生後の発達時期による変化とそのメカニズムについて明らかにする必要がある。

今回我々は異なる発達時期のラットの VGN を用い、実験 1 で神経栄養因子の VGN に対する作用の発達段階による変化について検討した。次に神経栄養因子の耳毒性物質による前庭神経節細胞障害に対する保護効果の発達段階による変化について実験 2 で検討した。さらに外因性神経栄養因子の作用の発達時期による変化のメカニズムを明らかにするため、実験 3 で神経栄養因子の各受容体の蛋白と mRNA の発現量の発達時期による変化についても検討した。

神経栄養因子のうち特に BDNF と NT-3 が胎生期と生後の VGN の生存維持や分化、発達において重要な役割を担っていることから、本研究においては、神経栄養因子のうち BDNF と NT-3 の二つについて検討を行うこととした。また NT-3 は

TrkA とも結合するが、前庭神経節では TrkA はごく短期間に低レベルでの発現しか確認されていないため [19]、本研究においては BDNF と NT-3 の受容体として TrkB、TrkC、p75^{NTR} の 3 つの受容体の発現について検討することとした。

4. 実験1：外因性神経栄養因子の前庭神経節細胞に対する作用の発達段階による変化の検討

4.1 実験背景

生後発達に伴い神経栄養因子の作用が変化し、新生児の血中の神経栄養因子の発現量が発達に伴い変化することが示されている [29]。生後早期の蝸牛では有毛細胞とのシナプス結合の再構築の時期に一致して BDNF と NT-3 の発現が変化する [30]。またマウスの三叉神経節細胞を用いた実験では神経栄養因子の神経細胞に対する作用が生後の発達時期により変化する [31]。VGN においても、BDNF と NT-3 に対する神経節細胞の反応が胎生期の発達時期に依存して変化することが示されており [28]、生後も発達時期に依存して神経栄養因子の作用が変化していることが考えられる。耳毒性物質に対する神経栄養因子の保護効果の発達時期による変化を検討するにあたって、まず BDNF と NT-3 の VGN に対する神経保護効果の発達時期による変化を細胞生存、樹状突起の形成、樹状突起の伸長の 3 項目について検討した。

ラットの発達時期については、VGN では樹状突起の長さが生後 3 日で最長であったとの報告 [32] と、生後 6 日で形態学的にはほぼ成熟ラットと同様のレベルとなるとの報告 [33] を基に、今回の研究では軸索の伸長とシナプス形成が最も盛んな時期と考えられる生後 3 日 (P3) と、ほぼ分化が完成したと考えられる生後 7 日 (P7) のラットを用いることとした。さらに、生後早期として生後 1 日 (P1) と成熟ラットとほぼ同等と考えられた生後 14 日 (P14) のラットについても検討することとし、P1 と P3、P7、P14 の 4 つの発達時期について検討を行った。

4.2 実験方法

4.2.1 VGN の初代培養

本実験は東京大学医学系研究科動物実験委員会の倫理審査（医 - P11 - 061）を経て行われた。

東京大学医学系研究科動物実験委員会の動物実験実施マニュアルに基づいて、生後1日と3日、7日、14日のWistarラットにエーテル麻酔法で深麻酔をかけた後、断首し安楽死させた。ラットから上前庭神経節を摘出し、papain（20 U/ml; Worthington Biochemical, Freehold, NJ）を加えたHank's solution（Gibco, Gaithersburg, MD）に入れ、37°Cで20分間培養したのち、500 µlの滅菌ピペットで攪拌し、神経節細胞を単離した。L-15（Leibovitz's）溶液（Gibco BRL, Grand Island, NY）に10%の牛の胎児血清と26 mM NaHCO₃、30 mM glucose、50 U/ml penicillinを加え培養液を作成した。上澄液内の細胞数を血球計算板で計測し、上記培養液内の細胞数を 5.0×10^5 cells/mlに調整した。各ウェルにpoly-L-lysineでコーティングした径13 mmのカバーグラスを敷き、 15.0×10^4 個の細胞を含む300 µlの培養液をいれた。1) 培養液に何も投与しないControl群、2) 50 ng/ml BDNF（Upstage, Lake Placid, NY）を培養液に投与したBDNF群、3) 50 ng/ml NT-3（Calbiochem, Lajolla, CA）を培養液に投与したNT-3群の3群を作成し、5% CO₂を含む湿度95%、37度の庫内で48時間培養した（図5）。

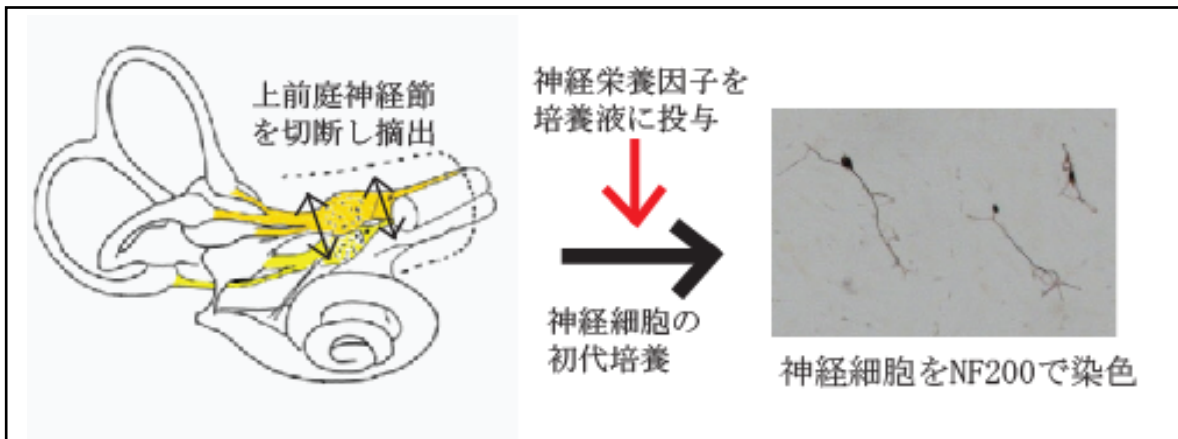


図 5. 前庭神経節細胞の初代培養実験方法

前庭神経節細胞 (VGN) を以下の群に分けて 48 時間初代培養を施行。

- 1) Control 群 : 培養液に何も投与しない群
- 2) BDNF 群 : 50 ng/ml BDNF を培養液に投与した群
- 3) NT-3 群 : 50 ng/ml NT-3 を培養液に投与した群

4.2.2 免疫組織染色による検討

ウェル内の培養液を吸引し 4% paraformaldehyde を加え 30 分おき、VGN を固定した。phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4) で洗浄し、Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い avidin - biotin complex 法 (ABC 法) による免疫組織染色を施行した。3% hydrogen peroxide を含む methanol で室温で 15 分間ウェルを処理した後、4%ヤギ血清、0.3M NaCl、0.1% Triton X-100、0.1% NaN₃ を加えた PBS で 30 分間ブロッキング処理した。一次抗体として 1:1000 の濃度の mouse monoclonal anti - neurofilament antibody (NF200, clone NR52, Sigma) を加え一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、二次抗体として 1:200 の濃度のビオチン標識 goat anti - mouse IgG antibody (Vector Lab.) を加え 30 分間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。Diaminobenzidine (DAB) - H₂O₂ - NiSO₄ (Vector Lab.) をかけ 2 - 3 分間染色した後蒸留水で洗浄し、濃度の異なる ethanol と xylene を用い脱水し、カバーガラスをスライドグラスに乗せ封入した。抗体の選択性は一次

抗体を投与せずに行った実験と、標的ペプチドと事前に吸着処理を施行した一次抗体による実験で確認した。各群とも少なくとも 9 つのウェルについて検討した。

4.2.3 統計的手法

スライドガラス上に免疫染色したカバーガラスを封入し、AxioVison digital camera (Zeiss) を用い 4 倍と 10 倍の対物レンズを用いて撮影した。デジタル画像内の細胞数と樹状突起の長さを計測は、マイクロアナライザー (日本ポラデジタル, 東京, 日本) を用いて計測した。今実験では各ウェル内の VGN の生存細胞数と生存細胞数に対する樹状突起を持つ細胞比、各 VGN の最も長い樹状突起の長さを計測し、検討した。生存細胞数については、各ウェル内のすべての生存細胞数を計測した。また、生存細胞の基準としては、1) NF200 陽性、2) 細胞核が確認できる、の 2 点の免疫染色における形態的特徴を用いた。ついで全生存 VGN を、樹状突起を持つ VGN 群と樹状突起を持たない VGN 群の二群に分けた。樹状突起を持つ VGN では、最も長い樹状突起の長さを計測した。樹状突起を持つ VGN が 30 個以上のウェルでは、Microsoft Excel 2003 (Redmond, WA) のランダム関数を用いて 30 個の VGN をランダムに選択し樹状突起の長さを計測した。樹状突起の長さを計測する際には、他の VGN の樹状突起と重ならず走行を追えるもののみ計測した。

統計結果は means \pm SEM で示した。統計学的有意差は Kruskal Wallis test と post-hoc Steel-Dwass test を用いて検討し、 $p < 0.05$ のとき有意差ありとした。

4.2.4 BDNF と NT-3 の濃度による神経保護作用の変化の検討

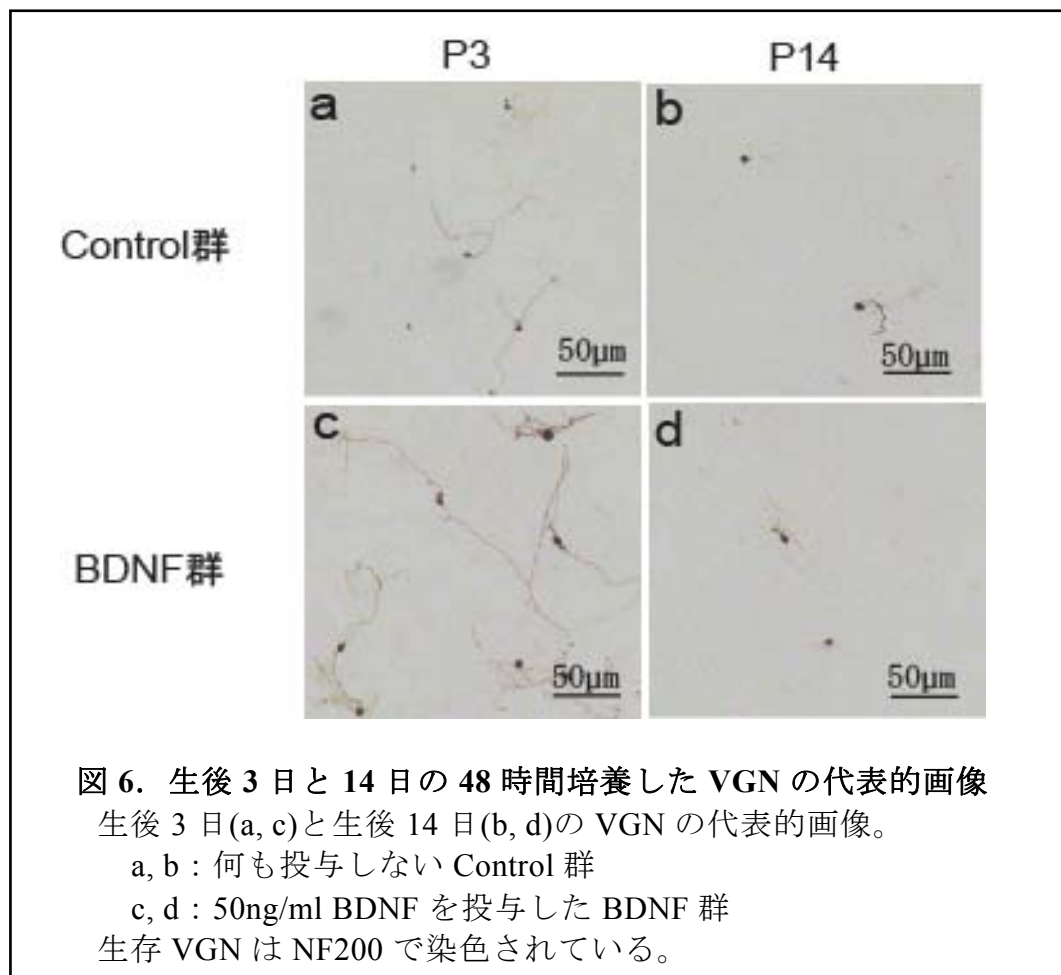
特に細胞生存と樹状突起の形成については生後早期の P1 と P3 ラットに促進作用が限定されていた。BDNF と NT-3 の濃度を変えることによって作用が変化し、50 ng/ml では促進作用を認めなかった日齢のラットでも作用を認めるようになるかについて検討した。P14 ラットの VGN を用い、BDNF と NT-3 の濃度をそれぞれ 1 ng/ml と 50 ng/ml、200 ng/ml に変え 4.2.1-3 と同様に初代培養を行い、免疫組織染色を施行し、生存細胞数、樹状突起を持つ細胞の比率、樹状突起の長さについて検討を行った。

4.3 実験結果

4.3.1 神経栄養因子の VGN に対する効果の発達段階による変化

P1 と P3、P7、P14 のラットから摘出した VGN を 50 ng/ml の BDNF と NT-3 を各々投与した培養液で 48 時間培養し、生存前庭神経節細胞数、樹状突起を持つ細胞の割合、樹状突起の長さに対する外因性神経栄養因子の効果について検討した。

P3 ラットと P14 ラットの初代培養の Control 群と BDNF 群の代表的免疫染色画像を図 6 に示す。



神経栄養因子を投与しなかった Control 群では、VGN の生存細胞数、樹状突起を持つ細胞の割合、最長の樹状突起の長さは発達時期に伴って有意に変化した ($p<0.01$; 図 7a,c,e)。生存細胞数と樹状突起を持つ細胞の割合は P14 ラットに比べ P1 と P3、P7 ラットでは有意に多かった ($p<0.01$)。一方で最長の樹状突起の長さは P1、P7、P14 ラットに比べ P3 ラットで有意に長かった ($p<0.01$)。

次に BDNF と NT-3 の VGN の生存細胞数、樹状突起の形成、樹状突起の長さに対する効果の発達時期による変化について検討した (図 7b,d, f)。BDNF と NT-3 の両者とも P1 と P3 ラットにおいて、Control 群に比べ有意に生存細胞数を増加させた ($p<0.01$; 図 7b) が、P7 と P14 ラットでは有意差を認めなかった ($p>0.1$)。BDNF は樹状突起を持つ細胞の比率についても P1 と P3 ラットでは Control 群に比べ有意に増加させ (P1 ラット $p<0.05$ 、P3 ラット $p<0.01$; 図 7d)、樹状突起の長さもすべての発達時期において Control 群に比べ有意に長かった ($p<0.01$; 図 7f)。一方、NT-3 は Control 群に比べ P1 でのみ樹状突起の伸長効果を認めた ($p<0.01$; 図 7f) が、P3 以降その効果は失われていた。また樹状突起を持つ細胞の比率はすべての発達時期において増加せず、逆に P14 ラットでは Control 群に比べ有意に少なかった (図 7d)。

