

ければ、聴皮質は視覚情報処理を行う方向に機能分化してしまい、たとえば成人になってから人工内耳で音声を入力しても、もはや不快感を伴う得体の知れない感覚を知覚するだけで、「音」や「言葉」を聴取することはできない。このように、特に感音難聴では末梢聴器の病態だけでなく、それによって異常に符号化された音信号が聴皮質でどのように処理されるか、そして視覚など他の感覚の皮質処理との競合など、高次脳機能レベルでの聴覚情報処理についての理解が重要である。

高次脳機能とは知覚・注意・学習・記憶・概念形成・推論・判断・言語活動など、感覚入力や記憶に基づいて適切な行動を計画し、実行する脳の働きを指し、主に大脳の連合野とその相互ネットワークがこれをつかさどる。補聴器や人工内耳を使用する患者の多くは聴覚のみに障害を有しているため、高度難聴そのもの、あるいは補聴システムを介した入力信号を中枢が処理しなければならないという状況が二次的に高次脳機能の活動に影響を及ぼすことになる。また逆に、高次脳機能障害がある例で補聴を必要とする場合もあり、このような例では末梢からの音信号認知に大きな問題が生じる。本稿では、補聴を介した聴覚や言語の中枢処理について高次脳機能という観点から自験例も取り上げて論じる。

難聴が高次脳機能に及ぼす影響

1. 中等度難聴

脳磁図で計測される聴性誘発脳磁界反応のうち、音入力から約 100 ms 後に側頭部で観察される N100m の等価電流双極子 (equivalent current dipole: ECD) は上側頭回の一次聴覚野近傍に局在し、刺激耳と反対側の脳半球の反応が大きく、潜時が短い。しかし、突発性難聴のような後天的疾患で片耳が高度難聴になるとこのような N100m の非対称性がなくなることから¹⁾、この内耳から聴皮質への投射の対側優位性は解剖学的に固定的なものでなく、機能的に再編成されるものであることがわかる。

内耳性の難聴患者では聴覚閾値上で入力音圧が増大すると、自覚的な音の大きさ (ラウドネス) の増加が聴覚正常者より大きくなるリクルートメント現象が見られ、この現象は内耳性難聴者で音がうるさく、不快に聴こえる聴覚過敏の原因の一つとなっている。リクルートメント現象陽性の内耳性難聴者で N100m を計測すると、入力音圧の上昇に伴って ECD モーメントも増大するが、その増大の程度は正常人に比して有意

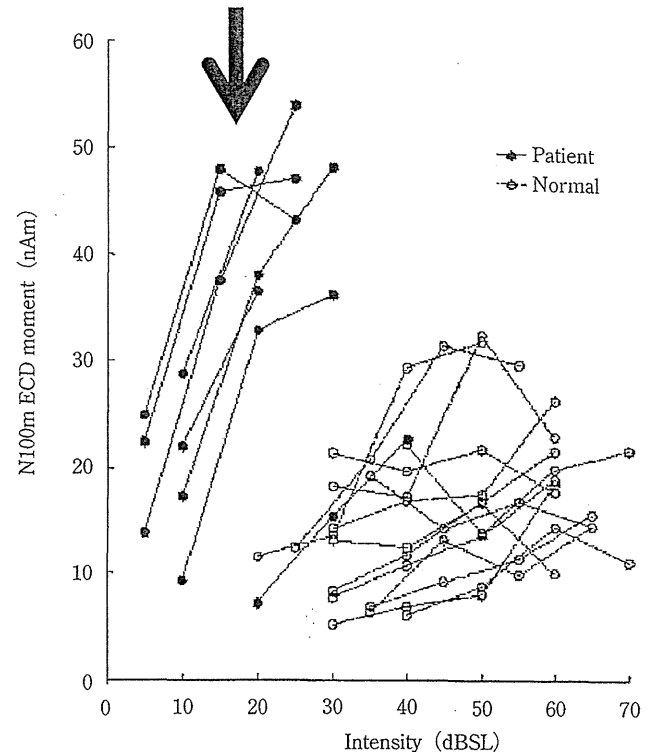


図1 リクルートメント現象と聴覚野の神経活動

リクルートメント現象陽性の内耳性難聴者 (図中の黒丸) では、閾値上の入力音圧 (横軸: dB sensation level) 上昇に伴う N100m の ECD モーメント (縦軸: nAm) 増大が正常人 (図中の白丸) に比して有意に大きい (矢印) (文献 2 より引用)。

に大きい²⁾ (図 1)。また、この過大な変化は、リクルートメント現象のある突発性難聴患者でも確認され、さらにその難聴の治癒、リクルートメント現象の消失とともに正常平均程度まで減少した³⁾。fMRI でも同様に、感音難聴患者において自覚閾値上での音圧上昇に伴う賦活レベルの上昇が聴覚正常者より急激で、音圧レベルの上昇より自覚的ラウドネスの増大によくフィットすることが報告されている⁴⁾。このように、難聴があるにもかかわらず聴皮質の反応性が亢進する現象は、聴覚心理学的なリクルートメント現象と類似しており、両者の神経機構の関連が示唆される。

次に、単語レベルでの聴皮質の反応を観察するために、中等度の内耳性難聴で語音弁別能が低下した症例で脳賦活検査を行った。あらかじめ日常生活で常用される単語を用いた聞き取りテストで各被験者について正答率の高い単語群と低い単語群を作成し、これらを単耳で聴取させた。認知しやすい単語を聴取しているときには両側の上側頭回と左の角回で有意の賦活が見られたが、認知しにくい単語聴取では刺激耳と反対側の上側頭回のみ賦活され、同側の上側頭回と角回で有意の賦活を認めなかった⁵⁾。単語の聴取に際しては両