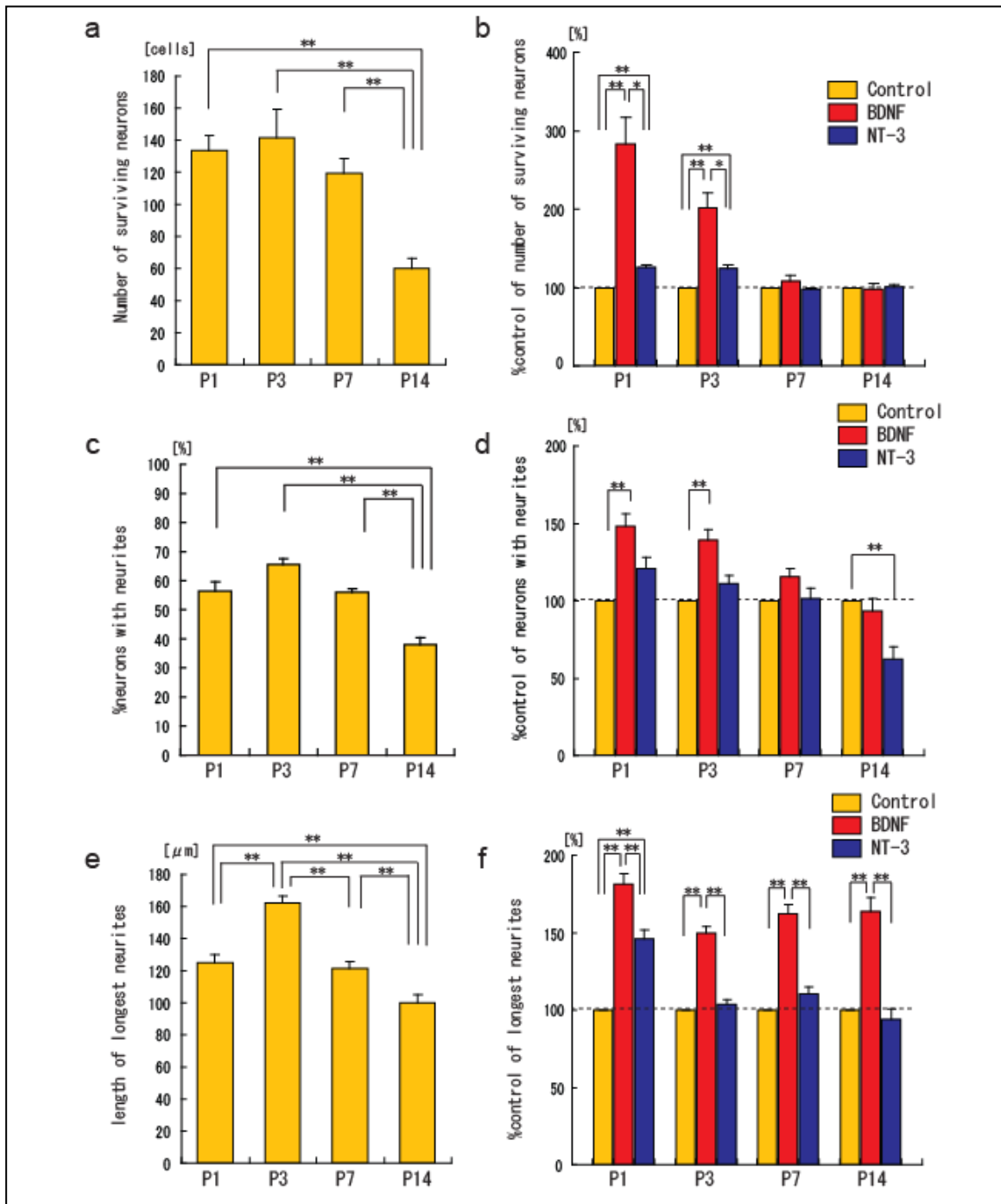


図7. ラットのVGNにおけるBDNFとNT-3の神経節細胞の生存、樹状突起の形成と伸長に対する効果の発達時期による変化

- a. Control 群のVGNの生存細胞数
 - b. BDNF群とNT-3群のVGNの生存細胞数のコントロール比
 - c. Control 群の樹状突起を持つVGNの比率
 - d. BDNF群とNT-3群の樹状突起を持つVGNの比率のコントロール比
 - e. Control 群のVGNの最長の樹状突起の長さ
 - f. BDNF群とNT-3群のVGNの最長の樹状突起の長さのコントロール比
- 点線で各時期におけるControl群を100%として示した。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

4.3.2 BDNF と NT-3 の濃度による VGN に対する作用の変化の検討

外因性 BDNF と NT-3 の濃度を変えることで VGN に対する細胞生存や樹状突起の形成、樹状突起の伸長に対する効果が異なるか、1 ng/ml と 50 ng/ml、200 ng/ml の 3 つの濃度で P14 ラットの VGN を用い検討した。BDNF、NT-3 の両者ともすべての濃度において VGN の生存細胞数は Control 群と比べ有意な増加は認めず、濃度による効果の違いは認めなかった。樹状突起を持つ細胞の比率については、BDNF はすべての濃度で Control 群と有意差を認めなかったが、NT-3 ではすべての濃度で有意に比率の低下を認め、濃度間で有意差を認めなかった。樹状突起の長さについては、BDNF はすべての濃度において Control 群と NT-3 群にたいし有意な伸長効果を認め、NT-3 は Control 群と有意差を示さず、BDNF と NT-3 とも濃度間で有意差を認めなかった。検討した 3 つの作用の全てにおいて、外因性神経栄養因子の投与濃度による作用の違いは認めなかった ($p>0.8$; 図 8)。

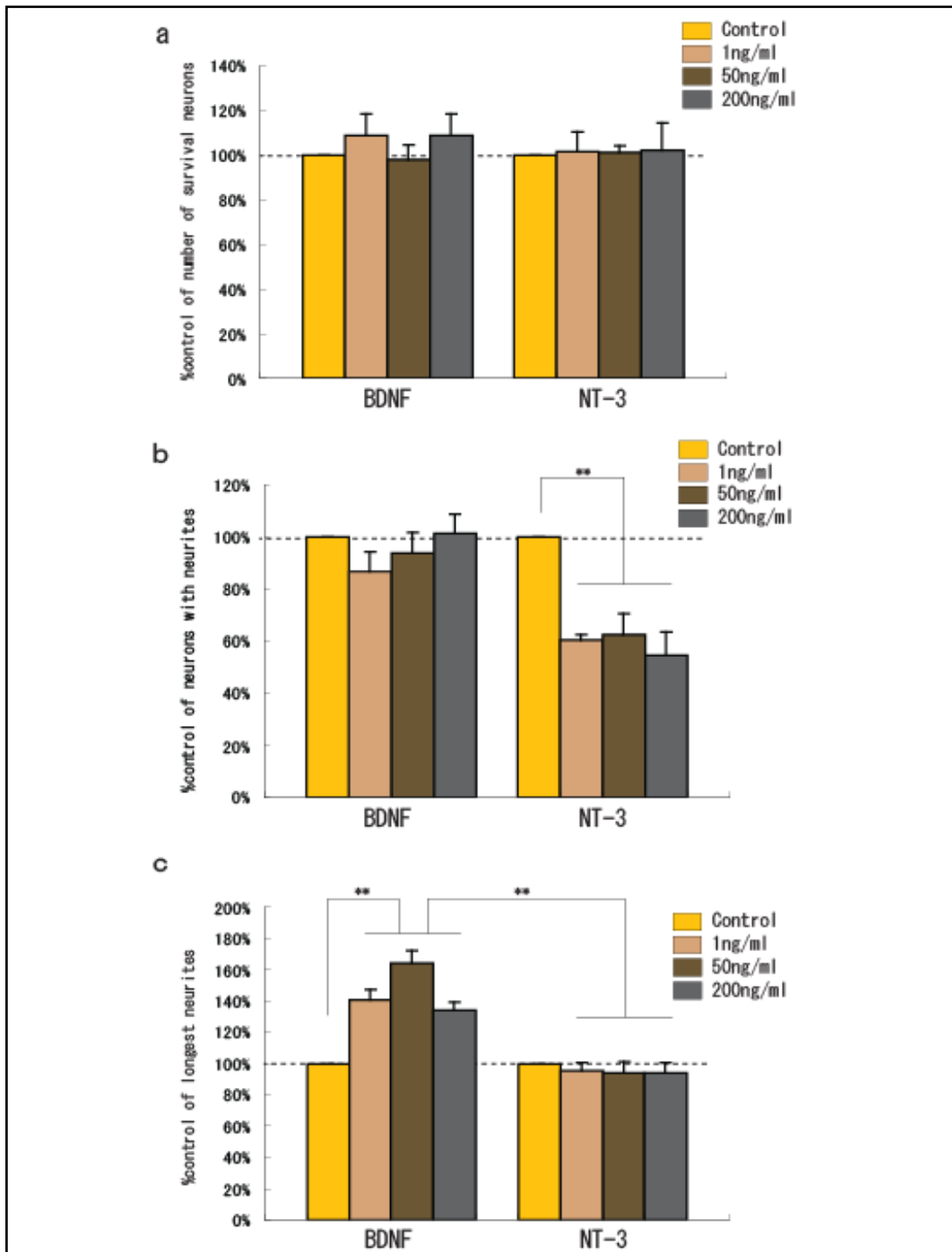


図 8. P14 ラットにおける VGN に対する BDNF と NT-3 の濃度による作用の変化

BDNF と NT-3 の濃度を 1 ng/ml と 50 ng/ml、200 ng/ml に変化させ、P14 ラットの VGN に対する作用を検討した。

a: 各濃度における VGN の生存細胞数のコントロール比

b: 各濃度における樹状突起を持つ VGN の比率のコントロール比

c: 各濃度における VGN の最長の樹状突起の長さのコントロール比
点線で Control 群を 100% として示した。

**p<0.01

4.4 実験1の考察

様々な神経細胞において、神経栄養因子の及ぼす効果は発達時期により変化することが報告されている [28、31]。本研究においても BDNF の VGN の生存と樹状突起の形成に対する作用と NT-3 の VGN の生存に対する作用は生後の発達時期で変化しており、これらの報告と一致していた。NT-3 は VGN の樹状突起の形成を促進する効果はすべての発達時期で認められず、樹状突起の伸長についても P1 ラットでのみ伸長効果を認め、樹状突起の形成や伸長効果は少ないことが示された。また VGN に対する作用は NT-3 より BDNF のほうが強く、前庭系においては NT-3 より BDNF のほうが VGN の生存により重要である [17、18、21、22] との過去の報告と一致する結果であった。NT-3 は TrkC より親和性は低下するものの TrkB とも結合し、NT-3 の VGN に対する作用は TrkB を介した作用によるとの報告があり [34、35]、NT-3 の VGN に対する作用の主体が TrkB を介した作用である可能性も考えられた。

5. 実験2：耳毒性物質による前庭神経節細胞障害に対する神経栄養因子の保護効果

5.1 実験背景

実験1においてBDNFとNT-3のラットのVGNに対する作用は発達段階に依存し変化しており、その発達時期による変化が細胞生存と樹状突起の形成、樹状突起の伸長の各作用により異なっていることを明らかにした。BDNFとNT-3はゲンタマイシン(GM)とシスプラチン(Cis)の耳毒性からのVGNの保護作用を有することが過去に報告されている[6]が、実験1の結果より耳毒性物質に対する神経保護効果も発達時期により変化することが考えられた。そのため神経栄養因子と耳毒性物質を培養液に同時に投与し、培養前庭神経節細胞に対する神経栄養因子の耳毒性からの神経保護効果の発達段階による変化について検討することとした。神経保護効果についても、VGNの生存細胞数、樹状突起の形成、樹状突起の伸長の3項目について検討した。

本研究において、耳毒性物質として感染症治療に現在も使用されており前庭障害が強いといわれているアミノ配糖体系抗生剤の一つであるGMと、頭頸部領域の悪性腫瘍において高頻度で用いられている白金系抗悪性腫瘍剤であるCisの2つを用いることとした。CisとGMの耳毒性は濃度依存性であり、Cisは4 µg/ml、GMは3 mg/mlでP5ラットの培養前庭神経節細胞の大部分が生存できなかったことが報告されている[6]。P7ラットのVGNを用い、Cisは2 µMと4 µM、GMは0.5 mgと1 mg/ml、2 mg/mlを投与した先行実験の結果より、本実験における耳毒性物質の濃度をCisは2 µM、GMは0.5 mg/mlとした。

5.2 実験方法

5.2.1 神経栄養因子の耳毒性からの前庭神経節細胞保護作用の発達時期による変化の検討

実験 1 の VGN の初代培養方法と同様の手順で、P1 と P3、P7、P14 の Wistar ラットから上前庭神経節細胞を分離した。各ウェルの培養液にはそれぞれ神経栄養因子と耳毒性物質を加え、1) 0.5 mg/ml GM (Sigma, St. Louis, MO) を投与した GM 群、2) 0.5 mg/ml GM と 50 ng/ml BDNF を同時に投与した GM+BDNF 群、3) 0.5 mg/ml GM と 50 ng/ml NT-3 を同時に投与した GM+NT-3 群、4) 2 μ M Cis (Sigma, St. Louis, MO) を投与した Cis 群、5) 2 μ M Cis と 50 ng/ml BDNF を同時に投与した Cis+BDNF 群、6) 2 μ M Cis と 50 ng/ml NT-3 を同時に投与した Cis+NT-3 群の 6 つの群を作成し 48 時間培養した (図 9)。実験 1 の免疫組織染色方法と同様の手順で免疫組織染色を行い、各ウェル内の VGN の生存細胞数と生存細胞数に対する樹状突起を持つ細胞比、各 VGN の最も長い樹状突起の長さを計測し検討した。

統計結果は means \pm SEM で示した。統計学的有意差は Kruskal Wallis test と post-hoc Steel-Dwass test を用いて検討し、 $p < 0.05$ のとき有意差ありとした。

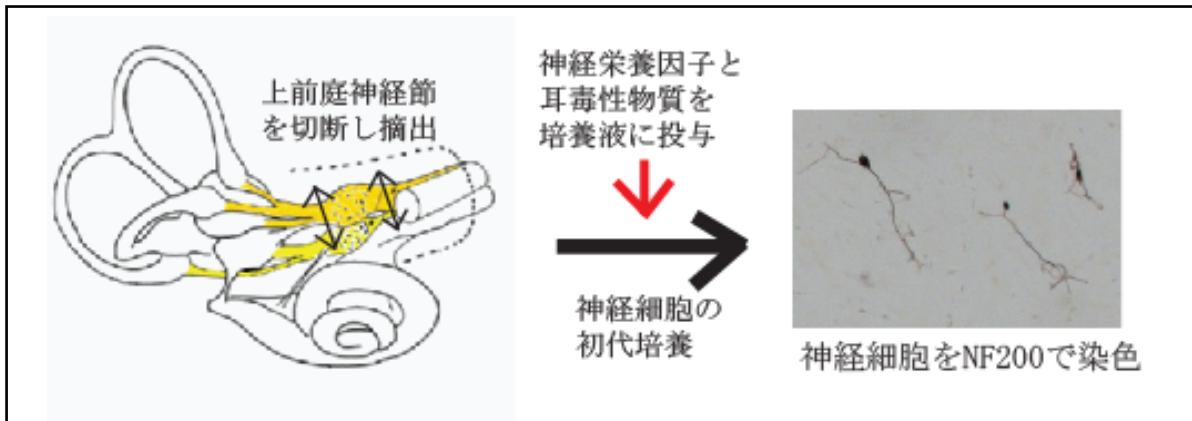


図 9. 耳毒性物質と神経栄養因子の培養液への投与方法

前庭神経節細胞 (VGN) を以下の 6 群に分け、各薬剤を投与した培養液で 48 時間初代培養を施行した。

- 1)GM 群 : 0.5 mg/ml GM を投与した群
- 2)GM+BDNF 群 : 0.5 mg/ml GM と 50 ng/ml BDNF を同時に投与した群
- 3)GM+NT-3 群 : 0.5 mg/ml GM と 50 ng/ml NT-3 を同時に投与した群
- 4)Cis 群 : 2 μ M Cis を投与した群
- 5)Cis+BDNF 群 : 2 μ M Cis と 50 ng/ml BDNF を同時に投与した群
- 6)Cis+NT-3 群 : 2 μ M Cis と 50 ng/ml NT-3 を同時に投与した群

5.2.2 BDNF と NT-3 の濃度による耳毒性に対する神経保護作用の変化の検討

実験 1 と同様 P14 ラットの VGN を用い、BDNF と NT-3 の濃度をそれぞれ 1 ng/ml と 50 ng/ml、200 ng/ml に変え、VGN に対する神経保護作用が濃度により変化するか検討した。5.2.1 と同様に初代培養を行い、免疫組織染色を施行し、生存細胞数、樹状突起を持つ細胞の比率、樹状突起の長さの 3 項目について検討を行った。

5.2.3 培養中の VGN の細胞分裂とアポトーシスの有無の検討

BDNF と NT-3 の VGN の生存細胞数を増加させる効果が、細胞分裂によるものではなく、アポトーシスの減少による神経保護効果であることを明らかにする目的で、P3 ラットの VGN を用い、3 $\mu\text{g/ml}$ bromodeoxyuridine (BrdU) と 1 $\mu\text{g/ml}$ active caspase 3 を用い、それぞれ NF200 との二重染色を行った。

BrdU と NF200、active caspase 3 と NF200 との二重染色には、ウェル内の培養液を吸引し 4% paraformaldehyde を加え 30 分おき、VGN を固定した。PBS (pH 7.4) で洗浄し、2N HCl を加え室温で 30 分間置いたのち、PBS で 3 回洗浄した。4% ヤギ血清、0.3M NaCl、0.1% Triton X-100、0.1% NaN_3 を加えた PBS で 30 分間ブロッキング処理した。一次抗体としてそれぞれ 1:300 の濃度の anti - BrdU rabbit IgG (ab152095, Abcam) と 1:1000 の濃度の anti - active caspase 3 rabbit IgG (ab13847, Abcam) を加え一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、二次抗体として 1:200 の濃度の Alexa Flour[®] 488 goat anti - rabbit IgG antibody (A1108, Life technologies) を加え一時間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。次いで一次抗体として 1:1000 の濃度の anti - neurofilament 200 mouse IgG (NF200, clone NR52, Sigma) を加え一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、二次抗体として 1:200 の濃度の Alexa Flour[®] 568 goat anti - mouse IgG antibody (A1104, Life technologies) を加え一時間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。カバーガラスをスライドグラスに乗せ ProLong[®] Gold 褪色防止剤で封入し、共焦点レーザスキャン顕微鏡 (Zeiss LSM5 Pascal) を用い観察した。それぞれ NF200 で染色された細胞数と BrdU と NF200、active caspase 3 と NF200 で二重染色された細胞数を計測した。各群とも 3 つのウェルについて検討した。

5.3 実験結果

5.3.1 神経栄養因子の耳毒性物質による前庭神経節障害からの保護効果の発達段階による変化

P1 と P3、P7、P14 のラットから摘出した VGN を BDNF (50 ng/ml) や NT-3 (50 ng/ml)、GM (0.5 mg/ml)、Cis (2 μ M) を投与した培養液で 48 時間培養し、VGN の生存細胞数、樹状突起を持つ細胞の割合、樹状突起の長さに対する外因性神経栄養因子の耳毒性からの保護効果について検討した。

P3 ラットと P14 ラットの初代培養の GM 群と GM+BDNF 群の代表的免疫染色画像を図 10 に示した。

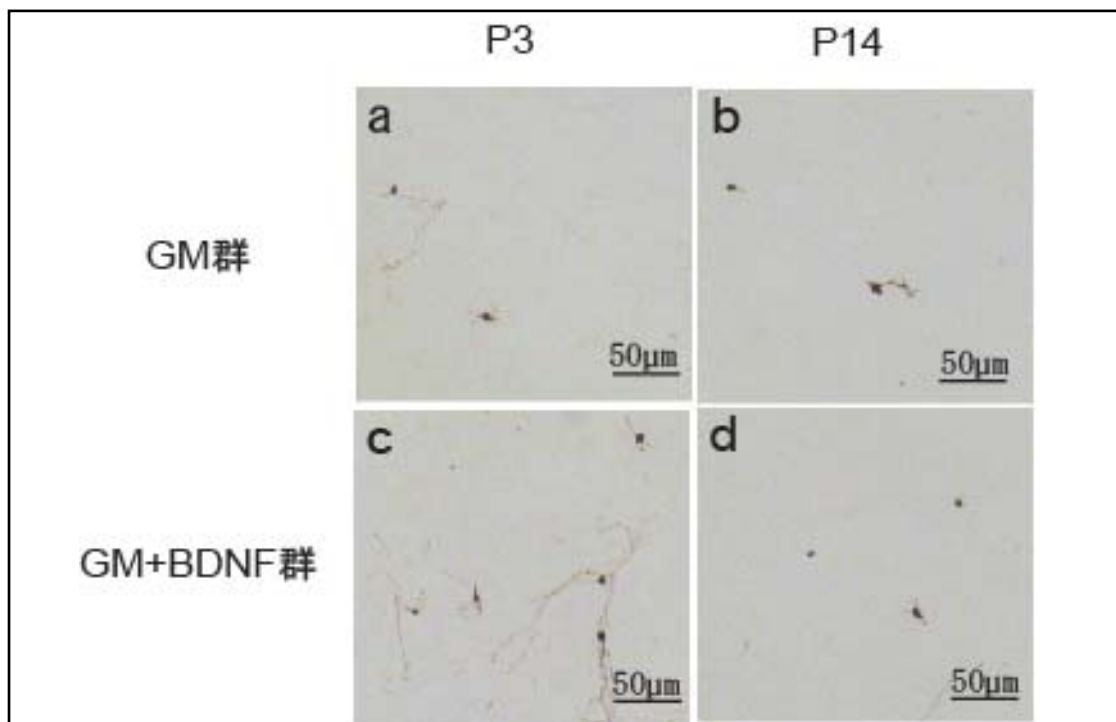


図 10. 耳毒性物質と神経栄養因子を投与し培養した VGN の代表的画像
生後 3 日(a, c)と生後 14 日(b, d)の VGN の代表的画像。
a, b : 0.5 mg/ml GM を投与した GM 群
c, d : 0.5 mg/ml GM と 50ng/ml BDNF を投与した GM+BDNF 群
生存 VGN は NF200 で染色されている。

耳毒性物質として GM や Cis を培養液に加え前庭神経節細胞の培養を行った場合、生存細胞数、樹状突起を持つ細胞の比率、最長の樹状突起の長さは、ほぼ全ての発達時期において Control 群に対し減少した (図 11)。

BDNF を耳毒性物質 (GM や Cis) と同時に培養液に投与した場合、VGN の生存細胞数は耳毒性物質単独投与の場合に比べ、P1 と P3 ラットでは有意に生存細胞数が増加した ($p<0.01$; 図 11a)。一方でこの細胞生存に対する保護効果は、P7 と P14 ラットでは P7 ラットの Cis+BDNF 群 ($p<0.05$) 以外では認められなかった ($p>0.05$)。また BDNF は P1 と P3 ラットにおいては樹状突起を持つ細胞の比率も増加させた ($p<0.01$; P1 ラットの Cis+BDNF 群と P3 ラットの GM+BDNF 群; $p<0.05$; P1 ラットの GM+BDNF 群と、P3 ラットの Cis+BDNF 群; 図 11b) が、P7 と P14 ラットでは P7 ラットの Cis+BDNF 群 ($p<0.05$) 以外ではこの樹状突起を持つ細胞の比率の増加効果は認められなかった ($p>0.05$)。また BDNF は P14 ラットの GM+BDNF 群を除くすべての発達時期で、GM 群や Cis 群に対し有意に樹状突起の長さを伸長させた ($p<0.01$; 図 11c)。一方、NT-3 と耳毒性物質を同時に投与した場合、P1 と P3 ラットでは有意に生存細胞数を増加させた ($p<0.01$) が、その保護効果は BDNF に比べ小さかった。また、NT-3 も P1 と P3 ラットでは P1 ラットの GM+NT-3 群 ($p>0.05$) を除いて、GM 群や Cis 群に比べ樹状突起の長さを伸長させる効果を認めた ($p<0.01$; P1 ラットの Cis+NT-3 群、P3 ラットの GM+NT-3 群や Cis+NT-3 群; 図 11c)。一方すべての発達時期において樹状突起を持つ細胞の比率を増やす効果は認めなかった ($p>0.1$; 図 11b)。

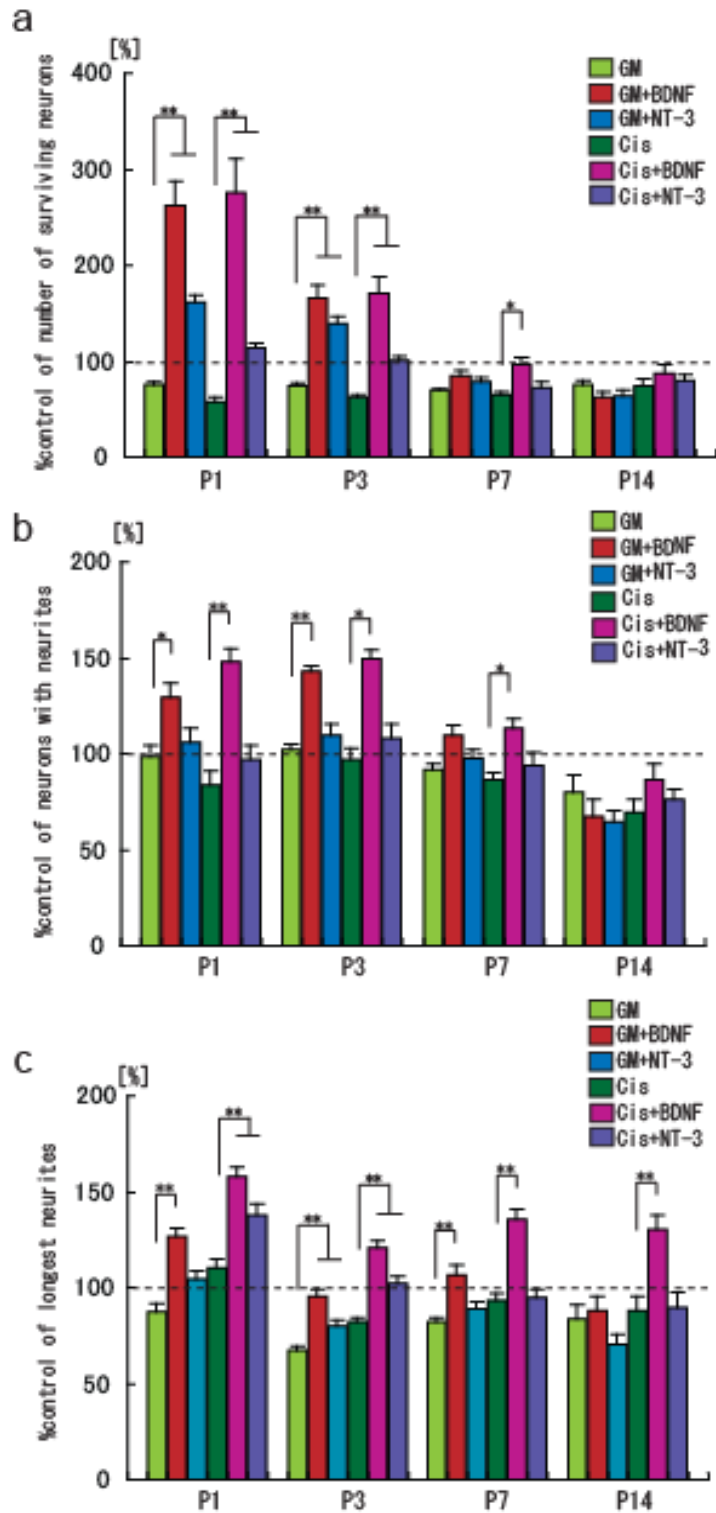


図 11. BDNF と NT-3 の耳毒性に対する保護効果の発達時期による変化

- a. 各群の VGN の生存細胞数のコントロール比
 - b. 各群の樹状突起を持つ VGN の比率のコントロール比
 - c. 各群の VGN の最長の樹状突起の長さのコントロール比
- 点線で各時期における Control 群を 100% として示した。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

5.3.2 BDNF と NT-3 の濃度による神経保護作用の変化の検討

神経栄養因子の濃度を変えることで耳毒性物質による前庭神経節細胞障害に対する神経保護効果に変化し、P14 ラットの VGN でも神経保護効果を持つようになるか、BDNF と NT-3 の濃度を 1 ng/ml と 50 ng/ml、200 ng/ml の 3 つの濃度に変え、細胞生存と樹状突起の形成と伸長の 3 項目について検討した。BDNF と NT-3 の両者ともすべての濃度で神経節細胞の生存および樹状突起を持つ細胞の比率について有意な保護効果を認めず、耳毒性からの保護効果について濃度による有意差は認めなかった (図 12a,b)。最長の樹状突起の長さについては、NT-3 はすべての濃度で GM 群と Cis 群に対し有意差を認めず、保護効果を示さなかった (図 12c)。一方 BDNF は Cis+BDNF 群においてはすべての濃度で有意に伸長効果を認めたが、濃度間での有意差は認めなかった (図 12c)。P14 ラットの VGN における耳毒性物質による神経節細胞障害時の神経栄養因子の神経保護効果は、検討した 3 つの保護効果のすべてにおいて投与濃度の変化による違いは認めなかった。