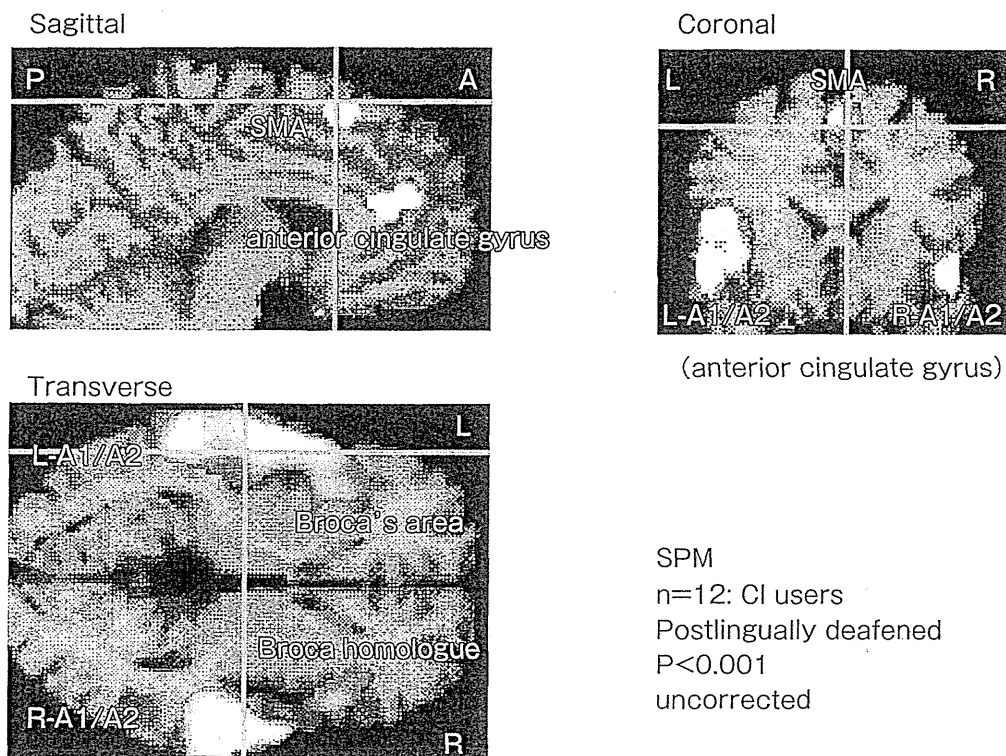


図2 言語習得後失聴人工内耳患者の脳機能

人工内耳装用者では上側頭回・上側頭溝・中側頭回 (A1/A2), ブローカ野 (Broca's area), 右半球のブローカ野相当部分 (Broca homologue), 補足運動野 (SMA), 前帯状回 (anterior cingulated gyrus) において語音認知の際の賦活が健常聴力者より有意に高い (文献7より改変して引用. この図では賦活領域が解剖学的にわかりやすいように人工内耳使用者の軸位断・冠状断賦活画像と矢状断差引画像を合成している).

半球聴覚野の協同と、角回での情報処理を経て正確な認知にいたると推測される。

2. 高度難聴・人工内耳

言語習得後失聴者の皮質活動を PET (positron emission tomography) で観察すると、言語が人工内耳のように特殊な方法で符号化された場合でも聴皮質が賦活されるが⁶⁾, 人工内耳装用者と健常聴力者の言語聴取時の脳活動は必ずしも同一ではない。言語習得後失聴者における語音認知時の脳賦活から健常聴力者のそれを差し引くと、人工内耳装用者では両側の上側頭回, 上側頭溝 (上側頭回と中側頭回との間の脳溝で聴覚連合野と視覚連合野の境界に位置する) および中側頭回, ブローカ野 (左半球), 右半球のブローカ野相当部分, 補足運動野, 前帯状回において賦活が健常聴力者より有意に高い (図2)⁷⁾。これは人工内耳で符号化された, 通常より情報量が少なく生理的パターンと大きく異なる信号を基に語音認知を達成するためには, 視覚連合野との境界を含む聴覚連合野の広い領域でより多くの情報処理が行われると同時に, 健常聴力者ではこの実験で使用した程度の容易な日常会話聴

取では有意に賦活されない前頭葉の主として言語の表出に関与する言語領域も活用されていると解釈できる。聴覚野とウェルニッケ野, 前頭葉のブローカ野, 補足運動野の間には解剖学的に線維連絡があり, Roland⁸⁾ はこれらの領域が協同して, 入力されたあいまいな言語信号をいったん保持し, 多くの候補のなかから前後関係や文脈に照合して最も適切な認知にいたる言語性のワーキングメモリを形成しているのではないかとの説を示している (図3)。

3. 聴覚処理への視覚の介入

聴覚認知に対する視覚の影響を示す例の1つに, 有名な McGurk 効果⁹⁾ がある。これは, たとえば「バ」という声の発音に合わせて「ガ」を発声している顔 (口の動き) の画像を見ると「ダ」と知覚される現象で, 視覚入力音が音声認知に影響を与えうることを示す巧妙な方法であるが, その出現には個人差があり, 必ずしも全員でこの現象が見られるわけではない。話者の顔を見ながら声を聴く場合, 聴覚野, 視覚野, 上側頭溝, ブローカ野などが活動するが, McGurk 効果が生じる被験者では, このうち左半球の上側頭溝で McGurk