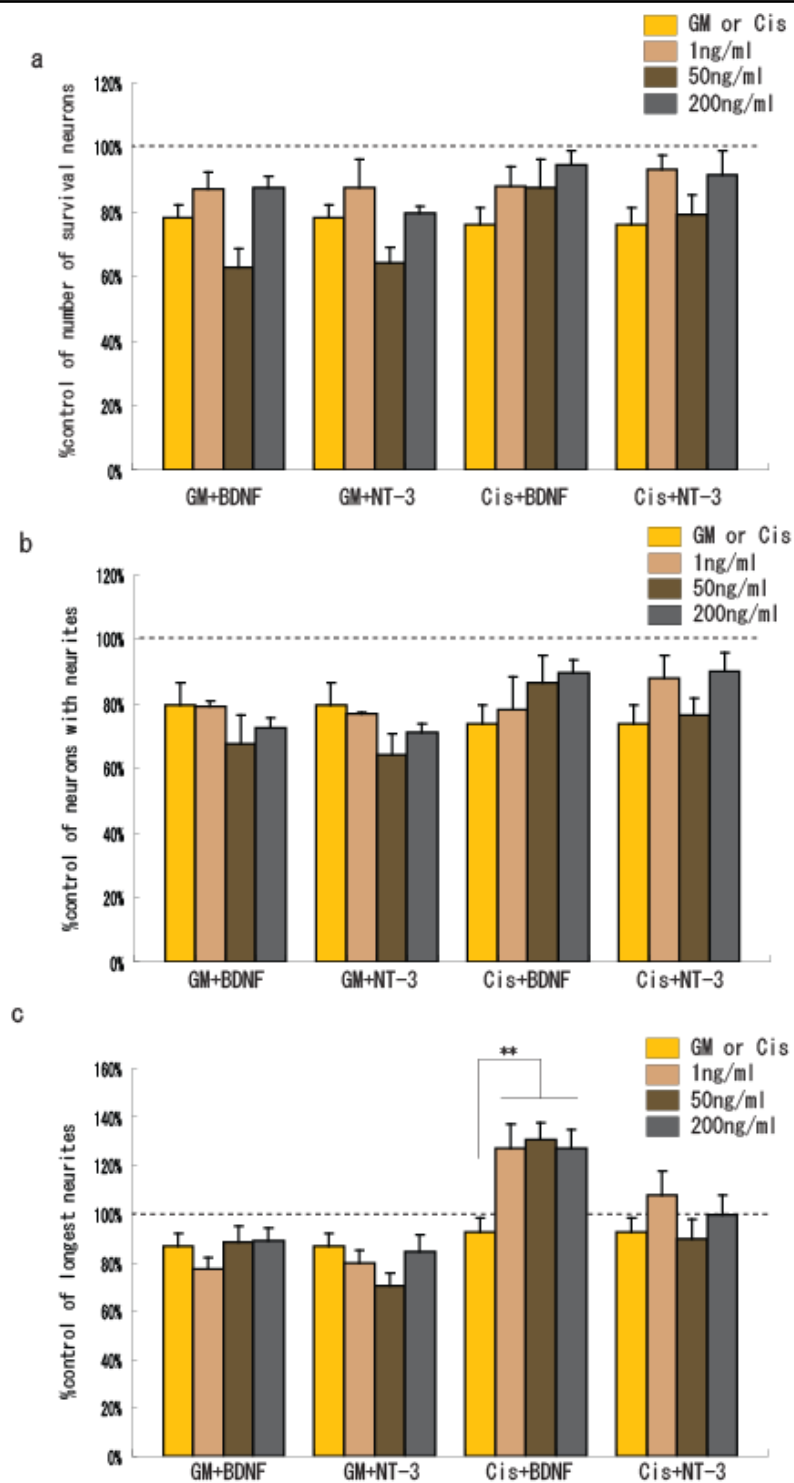


図 12. BDNF と NT-3 の耳毒性遺体する保護効果の濃度による変化
BDNF と NT-3 の濃度を 1 ng/ml と 50 ng/ml、200 ng/ml と変化させ、
P14 ラットの VGN に対する保護効果を検討した。

- a. 各群の VGN の生存細胞数のコントロール比
 - b. 各群の樹状突起を持つ VGN の比率のコントロール比
 - c. 各群の VGN の最長の樹状突起の長さのコントロール比
- 点線で各時期における Control 群を 100%として示した。

*p<0.05、**p<0.01

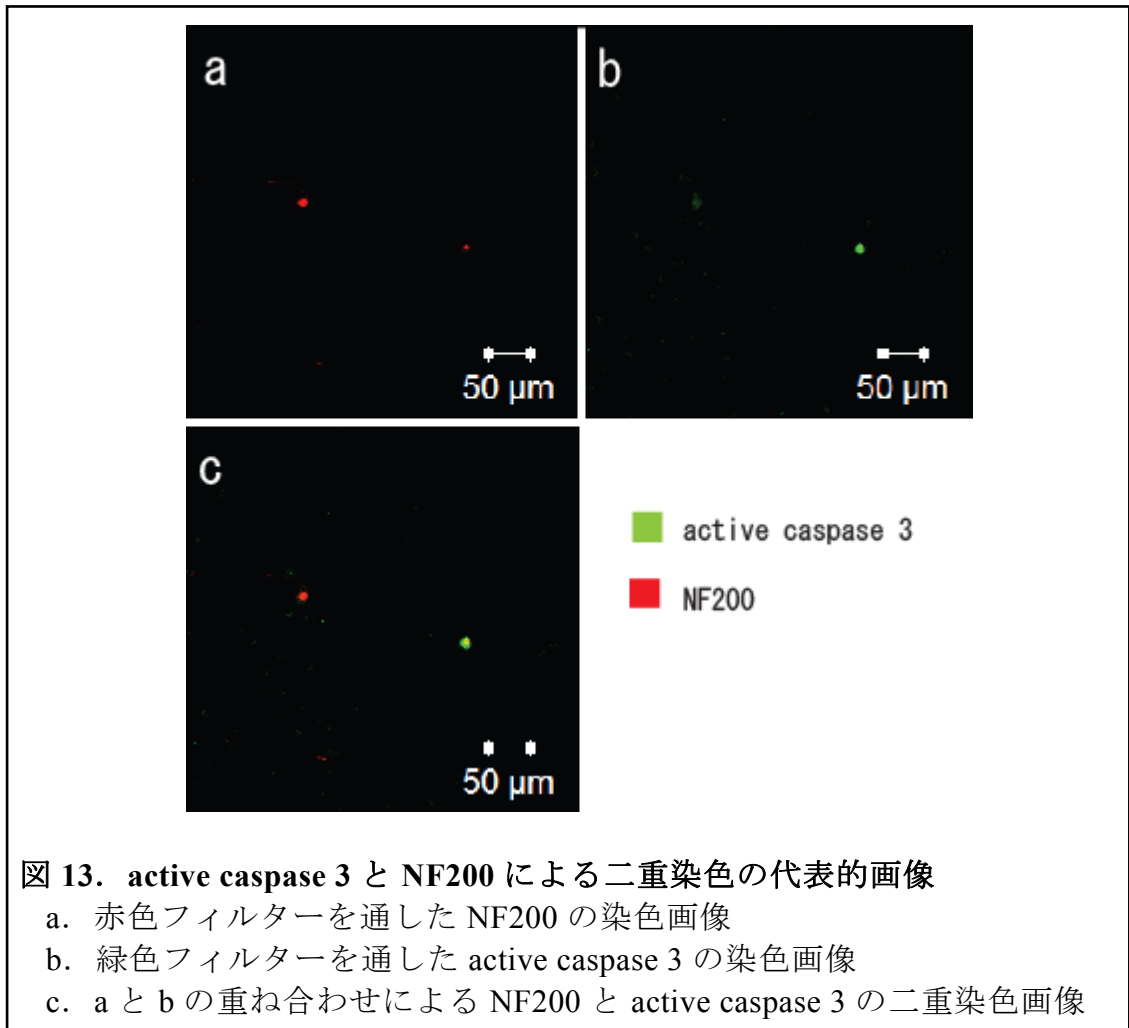
5.3.3 培養中の VGN の細胞分裂とアポトーシスの有無の検討

BDNF と NT-3 の VGN に対する保護効果が、細胞分裂によるものか、あるいはアポトーシスの抑制によるものであるか、について明らかにすることを目的として、P3 ラットの VGN を用いて BrdU と NF200 および active caspase 3 と NF200 との二重染色を行い、二重染色される VGN の細胞数を検討した。すべての群で BrdU と NF200 の二重染色で両者に染色される VGN は認めず (表 1)、培養中に神経細胞の細胞分裂が起きていないことが示された。また active caspase 3 と NF200 の二重染色ではごく少数であるものの二重染色される VGN を認め (図 13、表 1)、培養中に神経細胞のアポトーシスが起きていることが示された。これらの結果から外因性神経栄養因子投与群における VGN の生存細胞数の増加が、細胞分裂の促進によるものではなくアポトーシスの抑制が関与することが示唆された。

	Control	BDNF	NT-3
Caspase 3	7/1279	0/1785	2/1599
BrdU	0/937	0/2235	0/1446
	GM	GM+BDNF	GM+NT-3
Caspase 3	9/982	3/1228	5/1206
BrdU	0/920	0/1674	0/1453
	Cis	Cis+BDNF	Cis+NT-3
Caspase 3	9/661	6/1420	6/1054
BrdU	0/646	0/1806	0/1183

表 1. アポトーシスと細胞分裂をしている VGN の細胞数

P3 ラットの VGN を用い、active caspase 3 と NF200、BrdU と NF200 で二重染色を施行し、二重染色された細胞数/NF200 で染色された細胞数を示した。



5.4 実験2の考察

BDNF と NT-3 の耳毒性に対する VGN の保護効果も発達時期に依存して変化しており、BDNF と NT-3 の細胞生存や BDNF の樹状突起の形成に対する保護効果は、P7 の Cis+BDNF 群を除いて生後早期 (P1 と P3 ラット) に限定されていた。一方 BDNF の樹状突起の伸長に対する保護効果は、より発達のすすんだ P7 や P14 ラットでも認めたが、NT-3 では主に生後早期 (P1 と P3 ラット) でのみ保護効果を認めた。BDNF は耳毒性物質からの保護効果についても NT-3 より強い保護作用を持ち、耳毒性物質からの VGN の保護への臨床応用への検討に対し NT-3 より有望な因子であることも明らかとなった。

本研究の結果より耳毒性物質投与時の VGN に対する神経保護作用の臨床応用への可能性を検討するにあたっては、発達時期による保護効果の変化についても念頭におく必要があることが示された。成熟した個体においては神経栄養因子の単なる投与では神経保護効果を認めない可能性が示唆され、神経栄養因子の神経保護作用の発達時期による変化のメカニズムを明らかにする必要があると考えられた。

6. 実験3：神経栄養因子の各受容体の発現の発達時期による変化の検討

6.1 実験背景

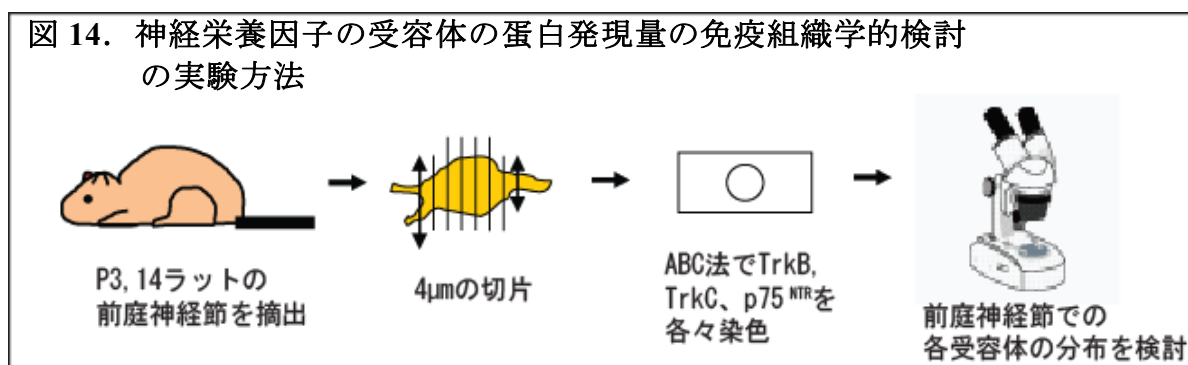
実験1,2で認められた外因性神経栄養因子の発達時期による作用の変化のメカニズムを明らかにするため、VGNにおける神経栄養因子の各受容体の発現の変化について検討を行うこととした。

胎生期のVGNの生存にはTrkBとTrkCが重要であることが、ノックアウトマウスを用いた実験で示されている[19,20]。ラットの前庭神経節ではTrkBとTrkC、p75^{NTR}の蛋白だけでなく各受容体をコードするmRNAも胎生期と生後の発達時期における発現が確認されている[14,15,16]。本研究におけるBDNFとNT-3の各受容体の発達時期による発現の変化の検討においては、TrkBとTrkC、p75^{NTR}の蛋白だけでなく、mRNAの発現量の発達時期による変化についてもquantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)を用い検討した。

6.2 実験方法

6.2.1 神経栄養因子の各受容体の蛋白の発現量の発達時期による変化の免疫組織学的検討

P3 と P14 の Wistar ラットを安楽死させたのち、両側の上前庭神経節を摘出し 4%パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定した後、パラフィンで包埋し、縦方向に厚さ 4 μm の切片を製作し、ABC 法を用いて各神経栄養因子の受容体の分布を検討した (図 14)。



切片を PBS で洗浄した後、ニチレイ 415201 抗原賦活化液 pH9.0 (NICHIREI BIOSCIENCES INC, Tokyo, Japan) を用い 10 分間煮沸したのち室温に戻るまで冷まし、PBS で洗浄した。3%ウマ血清を含む PBS で室温で 20 分間ブロッキング処理をした。1% ウマ血清を含む PBS に一次抗体として各々 1:100 の濃度の anti - TrkB mouse monoclonal antibody (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)、1:400 の濃度の anti - TrkC rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danverse, MA, USA)、1:400 の濃度の anti - p75^{NTR} rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) を加え、4°Cで一晩インキュベートし、PBS で洗浄した。1% ウマ血清を含む PBS に二次抗体として TrkB に対しては 1:500 の濃度のビオチン標識 goat anti - mouse IgG antibody (Vector Lab.) を加え、TrkC と p75^{NTR} に対しては 1:500

の濃度のビオチン標識 goat anti - rabbit IgG antibody (Vector Lab.) を加え、室温で一時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、VECTASTAIN ABC-Alkaline phosphatase Kit, VECTOR AK-5000 (Vector Lab.) で室温で 1 時間処理した後 PBS で洗浄し、VECTOR Red Alkaline phosphatase Substrate Kit, VECTOR SK-5100 (Vector Lab.) で目的蛋白を赤色に染色した。流水で洗浄した後、切片を Hematoxylin Solution, Gill No1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で対比染色し、脱水したのち封入した。ネガティブコントロールとして、一次抗体をそれぞれ 1:800 の濃度の mouse IgG antibody (Vector Lab.) と 1:400 の濃度の rabbit IgG antibody (Vector Lab.) に変えて免疫染色を行い、染色されないことを確認した。