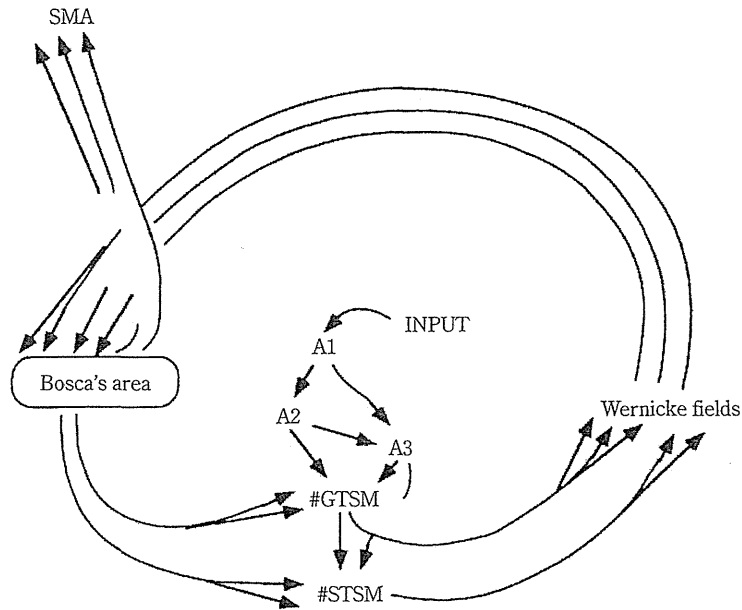


図3 言語の表出と認知を連絡する神経機構

聴覚野 (A1-3, GTSM, STSM), ウェルニッケ野 (Wernicke fields), 前頭葉のブローカ野 (Broca's area), 補足運動野 (SMA) の間には解剖学的に線維連絡があり, Roland はこれらの領域が協同して言語性のワーキングメモリを形成しているのではないかと仮説を示している(文献8より引用).

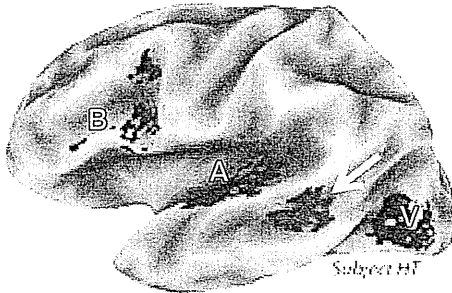


図4 McGurk 効果の皮質神経機構

話者の顔を見ながら声を聴く場合, 聴覚野 (A), 視覚野 (V), 上側頭溝 (矢印), ブローカ野 (B) などが活動するが, McGurk 効果が生じる被験者では, このうち左半球の上側頭溝で McGurk 刺激により, 視覚と聴覚間に矛盾のない刺激時に比して有意に強い賦活が生じる (文献10より引用).

刺激により, 非 McGurk 刺激 (視覚と聴覚間に矛盾のない刺激) に比して有意に強い賦活が生じ, 他の部位ではこのような有意差が見られなかったとの報告がある (図4)¹⁰⁾. この報告の著者らは, McGurk 効果を生じやすい個人は聴覚言語と視覚言語の統合についてより寛容な神経機構をもっており, これによって認知の正確性を若干犠牲にしながらかつて困難な言語聴取状況 (たとえば強い騒音下など) での音声認識の向上を図っているのではないかと推測している. この「寛容な」音声言語・視覚言語統合を行っているのが上側頭溝と

いうことになるが, われわれが言語習得後失聴の人工内耳使用者で観察した語音による広範な聴覚連合野賦活増加領域は上述のとおり上側頭回から上側頭溝・中側頭回に及んでおり⁷⁾, これが人工内耳による言語聴取という困難な課題を遂行する際に往々にして必要になる聴覚と視覚の統合機能の充進を反映しているのかも知れない. 実際に, 人工内耳使用者と健常聴力者で McGurk 効果の生じやすさを比較した報告では, 人工内耳使用者のほうが視覚の影響を受けやすいという結果が示されており¹¹⁾, この結果は人工内耳使用者の語音認知機構では相対的により視覚情報に重点をおいた聴覚・視覚統合が行われていることを示唆する.

先天性高度難聴小児が聴覚活用できないまま成長した場合, 側頭葉の聴覚連合野が聴覚に代わって受け持つ機能としては第一に視覚が念頭に浮かぶ. われわれは, 高度難聴小児において FDG-PET で視覚的言語刺激を課した際の脳代謝を分析することで言語発達期における聴覚と視覚の相互関係について検討した. 視覚言語刺激 (話をしている人の顔のビデオ画像を無音にしたもの) により, 難聴小児群で右中心前回 (BA4), 右中心後回 (BA3/1/2), 左上および下頭頂小葉 (BA7, 40), 左右の上側頭回 (BA22, 42; 聴覚連合野), 右中側頭回 (BA21; 聴覚連合野) において, 健聴成人より高い賦活が認められ, 視覚情報処理の背側経路 (上,

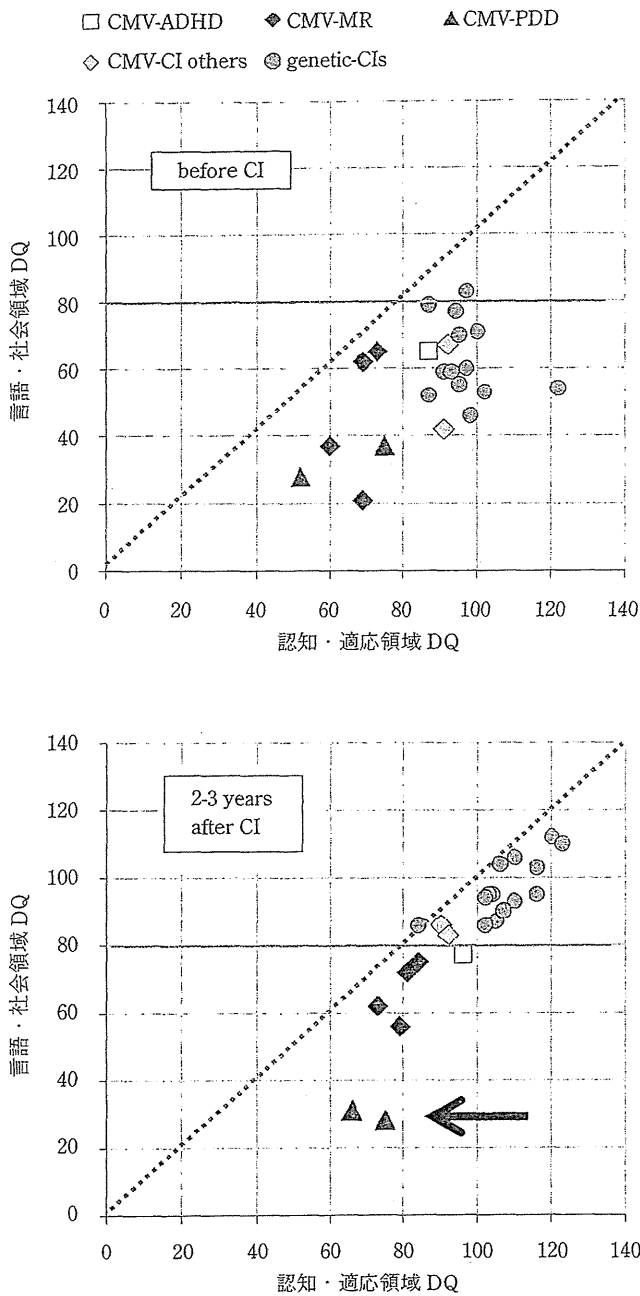


図5 先天性CMV感染高度難聴児の人工内耳による言語発達上の散布図が人工内耳手術前、下図が手術2-3年後の結果を表わす。各散布図の縦軸が言語・社会領域の発達指数、横軸が認知・適応領域の発達指数。汎汎性発達障害例(図中に三角で示す)では術後も言語・社会領域の発達が見られない(下図矢印)(文献16より引用)。

下頭頂小葉)に加えて聴覚連合野である上および中側頭回が賦活されることが判明した¹²⁾。これは、聴覚障害によって側頭連合野が聴覚野から視覚野に変化する、感覚の種類を越えた可塑性(cross-modal plasticity)を直接的に明らかにした最初の知見である。