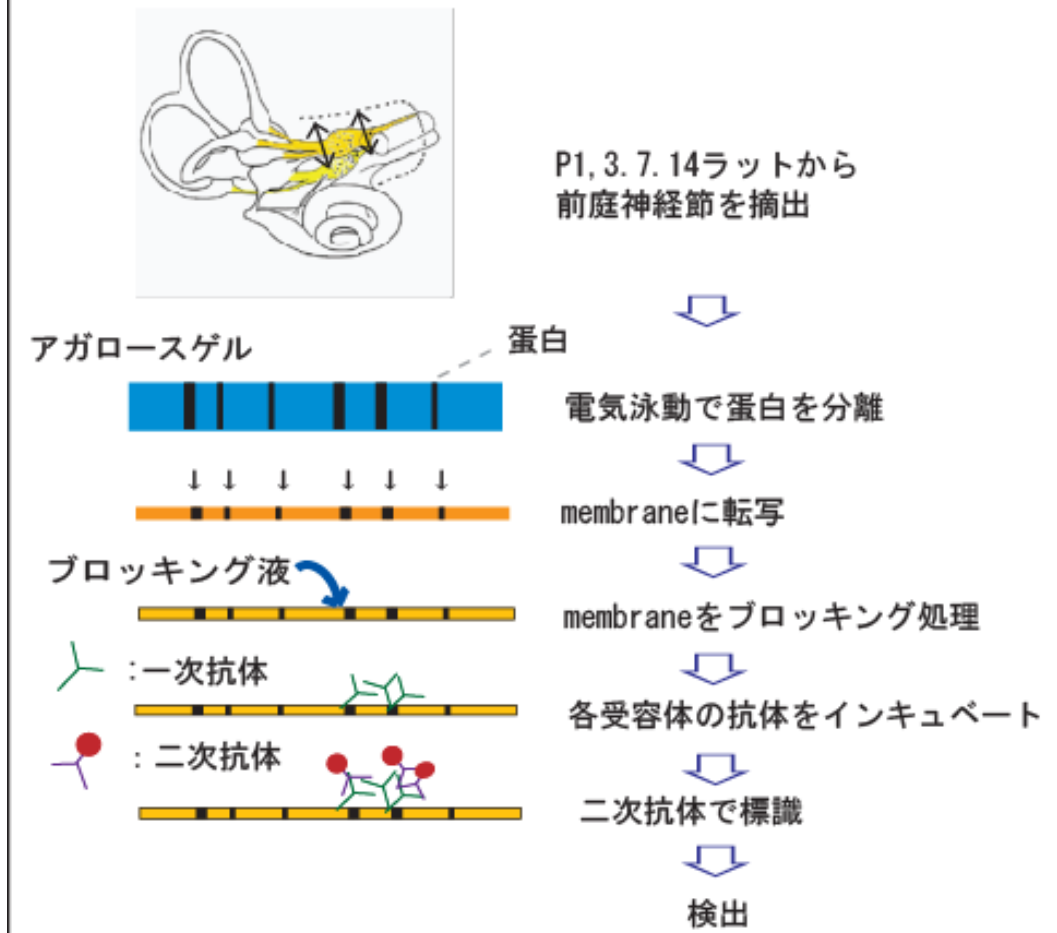
6.2.2. 神経栄養因子の各受容体の蛋白の発現量の発達時期による変化の Western blot 法による検討

P1 と P3、P7、P17 の Wistar ラットを安楽死させてから摘出した上前庭神経節を RIPA buffer (1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% デオキシコール酸 Na を含む PBS) でホモジナイズし、4°C 14000rpm で 30 分間遠心して、上清をサンプルとした。BCA Protein Assay kit, Thermo 23227 (Thermo Fisher Science Inc, Waltham, MA, USA) を用い、POWERSCAN HT (DS Pharmabiomedical, Osaka, Japan、現在は BioTek Japan, Tokyo, Japan に移管) で吸光度を測定した。7.5% ポリアクリルアミドゲル上で 200V で 60 分間電気泳動にかけて分子量サイズ毎に蛋白を分離した後、Amersham Hybond-P 膜 (GE Healthcare UK Ltd. Buckinghamshire, UK) に 70mA で 60 分かけて転写した。Blocking One (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) で転写膜を 1 時間ブロッキング処理した。TrkB と p75^{NTR} は Signal Enhancer HIKARI (Nacalai Tesque) に各々

1:300 の濃度の anti - TrkB rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) と 1:500 の濃度の anti - p75^{NTR} rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) を加え 4°C で一晩インキュベートした。TrkC と β -actin は 5% Blocking One を含む 0.1% Tween 20 in TBS (TBS-T) に各々 1:500 の濃度の anti - TrkC rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) と 1:500000 の濃度の anti - β -actin mouse monoclonal antibody (Sigma Aldrich) で 4°C で一晩インキュベートした。TBS-T で各 15 分間、3 回洗浄した。TrkB と p75^{NTR} は Signal Enhancer HIKARI で 5000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識 goat anti - rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、TrkC は 5% Blocking One を含む TBS-T で 5000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識 goat anti - rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology)、 β -actin は 5% Blocking One を含む TBS-T で 5000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識 goat anti - mouse IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology) で室温で一時間インキュベートした。TBS-T で 3 回洗浄した後、Chemi - Lumi One Super (Nacalai Tesque) で抗体を検出し、ルミノイメージアナライザー LAS-3000 mini (富士フイルム, Tokyo, Japan) で化学発光を検出し、画像解析ソフト Multi Gauge (富士フイルム) を用い数値化した。 β -actin の発現量をコントロールとして用い、TrkB と TrkC、p75^{NTR} の蛋白の発現量を β -actin とのコントロール比で検討した。陽性コントロールとしてラットの脳皮質を用いて各抗体の分子量のバンドを確認した。1 回の実験には発達時期ごとに 10 個の前庭神経節を用い、それぞれ 5 回実験を施行した (図 15)。

統計結果は means \pm SEM で示した。統計学的有意差は Kruskal Wallis test と post-hoc Steel-Dwass test を用いて検討し、 $p < 0.05$ のとき有意差ありとした。

図 15. 神経栄養因子の受容体の蛋白発現量の Western blot 法による検討方法



6.2.3 神経栄養因子の各受容体の mRNA の発現量の発達時期による変化の quantitative RT-PCR を用いた検討

P1とP3、P7、P14のWistarラットを安楽死させたのち上前庭神経節を摘出した。Trizol[®] (Invitrogen Life Technology Corp, Carlsbad, CA, USA) を用いて前庭神経節から全細胞のRNAを抽出し、逆転写酵素にはReverTra Ace[®] (東洋紡, Osaka, Japan) を用いて1 μgのtotal RNAから鋳型相補的DNA (cDNA) を合成した。DNAポリメラーゼにはKOD Dash (東洋紡) を使い、熱変性、プライマーのアニーリング、伸長反応ステップで構成されるサイクルで35サイクルPCR増幅した。サーマルサイ

クラーにはASTEC PC - 818A (ASTEC, Fukuoka, Japan)を用いた。PCR増幅産物は2%アガロースゲル上でサイズごとに分画し、紫外線下で可視化させた。ラットのTrkB、TrkC、p75^{NTR}の配列に基づいて選択したプライマーを表2に示した。成熟ラットの脳から抽出したTotal RNA を陽性コントロールとして用いた。

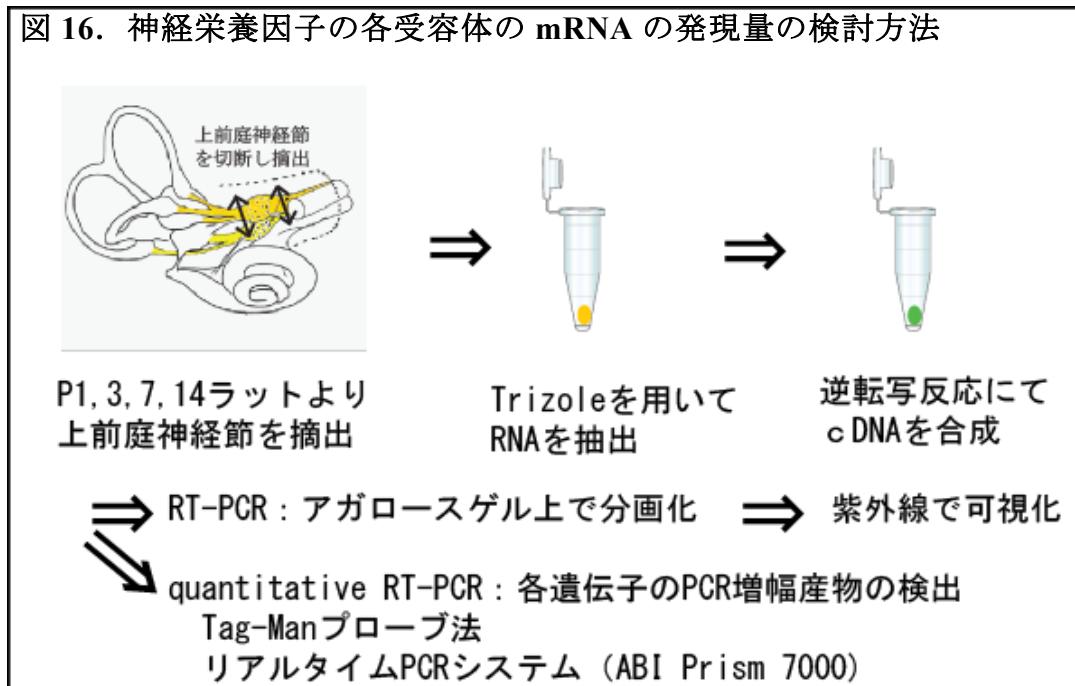
表2. 神経栄養因子の各受容体の増幅に用いたPCRプライマー

	Size (bp)		Sequence (5'-3')
TrkB	486	Sense	GGC CAA GAA TGA ATA TGG GAA
		Antisense	TTG AGC TGG CTG TTG GTG AT
TrkC	527	Sense	AGC TGC TCA CTA ACC TGC AGC ATG
		Antisense	GGT AAA GAT CTC CCA AAG AAT AAC
p75 ^{NTR}	553	Sense	TGC TGC TGC TGC TGA TTC TA
		Antisense	GAC CTT GGG ATC CAT CGA C
GAPDH	162	Sense	TGA GGA CCA GGT TGT CTC CT
		Antisense	ATG GTA GGC CAT GAG TCC AC

Taq-Man プローブ法を用いてquantitative RT-PCRを行なった。サーマルサイクラーにはASTEC PC - 818A (ASTEC)、リアルタイムPCRシステムにはABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。18SリボソームRNAの発現量を内因性コントロールとして用い、各遺伝子のPCR増幅産物値をコントロール比で検討した。各プローブはApplied Biosystems LLC (Fostercity, CA, USA) から購入し、TrkBにはRn01441749_m1、TrkCにはRn00570389_m1、p75^{NTR}にはRn00561634_m1、18Sリボソームには4310893Eを用いた。それぞれ1回の実験に10個の前庭神経節を用い、各5回実験を行った (図16)。

統計結果は means ± SEM で示した。統計学的有意差は Kruskal Wallis test と post-hoc Steel-Dwass test を用いて検討し、p<0.05 のとき有意差ありとした。

図 16. 神経栄養因子の各受容体の mRNA の発現量の検討方法



6.3 実験結果

6.3.1. 神経栄養因子の各受容体の蛋白の発現量の発達時期による変化の免疫組織学的検討

P3 と P14 ラットの前庭神経節の TrkB と TrkC、p75^{NTR} の蛋白を免疫組織化学的方法で染色した代表的画像を図 17 に示す。P3 ラットの前庭神経節では TrkB と TrkC、p75^{NTR} の蛋白のすべてが陽性染色された。P14 ラットの前庭神経節では TrkB と TrkC に対する染色強度は変わらなかったが、p75^{NTR} に対する染色強度は減少した。ネガティブコントロール群として同様に希釈された rabbit IgG に抗体を置換し免疫染色を施行した。すべての発達時期の前庭神経節において明らかな陽性染色は認めなかった。