読話の視覚刺激効果を個々の難聴小児で分析する

と、聴覚活用の程度が相対的に低い例において聴覚連合野に相当する上および中側頭回の賦活が見られる。聴覚活用の程度が進んだ例では、そうでない例に比して代謝の亢進部分が減少して左半球優位となり、聴覚連合野の賦活がなくなる。高度難聴があっても十分な聴覚活用ができる例では健聴成人との間に読話による脳賦活で有意の差がなくなる¹²⁾。FDG-PETを用いることで、難聴小児の言語ネットワークにおける視覚と聴覚の相互関係を画像として観察、評価することができ、その治療や教育の方向性を考えるための新たな資料が得られる¹²⁾。

高次脳機能が聴覚や言語に及ぼす影響

1. 側頭葉損傷患者の人工内耳

人工内耳は本来、末梢性の高度難聴に用いるのが相当である。しかし、末梢性の高度難聴に高次脳機能障害が合併して音の認知が低下している場合、その聴覚障害に占める末梢性の要因が相対的に大きければ、人工内耳によって末梢からの聴覚信号入力を再獲得することで音認知の改善が期待できる。したがって、このような状態では事前に末梢の聴覚障害の程度と、中枢の高次脳機能障害の状況をできるだけ正確に評価しておくことが重要と考えられる¹³⁾。

症例：39歳、男性。交通事故で頭部を打撲し、頭蓋骨骨折、くも膜下出血で頭蓋内血腫除去術を受けた。その後、意識が回復し、音が聴こえないことが判明した。側頭骨CTで、左側の側頭骨骨折があり、脳のMRIでは右側側頭葉の広範な浮腫と大脳基底核の出血像が見られた。純音聴力検査：両側とも110 dBスケールアウト、ABR：両側105 dB NHLで無反応。以上から、両側末梢性の聾に加えて右側頭葉と基底核の損傷による聴覚と言語の中枢性障害はあるが、その程度は高度ではないため、末梢からの聴覚信号入力が再獲得されれば一定の音の認知が可能と予測し、右人工内耳埋め込み術を行った。その結果、人工内耳の装用閾値は30~45 dBで、環境音の認知が向上し日常生活上の効果は得られたが、語音弁別成績は相対的に不良で、術後5年の時点で聴覚のみで語音弁別能は30%(67S語表)にとどまっている。患者本人の感想は「人工内耳でいろいろな音はわかるようになったが、言葉はあまりわからない」というものであるが、人工内耳は環境音の聴取を通じて日常生活に一定の貢献をしていると評価できるであろう。

2. 先天性サイトメガロウイルス感染高度難聴児の人工内耳

先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染の多くは無症状に経過するが、約 10% において生下時に何らかの臨床的に明らかな障害を伴う。また、生下時に無症候性であっても遅発性に障害を生じる例もある。無症候性感染例の 10~15%、症候性感染例の 60~90% に難聴を含む神経学的異常が見られ、先天性サイトメガロウイルス感染は先天性難聴の原因の 15~20% を占める^{14,15)}。このウイルス感染による聴覚路の障害は末梢内耳から大脳皮質にいたるまで非常に多様であり、内耳障害に高次脳機能障害が合併する場合もある。われわれが先天性 CMV 感染による高度難聴で手術、経過観察している人工内耳装用小児 11 例のうち、難聴以外の神経学的異常を認めなかったものは 2 例のみで、残りの 9 名のうち 1 名が ADHD (注意欠陥・多動性障害)、2 名が PDD (広汎性発達障害)、6 名が精神遅滞を有していた。このうち ADHD や精神遅滞例では、人工内耳術後に、おのおの認知発達レベルに応じた言語発達が見られたが、PDD 合併例では人工内耳で音の有無や環境音の認知は得られたものの言語発達は停滞した (図 5)¹⁶⁾。広汎性発達障害を有する人工内耳適応小児では、術前に広汎性発達障害の診断と説明を受けたほうが、術後に診断されたケースに比べて、人工内耳に対する目標が設定しやすく過度な期待につながらないため術後の満足も大きいとされる¹⁷⁾。われわれも、患児家族にあらかじめ広汎性発達障害と人工内耳に関する情報を提供し、各症例に合った人工内耳装用の目標について時間をかけて話し合っている。適切な目標を設定して十分な説明を行えば、広汎性発達障害をもつ高度難聴児も人工内耳埋め込み術の適応となりうる¹⁸⁾。