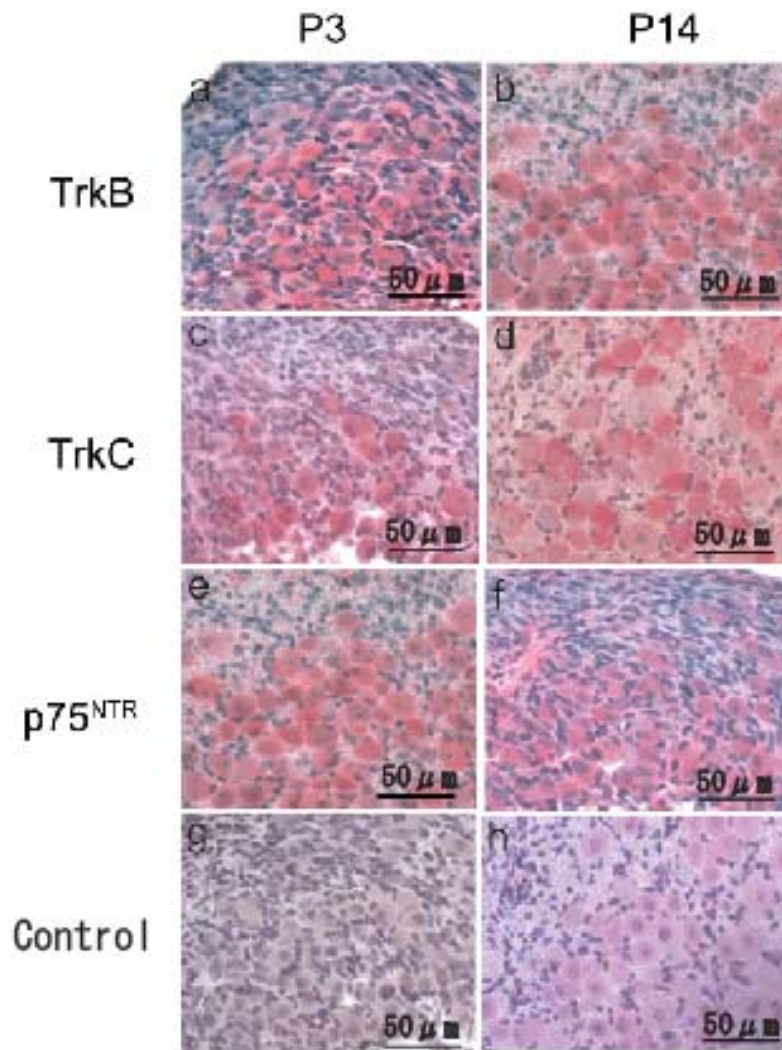


図 17. 前庭神経節における TrkB と TrkC、p75^{NTR} の蛋白の代表的免疫染色画像

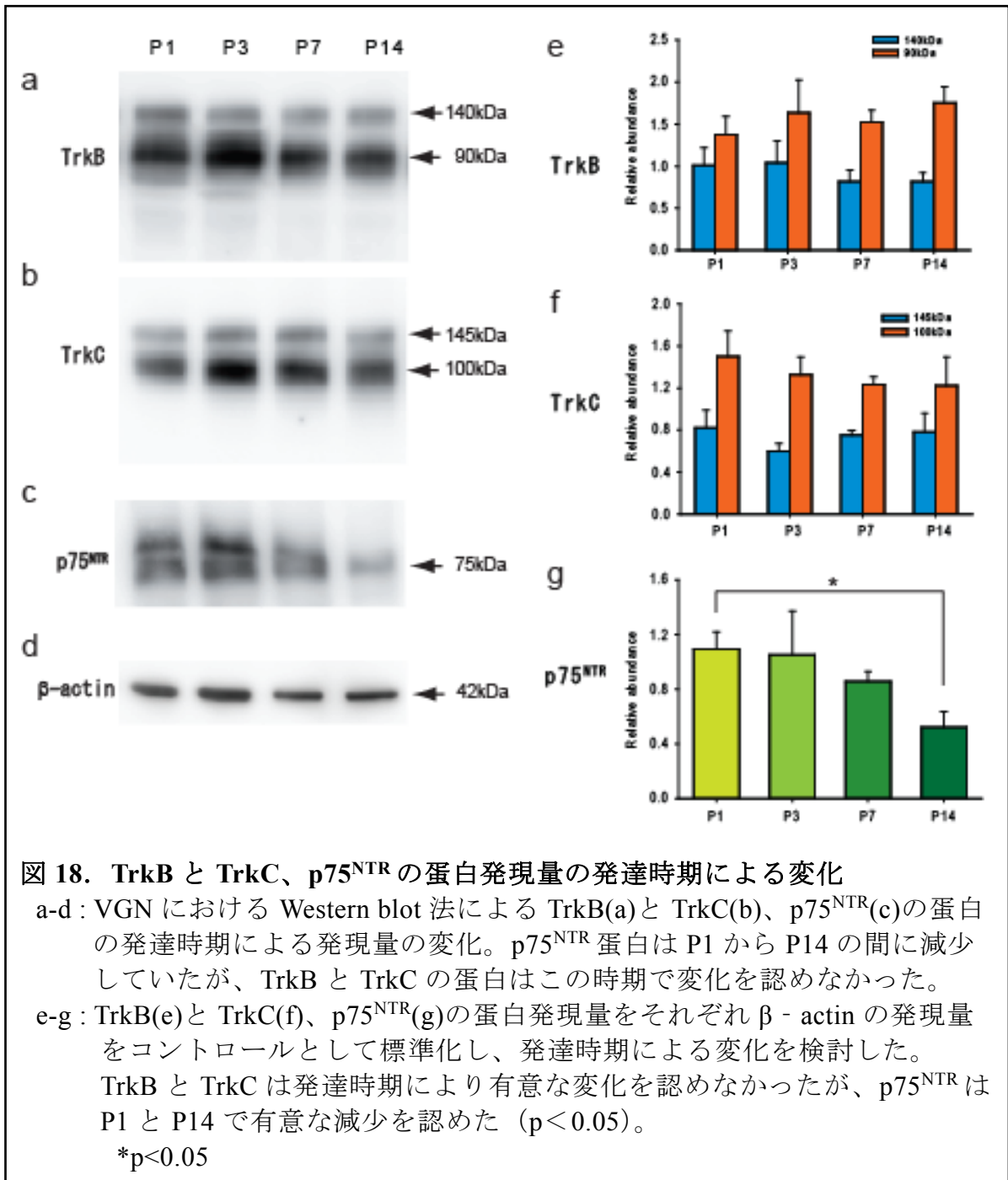
細胞核はヘマトキシリンで青に染色され、各受容体蛋白は赤で染色されている。

P3 ラット (a,c,e,g) と P14 ラット (b,d,f,h) の前庭神経節の TrkB 蛋白の染色画像 (a,b) と TrkC 蛋白の染色画像 (c,d)、p75^{NTR} 蛋白の染色画像 (e,f) を示した。

Negative control として rabbit IgG を用い施行した同様の実験では染色されなかった (g,h)。

6.3.2 神経栄養因子の各受容体の蛋白の発現量の発達時期による変化の western blot 法による検討

western blot 法を用いて各受容体の蛋白の発現量を比較検討した (図 18)。TrkB は 90kDa と 145kDa に発現を認め、TrkC は 100kDa と 145kDa、p75^{NTR} は 75kDa に発現していた。Trk 受容体は細胞内チロシンキナーゼを持つ Trk.FL と細胞内チロシンキナーゼを欠く Trk.T のアイソフォームがあることが知られており [33]、Trk.T と Trk.FL に相当する二つのバンドと考えられた。TrkB と TrkC の蛋白の発現量は二つのアイソフォームとも、発達時期により有意な変化は認めなかった ($p>0.05$)。一方で、p75^{NTR} の蛋白の発現量は P1 から P14 の間で有意に減少していた ($p<0.01$)。



6.3.3 神経栄養因子の各受容体の mRNA の発現量の発達時期による変化の

quantitative RT-PCR を用いた検討

ラットの VGN における BDNF と NT-3 の受容体をコードする mRNA の発現量の発達時期による変化を検討した。まず TrkB と TrkC、p75^{NTR} が発現していることを RT-PCR で確認した (図 19a)。TrkB は 486bp、TrkC は 527bp、p75^{NTR} は 553bp にバンドの発現が予測された。Quantitative RT-PCR を用い 18S リボソーム RNA の発現量を内因性コントロールとして用いた各遺伝子の増幅産物値のコントロール比で検討した。TrkB と TrkC の mRNA の発現量は発達時期で変化していなかったが、p75^{NTR} の mRNA の発現量は P1 と P3 ラットと P7 と P14 ラットの間で有意に減少していた ($p < 0.05$, 図 19b-d)。

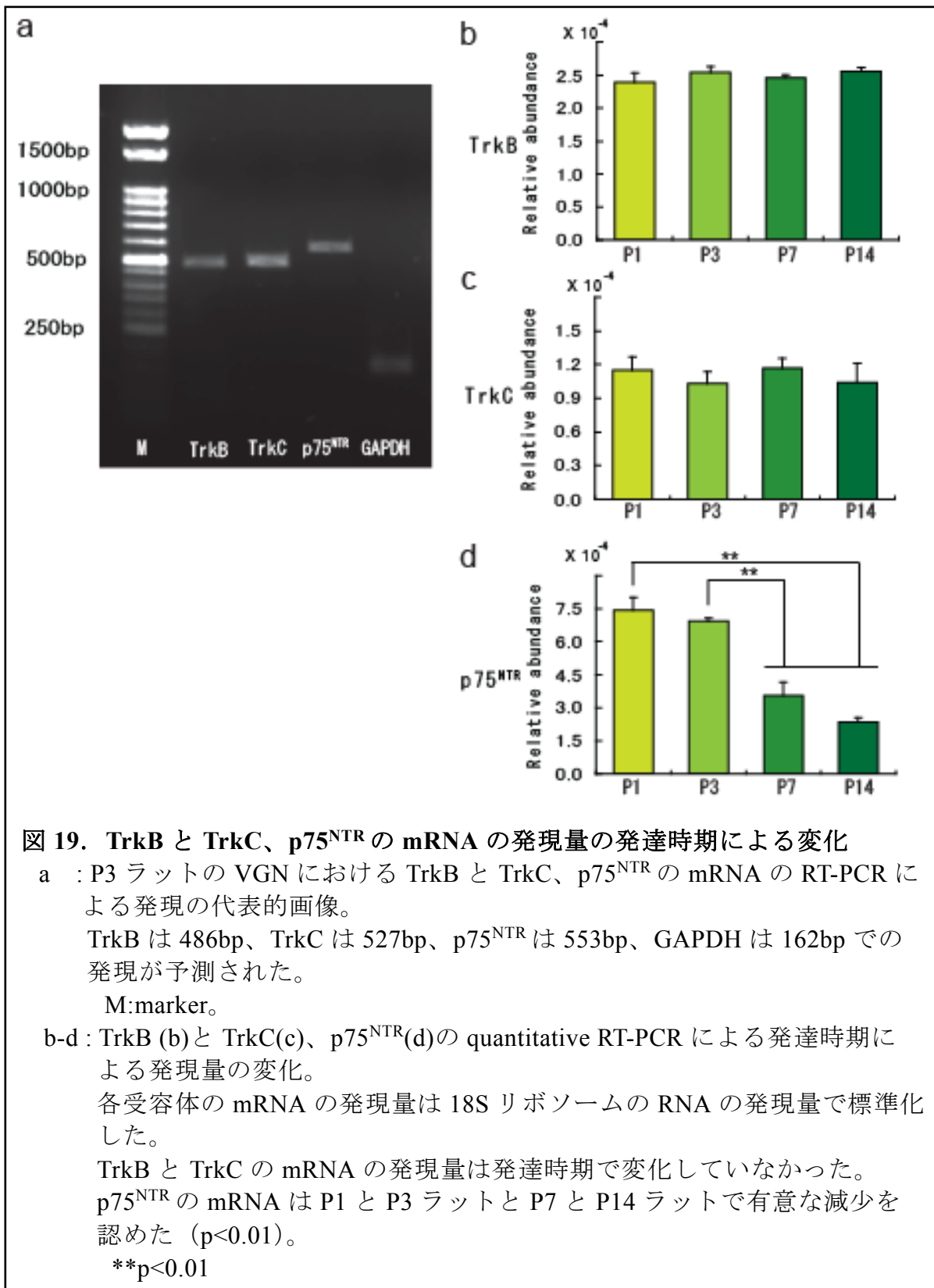


図 19. TrkB と TrkC、p75^{NTR} の mRNA の発現量の発達時期による変化

a : P3 ラットの VGN における TrkB と TrkC、p75^{NTR} の mRNA の RT-PCR による発現の代表的画像。

TrkB は 486bp、TrkC は 527bp、p75^{NTR} は 553bp、GAPDH は 162bp での発現が予測された。

M:marker。

b-d : TrkB (b)と TrkC(c)、p75^{NTR}(d)の quantitative RT-PCR による発達時期による発現量の変化。

各受容体の mRNA の発現量は 18S リボソームの RNA の発現量で標準化した。

TrkB と TrkC の mRNA の発現量は発達時期で変化していなかった。

p75^{NTR} の mRNA は P1 と P3 ラットと P7 と P14 ラットで有意な減少を認めた (p<0.01)。

**p<0.01

6.4 実験3の考察

神経栄養因子の神経保護作用の発達時期による変化のメカニズムを明らかにするため、BDNFとNT-3の受容体であるTrkBとTrkC、p75^{NTR}の蛋白とmRNAの発現量の発達時期による変化を検討した。

TrkBとTrkCの蛋白発現量のWestern blot法による解析において、TrkBは90kDaと145kDaの二つに発現を認め、TrkCは100kDaと145kDaに発現を認め、それぞれTrk.TとTrk.FLのバンドと考えられた。神経細胞の生存や分化の作用は主にTrk.FLを介し、Trk.TはTrk.FLの作用を阻害するdominant negative作用を持つと考えられていたが、TrkB.Tも独自のシグナル伝達経路により細胞生存と細胞死の両方の作用を持ち、細胞形態の制御に関与していることが明らかにされてきている[36]ため、各バンドの発現量の発達時期による変化を別々に検討した。しかしながら、TrkBとTrkCとも二つのアイソフォームの蛋白の発現量は発達時期により変化しておらず($p>0.05$)、TrkBとTrkCのmRNAの発現量についても発達時期による変化を認めなかった。これらの結果から、神経栄養因子の神経保護作用の発達時期による変化は単にTrk受容体の発現量の変化によるものではないことが示唆された。

神経栄養因子はp75^{NTR}を介してアポトーシスや神経可塑性の抑制といったTrk受容体を介した作用と逆の作用を発現することも知られている[36]。またp75^{NTR}はTrk受容体を介した経路と相互作用し、主に抑制に作用するとされるが促進にも作用し、様々な経路を介して細胞の生存や分化に複雑に関与している[38,39]。本研究においてp75^{NTR}の蛋白発現量はP1と比較し、P14では有意に減少し、mRNAの発現量についてもP1とP3ラットとP7とP14ラットで有意に減少していた

($p < 0.01$)。マウスのラセン神経節で $p75^{NTR}$ の発現量は生後 2-3 日で最大となり、その後生後 7 日にかけて減少したとの結果 [40] が報告されており、本研究ではこれと同様の傾向を認めた。 $p75^{NTR}$ の発現量の発達時期による変化は、BDNF と NT-3 の細胞生存や樹状突起の形成に対する作用の発達時期による変化と同様の傾向を示しており、神経栄養因子の作用の発達時期による変化の一因を担っている可能性が考えられた。

7. 考察

本研究では BDNF と NT-3 の VGN に対する細胞生存と BDNF の樹状突起の形成促進作用が発達時期により変化しており、GM と Cis の耳毒性からの神経保護作用も同様の発達時期による変化を示すことを明らかにした。一方 BDNF の樹状突起の長さに対する作用は発達時期で変化しなかった。この発達段階における保護効果の変化について検討する目的で、BDNF と NT-3 のレセプターについても検討を行った。TrkB と TrkC の蛋白と mRNA の発現量は発達段階を通じて変化しなかったが、p75^{NTR} の蛋白と mRNA の発現量は P1 から P14 で減少した。

神経栄養因子の VGN に対する作用の発達時期による変化

外因性 BDNF と NT-3 の VGN に対する細胞生存と樹状突起の形成に対する作用は主に生後早期に限定されており、発達時期により変化していた。chick の VGN では BDNF と NT-3 とも胎生期早期では樹状突起の伸長を促進したが、この時期以降伸長促進効果は認めず、その代り GDNF が促進効果を認めるようになり、この変化の時期はシナプス形成やプログラムされた細胞死の時期に一致していたと報告されている [28]。ラットの VGN を用いた研究では、生後初期には不規則な持続的活動を示し角加速度刺激に対しても多様な反応を示していた VGN が、生後 4-5 日で頭部の角加速度に対する反応が急激に増加し、生後 6 日で形態学的にはほぼ成熟ラットと同様のレベルとなることが報告されており [33]、生後 4-6 日の間に前庭神経節細胞と前庭とのシナプス形成が完成するものと考えられる。また、ラットにおいては、chick とは異なり、GDNF は樹状突起の伸張効果がないことが報告されている [32]。本研究において P1 と P3 ラットで認められた VGN の

細胞生存や BDNF の樹状突起の形成に対する促進効果が、P7 以降認められなくなったことは、生後 4-6 日の間に前庭神経節細胞が成熟したことと関連して BDNF と NT-3 の作用が変化していることを示唆している。また Control 群では P3 ラットで最長の樹状突起の長さが最も長くなっており、特にこの時期に軸索が伸長しシナプス形成がなされているものと考えられる。

本研究において NT-3 は P1 ラットに対する樹状突起伸長作用を除いて、すべての発達時期で VGN の樹状突起の形成と伸長に対する促進効果は認めなかった。また生後早期に認めた細胞生存に対する作用についても BDNF のほうが NT-3 より有意に生存細胞数が多く、NT-3 より BDNF のほうが VGN に対する神経保護効果が強いことが示された。このことは前庭系では BDNF と TrkB が NT-3 と TrkC より神経細胞に対する作用が強いとの過去の報告と一致している [19、20]。

神経栄養因子の濃度による VGN に対する作用の変化

本研究において神経栄養因子の濃度を変化させても P14 ラットの VGN に対する作用の有無は変わらず、細胞生存効果は認められなかった。神経栄養因子の作用は濃度依存性で、ある一定の濃度でその効果が最大となることが報告されている [28、36]。Chick の在胎 12 日の VGN を用いた実験では BDNF と NT-3 とも 50 ng/ml で最大の効果を示したと報告されている [28] が、在胎 7 日の蝸牛神経節細胞では NT-3 の細胞生存に対する作用は 1 ng/ml、樹状突起伸長作用は 2 ng/ml で最大の効果を示し、BDNF は 4 ng/ml で最大の効果を示したことが報告されており [41]、発達時期や作用毎に最大の効果を示す濃度が異なるものと考えられる。本研究において、P14 ラットにおいて NT-3 の軸索形成作用の減弱と BDNF の軸索

伸長作用が濃度によって有意差を認めなかった原因としては、BDNF、NT-3 とも 1ng/ml で既に最大効果濃度であったため、さらに高濃度にしても作用が変わらなかった可能性が考えられた。

耳毒性の機序と耳毒性からの保護に対する検討

近年 GM を含むアミノ配糖体系抗生剤や Cis の内耳の末梢感覚器や神経節細胞に対する耳毒性のメカニズムが明らかにされてきており、耳毒性の主要なメカニズムとして ROS の産生を介した機序が提唱されている。アミノ配糖体系抗生剤は金属イオンを生体分子からキレートし、キレート化金属複合物を産生する。これらのキレート化金属複合物は酸化還元活性をもち、ROS を産生する [9]。Cis も還元型グルチオンと抗酸化酵素の減少や NADPH オキシダーゼなどの ROS 産生系の活性化により ROS を産生している [9]。ROS は *c-jun* N-terminal kinase (JNK) を活性化し、チトクローム C などのアポトーシスに関与する因子を放出し、*c-jun* などの転写因子や Bcl-2 ファミリー蛋白をリン酸化し、アポトーシスを引き起こすとされる。アミノ配糖体系抗生剤の投与により内耳の有毛細胞と一次求心神経で ROS と反応生成物の産生が確認されており [9、42、43]、GM の投与による蝸牛神経節での ROS の産生の増加と JNK の発現の増加が確認されている [43]。また鉄とアミノ配糖体との複合体は内耳で ROS による細胞障害を増強させることも報告されている [10]。

耳毒性の機序の解明とともに、耳毒性からの保護の方法についても研究が進められており、モルモットを用いた実験では鉄のキレート剤、アロプリノール、ジメチルスルホキシド、安息香酸塩などのフリーラジカルスカベンジャーによって

GMによる耳毒性が軽減したと報告されている [10、44]。神経栄養因子についても、P3 ラットのラセン神経節細胞を用いた実験において BDNF は ROS の細胞内濃度を減じることにより Cis の耳毒性から保護できたと報告されている [11]。また P5 ラットにおいては BDNF と NT-3 の投与で GM と Cis の耳毒性から VGN を保護したとの報告もあり [6]、*in vitro* では神経栄養因子が耳毒性からの前庭神経節の保護作用を持つことが示されている。

神経栄養因子の耳毒性からの保護への応用に対する検討

様々な神経疾患に対して、神経栄養因子の全身投与を用いた臨床的治療の試みが近年なされているが、これまでのところ満足な結果は得られていない [23]。その原因として、主に血液内での短い半減時間と他の器官に対する副作用が挙げられている [45、46]。しかし内耳では中耳からの神経栄養因子の直接投与が可能であり、実験動物の内耳への外因性神経栄養因子の直接投与がラセン神経節細胞や有毛細胞の減少からの保護に有効であったとの報告がある [25、26、27]。また Nakaizumi ら (2004) はアデノウイルスベクターを用い難聴モルモットの内耳に卵円窓を通じて BDNF を導入することで、注入ポンプによる BDNF の継続投与と同様に内耳に BDNF の遺伝子が発現しラセン神経節細胞の減少に対し軽減効果があることを示している [25]。

しかしながら、耳毒性からの保護作用も神経栄養因子の VGN に対する作用と同様に発達時期により変化しており、特に BDNF の細胞生存や樹状突起の形成に対する保護効果と、NT-3 の細胞生存と樹状突起の伸長に対する保護効果は、主に発達早期に限定されていた。成熟した個体の VGN では BDNF と NT-3 の単なる投

与のみでは、耳毒性からの十分な保護作用が得られないことが示唆される。

神経栄養因子の作用の変化と Trk 受容体の発現量の発達時期による変化

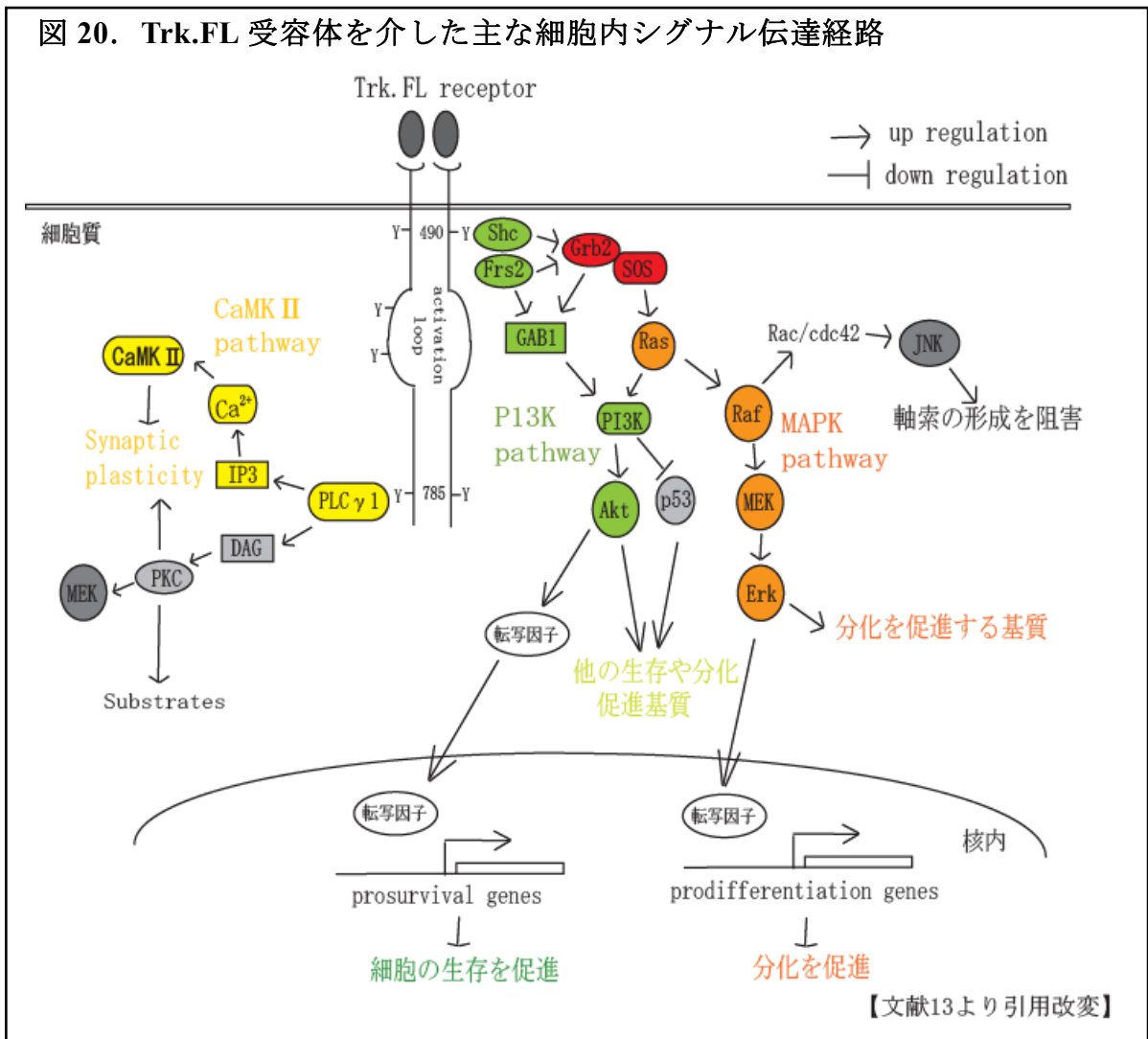
ラットの VGN における神経栄養因子の作用の発達に伴う変化のメカニズムを明らかにする事を目的に、生後の発達時期のラットから摘出した VGN における TrkB と TrkC、p75^{NTR} の蛋白と mRNA の発現量の変化を検討した。想定していた結果とは異なり、TrkB と TrkC の蛋白と mRNA の発現量は発達時期によって大きな変化は認めず、BDNF と NT-3 の細胞生存と樹状突起の形成に対する作用の発達時期による変化が、主な受容体である TrkB や TrkC の発現量の変化によるものではないことが示唆された。

しかし、BDNF や NT-3 の VGN に対して検討した効果のうち、細胞生存と樹状突起の形成に対する作用と樹状突起の長さに対する作用では発達時期による変化が異なっており、神経栄養因子の受容体を介する各細胞内シグナル伝達経路についても検討する必要があると考えられた。

Trk 受容体の細胞内シグナル伝達経路と各伝達経路の VGN に対する作用

Trk 受容体には細胞内チロシンキナーゼをもつ Trk.FL と細胞内チロシンキナーゼを欠く TrkB.T のアイソフォームがあることが知られているが、主に TrkB.FL を介して神経細胞の生存や分化、シナプスの可塑性を制御していると考えられている。Trk.FL 受容体は神経栄養因子と結合することによって二量体化とチロシン基の自己リン酸化が起こり、細胞内のシグナル伝達経路が始まる [47]。Trk.FL 受容体のリン酸化によって引き起こされる主要な細胞内伝達経路として Ras /

mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway と Shc (Src homology2domain - containing transforming protein C) を介して活性化される phosphoinositide 3 - kinase (PI3K) pathway、 phospholipase C- γ (PLC γ) を介して活性化される calcium / calumodulin - dependent protein kinase II (CaMKII) pathway の三つが挙げられている [13]。そのほかにも複数のチロシンリン酸化部位をもち、Ras や Rap - 1 といった small G protein などを経た経路や、SH2 結合ドメインを持つ中間シグナル物質と Shc との相互作用を経た経路 [48]、Ras - PI3K - Akt シグナル伝達経路も知られている [47] (図 20)。



それぞれの経路の作用についても検討されており、Ras / MAPK pathway は軸索の発達を含む細胞の分化を促進し、Shc を介して活性化される PI3K pathway は細胞生存を促進し、PLC γ を介して活性化される calcium / CaMKII pathway や Protein kinase C はシナプスの可塑性を制御し、Ras - PI3K - Akt シグナル伝達経路は細胞の分化や生存を制御すると考えられている [47]。

VGN における各受容体の細胞内シグナル伝達経路の作用についても明らかにされてきている。TrkB の Shc binding site の point mutation では VGN の神経細胞の生存に対する効果はわずかしら認められず、神経線維の伸長および神経支配分布が減少しており、Shc の結合とそれに続いて活性化される Ras / MAPK や PI3K pathway が VGN の神経支配に重要であることが示唆されている [49]。一方、TrkB の PLC γ の binding site の point mutation では VGN の蝸牛の基底回転に対する神経投射が過剰となり、神経細胞の生存に対する効果は限定的であったことから、前庭神経線維の神経支配の適切なナビゲーションには PLC γ の結合によって活性化される CaMKII pathway が重要であることが示唆されている [22]。近年 Shc と PLC γ の結合部位の double point mutation では VGN が欠損し、TrkB のノックアウトマウスでの結果とほとんど差異がなかったことが示され、BDNF と TrkB の神経細胞の生存に対する作用は主にこれら二つの結合部位の協同的な作用を介して行われていることが示唆された [50]。

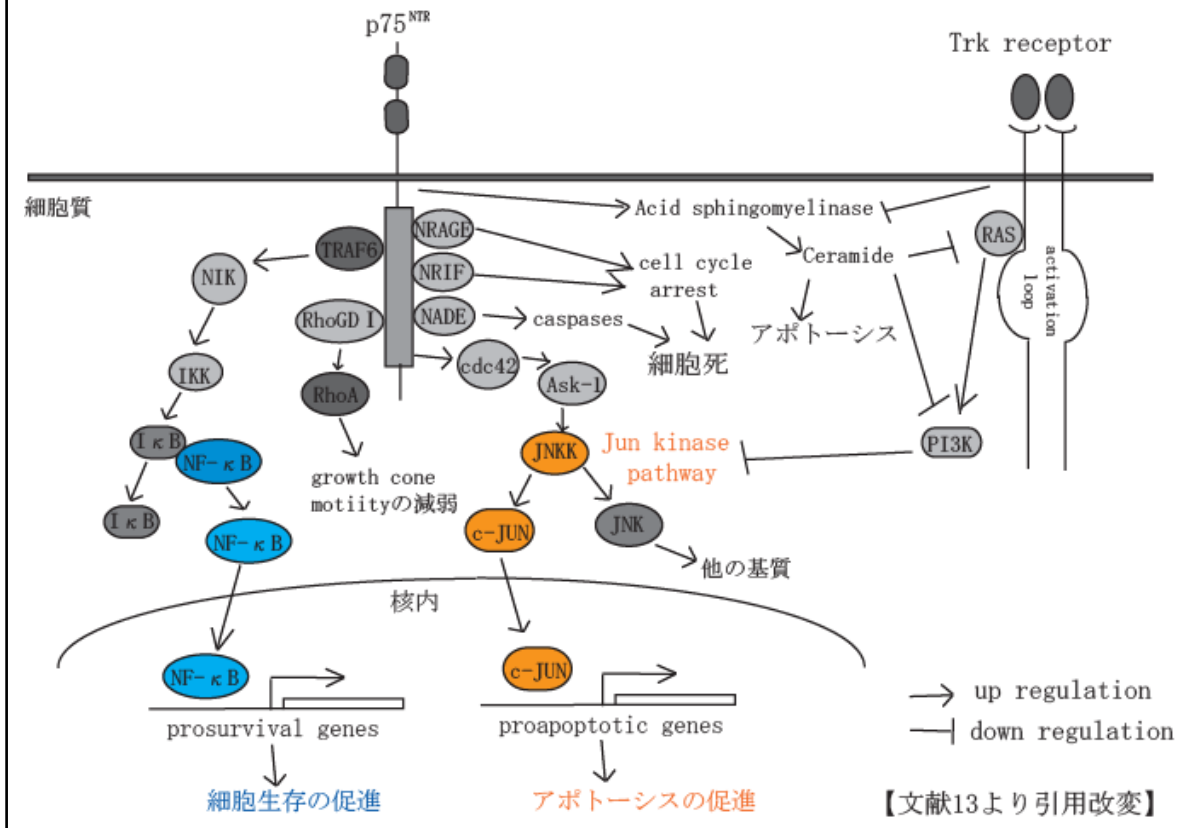
また BDNF によって活性化される ILK - Akt シグナル伝達経路はシナプス形成に重要な役割を果しているが、Trk を欠損させた培養 PC-12^{nr5} cells と、それぞれ TrkB と TrkA のみ発現させた培養 PC-12^{nr5} cells を用いた実験で、BDNF は TrkB を介して PI3K - ILK - Akt シグナル伝達経路を活性化したが、PI3K を介さず MAPK

などを介した ILK - Akt シグナル伝達経路は TrkB を介さず、TrkA と p75^{NTR} の同時発現を介して活性化されたことが報告されている [51]。複数ある Trk 受容体を介した細胞内シグナル伝達経路は個別に調整され、神経栄養因子の作用を発達時期に応じて制御していることが示唆されたが、p75^{NTR} の発現の制御や p75^{NTR} との相互作用も、Trk 受容体を介した作用を制御していることが考えられた。

p75^{NTR} の細胞内シグナル伝達経路と VGN に対する作用

p75^{NTR} は主にアポトーシスに関与する tumor necrosis factor (TNF) superfamily の一つであるが、Trk 受容体に類似した構造を持ち、すべての神経栄養因子と結合する [52]。また p75^{NTR} は Trk 受容体とシグナル伝達経路の最初の段階となる多くの関連する蛋白を持ち、Trk 受容体の作用を調整している [36、37]。p75^{NTR} は BDNF の結合による TrkB の自己リン酸化を阻害する一方で、BDNF や NT-3 の結合による Ras / MAPK pathway には影響を及ぼさず、Akt のリン酸化によっておこるシグナル伝達経路を介して細胞生存に寄与すると言われている [53]。さらに神経栄養因子は p75^{NTR} にも結合し、NF- κ B を活性化し神経細胞の生存に関与する一方で JNK の活性化を介して神経細胞のアポトーシスに関与し [13、54、55]、BDNF は p75^{NTR} を介してアポトーシスや神経可塑性の抑制といった逆の作用を発現することが知られている [35]。p75^{NTR} を介した細胞内シグナル伝達経路の主なものと Trk 受容体との相互作用を図 21 に示した。

図 21. p75^{NTR} を介した主な細胞内シグナル伝達経路と Trk 受容体との相互作用



p75 遺伝子変異マウスでは生後 1 ヶ月でラセン神経節細胞の 15.7%が減少し [38]、TrkB のノックアウトマウスでは出生時に 15-20%減少したとの結果 [19、20] と比較し、神経節細胞の減少率は類似していた。しかし p75 の遺伝子変異マウスでは生後 1 か月では明らかな難聴を認めなかったが、生後 4 ヶ月で難聴を示し、ラセン神経節の変性と基底回転の有毛細胞の喪失を認め、年齢依存性の進行性難聴を呈したと報告されている [38]。p75^{NTR} は TrkB の神経栄養因子に対する親和性と選択性を増加させ神経栄養因子の生存促進効果を促進する co-receptor として作用し [56]、生後のラセン神経節と蝸牛の有毛細胞の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられている [38]。本研究において p75^{NTR} の蛋白と mRNA の発現量は P1 から P14 ラットで有意に減少しており、BDNF と NT-3 の細胞生存

と樹状突起の形成に対する作用の発達時期による変化と同様の傾向を示した。したがって VGN についても p75^{NTR} の発現量の減少が、TrkB に対する作用を介して BDNF と NT-3 の細胞生存と樹状突起の形成に対する作用の発達時期による減少をきたす一因となっている可能性が示唆された。

本研究で明らかとなった結果と神経栄養因子の臨床応用への課題

本研究において外因性 BDNF と NT-3 の培養 VGN に対する耳毒性からの保護作用が発達時期により変化し、特に細胞生存や樹状突起の形成に対する保護効果は主に生後早期 (P1 と P3 ラット) に限定されていることが明らかとなった。この発達時期による変化の機序を調べるため、BDNF と NT-3 の受容体の発現量の変化について検討したところ、TrkB と TrkC の発現量は変化していなかったが、p75^{NTR} の発現量が発達時期に伴い減少していた。この結果から、発達に伴い p75^{NTR} の発現量が減少することで TrkB の神経栄養因子に対する親和性と選択性が低下し細胞生存効果が減少した可能性が示唆された。一方 BDNF の樹状突起の伸長効果は発達時期で変化しておらず、神経栄養因子の受容体を介した各細胞内シグナル伝達経路はそれぞれ異なる作用をもち個別に制御されている可能性も示唆された。

耳毒性物質による末梢前庭神経障害に対する治療への臨床応用を考えた場合、NT-3 より BDNF が有力な因子と考えられる。しかし BDNF の投与のみでは成熟個体においては細胞生存に対する保護効果が得られない可能性が示唆されており、Trk 受容体と p75^{NTR} の細胞内シグナル伝達とその下流に連なる伝達経路の発達時期による変化も今後明らかにしていく必要がある。

8. まとめ

1. 外因性 BDNF と NT-3 の培養 VGN に対する作用は生後発達時期により変化し、細胞生存と樹状突起の形成に対する作用は主に生後早期 (P1 と P3 ラット) に限定されていた。一方 BDNF の樹状突起の伸長作用はすべての発達時期で認められた。NT-3 は VGN に対して樹状突起の形成や伸長作用はほとんどなかった。
2. 外因性 BDNF と NT-3 の耳毒性物質に対する VGN の保護効果も、生後発達時期により同様の変化を示した。耳毒性からの保護効果も BDNF が NT-3 に比べて強かった。
3. 細胞生存や樹状突起の形成に対する効果の発達時期による変化の機序を明らかにするため、BDNF と NT-3 の受容体の発現量の変化について検討した。高親和性受容体である TrkB と TrkC の発現量は変化していなかったが、低親和性受容体である p75^{NTR} の発現量は発達時期に伴い減少していた。p75^{NTR} の発現量の減少が、BDNF と NT-3 の細胞生存に対する作用の発達時期に伴う変化の一因となっている可能性が示唆された。
4. 神経栄養因子の VGN に対する効果は細胞生存と樹状突起の伸長では異なる発達時期による変化を認め、Trk 受容体と p75^{NTR} を介した各細胞内シグナル伝達経路は個別に制御されている可能性が示唆された。
5. 耳毒性物質による末梢前庭神経障害に対する治療への神経栄養因子の臨床応用には、Trk 受容体と p75^{NTR} の細胞内シグナル伝達経路とその下流に連なる伝達経路の発達時期による変化も明らかにする必要があると考えられた。

9. 謝辞

本研究を終えるにあたり、御高閲御指導を賜りました指導教官である山唄達也先生（東京大学耳鼻咽喉科学教室教授）に謹んで深謝します。また、本研究において実験の手順などを御指導いただきました岩崎真一先生をはじめとする当研究室の先生方にも心から感謝申し上げます。また、本研究において御指導を賜りました中島敏明先生（東京大学医学部附属病院 22 世紀医療センター加圧トレーニング虚血循環生理学講座特任准教授）および実験をお手伝い頂きました長谷川貴亮さん、藺牟田宏之さんに謹んで深謝いたします。

表 1、2、図 6、7、8、10、11、12、13、17、18、19 のオリジナルの著作権は「Inoue A, Iwasaki S, Fujimoto C, Nakajima T, Yamasoba T : Developmental changes in the protective effect of exogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 against ototoxic drugs in cultured rat vestibular ganglion neurons. Cell Tissue Res 356:299-308:2014」にあり、Springer Science+Business Media の許可を得て使用しています。

10. 参考文献

1. Iwasaki S, Nakajima T, Chihara Y, Inoue A, Fujimoto C, Yamasoba T :
Developmental changes in the expression of Kv1 potassium channels in rat
vestibular ganglion cells. *Brain Res.* 1429:29-35:2012
2. Baloh T, Honrubia V : *Clinical neurophysiology of the vestibular system.* Oxford
University Press, New York :2001
3. Xie J, Talaska AE, Schacht J : New developments in aminoglycoside therapy and
ototoxicity. *Hear Res.* 281:28-37:2011
4. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V : Cisplatin ototoxicity and protection:
clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med.* 219:177-186:2009
5. Ishiyama G, Finn M, Lopez I, Tang Y, Baloh RW, Ishiyama A : Unbiased
quantification of Scarpa's ganglion neurons in aminoglycoside ototoxicity. *J Vestib
Res.* 15:197-202:2005
6. Zheng JL, Stewart RR, Gao WQ : Neurotrophin-4/5, brain-derived neurotrophic
factor, and neurotrophin-3 promote survival of cultured vestibular ganglion neurons
and protect them against neurotoxicity of ototoxins. *J Neurobiol.* 28:330-340:1995
7. McFadden SL, Ding D, Jiang H, Salvi RJ : Time course of efferent fiber and spiral
ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla. *Brain
Res.* 997:40-51:2004
8. Pettingill LN, Richardson RT, Wise AK, O'Leary SJ, Shepherd RK : Neurotrophic
factors and neural prostheses: potential clinical applications based upon findings in
the auditory system. *IEEE Trans Biomed Eng.* 54:1138-1148:2007

9. Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL, Butterfield DA : Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res.* 98:116-124:1996
10. Guthrie OW : Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology.* 249:91-96:2008
11. Gabaizadeh R, Staecker H, Liu W, Van de Water TR : BDNF protection of auditory neurons from cisplatin involves changes in intracellular levels of both reactive oxygen species and glutathione. *Brain Res Mol Brain Res.* 50:71-78:1997
12. Kaplan DR, Miller FD : Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 10:381-391:2000
13. Reichardt LF : Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361:1545-1564:2006
14. Pirvola U, Ylikoski J, Palgi J, Lehtonen E, Arumäe U, Saarma M : Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:9915-9919:1992
15. Pirvola U, Arumäe U, Moshnyakov M, Palgi J, Saarma M, Ylikoski J : Coordinated expression and function of neurotrophins and their receptors in the rat inner ear during target innervation. *Hear Res.* 75:131-144:1994
16. Ylikoski J, Pirvola U, Moshnyakov M, Palgi J, Arumäe U, Saarma M : Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. *Hear Res.* 65:69-78:1993
17. Jones KR, Fariñas I, Backus C, Reichardt LF : Target disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development.

Cell. 76:989-999:1994

18. Ernfors P, Van de Water T, Loring J, Jaenisch R : Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron*. 14:1153-1164:1995
19. Schimmang T, Minichiello L, Vazquez E, San Jose I, Giraldez F, Klein R, Represa J : Developing inner ear sensory neurons require TrkB and TrkC receptors for innervation of their peripheral targets. *Development*. 121:3381-3391:1995
20. Fritsch B, Tessarollo L, Coppola E, Reichardt LF : Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance. *Prog Brain Res*. 146:265-278:2004
21. Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R : Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*. 368:147-150:1994
22. Tessarollo L, Coppola V, Fritsch B : NT-3 replacement with brain-derived neurotrophic factor redirects vestibular nerve fibers to the cochlea. *J Neurosci*. 24:2575-2584:2004
23. Nagahara AH, Tuszynski MH : Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 10:209-219:2011
24. Ernfors P, Duan ML, ElShamy WM, Canlon B : Protection of auditory neurons from aminoglycoside toxicity by neurotrophin-3. *Nat Med*. 2:463-467:1996
25. Nakaizumi T, Kawamoto K, Minoda R, Raphael Y : Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects spiral ganglion neurons from ototoxic damage. *Audiol Neurootol*. 9:135-143:2004
26. Noushi F, Richardson RT, Hardman J, Clark G, O'Leary S : Delivery of

- neurotrophin-3 to the cochlea using alginate beads. *Otol Neurotol.* 26:528-533:2005
27. Richardson RT, Noushi F, O'Leary S : Inner ear therapy for neural preservation. *Audiol Neurootol.* 11:343-356:2006
28. Hashino E, Dolnick RY, Cohan CS : Developing vestibular ganglion neurons switch trophic sensitivity from BDNF to GDNF after target innervation. *J Neurobiol.* 38:414-427:1999
29. Nikolaou KE, Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Economou E, Boutsikou M, Puchner KP, Baka S, Hassiakos D : The varying patterns of neurotrophin changes in the perinatal period. *Ann NY Acad Sci.* 1092:426-433:2006
30. Agerman K, Hjerling-Leffler J, Blanchard MP, Scarfone E, Conlon B, Nosrat C, Ernfors P : BDNF gene replacement reveals multiple mechanisms for establishing neurotrophin specificity during sensory nervous system development. *Development.* 130:1479-1491:2003
31. Enokido Y, Wyatt S, Davies AM : Developmental changes in the response of trigeminal neurons to neurotrophins: influence of birthdate and the ganglion environment. *Development.* 126:4365-4373:1999
32. Chihara Y, Iwasaki S, Kondo K, Yamasoba T : Responsiveness of rat vestibular ganglion neurons to exogenous neurotrophic factors during postnatal development in dissociated cultures. *Brain Res.* 1408:1-7:2011
33. Curthoys IS : Postnatal developmental changes in the response of rat primary horizontal semicircular canal neurons to sinusoidal angular accelerations. *Exp Brain Res.* 47:295-300:1982

34. Davies AM, Minichiello L, Klein R : Developmental changes in NT3 signaling via TrkA and TrkB in embryonic neurons. *EMBO J.* 14:4482-4489:1995
35. Minichiello L, Piehl F, Vazquez E, Schimmang T, Hökfelt T, Represa J, Klein R : Differential effects of combined *trk* receptor mutations on dorsal root ganglion and inner ear sensory neurons. *Development.* 121:4067-4075:1995
36. Gomes JR, Costa JT, Melo CV, Felizzi F, Monteiro P, Pinto MJ, Inácio AR, Wieloch T, Almeida RD, Grãos M, Duarte CB : Excitotoxicity downregulates TrkB.FL signaling and upregulates the neuroprotective truncated TrkB receptors in cultured hippocampal and striatal neurons. *J Neurosci.* 32:4610-4622:2012
37. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H : BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Hsitopathol.* 25:237-258:2010
38. Harrison SM, Jones ME, Uecker S, Albers KM, Kudrycki KE, Davis BM : Levels of nerve growth factor and neurotrophin-3 are affected differentially by the presence of p75 in sympathetic neurons in vivo. *J Comp Neurol.* 424:99-110:2000
39. Geetha T, Jiang J, Wooten MW : Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell.* 20:301-312:2005
40. Sato T, Doi K, Taniguchi M, Yamashita T, Kubo T, Tohyama M : Progressive hearing loss in mice carrying a mutation in the *p75* gene. *Brain Res.* 1091:224-234:2006
41. Avila MA, Varela-Nieto I, Romero G, Mato JM, Giraldez F, Van de Water TR, Represa J : Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 support the survival and neuritogenesis response of developing cochleovestibular ganglion neurons. *Dev*

- Biol. 159:266-275:1993
42. Song BB, Schacht J : Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo. *Hear Res.* 94:87-93:1996
 43. Jeong SW, Kim LS, Hur D, Bae WY, Kim JR, Lee JH : Gentamicin-induced spiral ganglion cell death: apoptosis mediated by ROS and the JNK signaling pathway. *Acta Otolaryngol.* 130:670-678:2010
 44. Kawamoto K, Sha SH, Minoda R, Izumikawa M, Kuriyama H, Schacht J, Raphael Y : Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity. *Mol Ther.* 9:173-181:2004
 45. Thoenen H, Sendtner M : Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci.* 5 Suppl:1046-1050:2002
 46. Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Blanchi B, Sun YE, Ye K : A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:2687-2692:2010
 47. Huang EJ, Reichardt LF : Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 72:609-642:2003
 48. Rankin SL, Guy CS, Rahimtula M, Mearow KM : Neurotrophin-induced upregulation of p75NTR via a protein kinase C-delta-dependent mechanism. *Brain Res.* 1217:10-24:2008
 49. Postigo A, Calella AM, Fritsch B, Knipper M, Katz D, Eilers A, Schimmang T, Lewin GR, Klein R, Minichiello L : Distinct requirements for TrkB and TrkC

- signaling in target innervation by sensory neurons. *Genes Dev.* 16:633-645:2002
50. Sciarretta C, Fritsch B, Beisel K, Rocha-Sanchez SM, Buniello A, Horn JM, Minichiello L : PLC γ -activated signalling is essential for TrkB mediated sensory neuron structural plasticity. *BMC Dev Biol.* 10:103:2010
51. Li M, Dai FR, Du XP, Yang QD, Zhang X, Chen Y : Infusion of BDNF into the nucleus accumbens of aged rats improves cognition and structural synaptic plasticity through P13K-ILK-Akt signaling. *Behav Brain Res.* 231:146-153:2012
52. Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, Graham SL : TrkB receptor signaling: implications in neurodegenerative psychiatric and proliferative disorders. *Int J Mol Sci.* 14:10122-10142:2013
53. Candalija A, Cubi R, Ortega A, Aguilera J, Gil C : Trk receptors need neutral sphingomyelinase activity to promote cell viability. *FEBS Lett.* 588:167-174:2014
54. Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM : p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci.* 14:28-40:1999
55. Harrington AW, Kim JY, Yoon SO : Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for *c-jun* N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci.* 22:156-166:2002
56. Bibel M, Hoppe E, Barde YA : Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{NTR}. *EMBO J.* 18:616-622:1999