文 献

- 1) Fujiki N, Naito Y, Nagamine T, et al: Influence of unilateral deafness on auditory evoked magnetic field. *Neuroreport*, 9: 3129-3133, 1998.
- 2) Morita T, Naito Y, Nagamine T, et al: Enhanced activation of the auditory cortex in patients with inner-ear hearing impairment: An MEG study. *Clin Neurophysiol*, 114: 851-859, 2003.
- 3) Morita T, Hiraumi H, Fujiki N, et al: A recovery from enhancement of activation in auditory cortex of patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Neurosci Res*, 58: 6-11, 2007.
- 4) Langers DRM, Dijk P, Schoenmaker ES, et al: fMRI activation in relation to sound intensity and loudness.

- Neuroimage, 35: 709-718, 2007.
- 5) Tateya I, Naito Y, Hirano S, et al: Inner ear hearing loss modulates ipsi-lateral temporal lobe activation by monaural speech stimuli. *Neuroreport*, 14: 763-767, 2003.
- 6) Naito Y, Okazawa H and Honjo I: Cortical activation with sound stimulation in cochlear implant users demonstrated by positron emission tomography. *Cognitive Brain Res*, 2: 207-214, 1995.
- 7) Naito Y, Tateya I and Fujiki N: Increased cortical activation during hearing of speech in cochlear implant users. *Hear Res*, 143: 139-146, 2000.
- 8) Roland PE: Language (Chapter 9). *Brain Activation* (edited by Roland PE), Wiley-Liss, New York, pp 269-290, 1993.
- 9) McGurk H and MacDonald J: Hearing lips and seeing voices. *Nature*, 264: 746-748, 1976.
- 10) Nath AR and Beauchamp MS: A neural basis for interindividual differences in the McGurk effect, a multisensory speech illusion. *Neuroimage*, 59: 781-787, 2012.
- 11) Rouger J, Fraysse B, Deguine O, et al: McGurk effects in cochlear-implanted deaf subjects. *Brain Res*, 1188: 87-99, 2008.
- 12) Fujiwara K, Naito Y, Senda M, et al: Brain metabolism of children with profound deafness: a visual language activation study by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Acta Otolaryngol*, 128: 393-397, 2008.
- 13) 内藤 泰: 人工内耳と高次脳機能. *コミュニケーション障害学*, 27: 189-194, 2010.
- 14) Grosse SD, Ross DS and Dollard SC: Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. *J Clin Virol*, 41: 57-62, 2008.
- 15) Orlikowsky TW: Clinical outcomes: acute symptoms and sleeping hazards. *Congenital Cytomegalovirus Infection: Epidemiology, Diagnosis, Therapy* (edited by Halwachs-Baumann G), Springer, New York, pp 91-105, 2011.
- 16) Yamazaki H, Yamamoto R, Moroto S, et al: Cochlear implantation in children with congenital cytomegalovirus infection accompanied by psycho-neurological disorders. *Acta Otolaryngol*, 132: 420-427, 2012.
- 17) Donaldson AI, Heavner KS and Zwolan TA: Measuring progress in children with autism spectrum disorder who have cochlear implant. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 130: 666-671, 2004.
- 18) 真鍋朋子, 東田 海, 内藤 泰, 他: 広汎性発達障害児の人工内耳. *Audiology Japan*, 51: 527-528, 2008.

別刷請求先: 〒650-0047 神戸市中央区港島南町 2 丁目
1-1
神戸市立医療センター中央市民病院
耳鼻咽喉科
内藤 泰



人工内耳と高次脳機能

神戸市立医療センター中央市民病院耳鼻咽喉科

内藤 泰

はじめに

例えば脳血管障害の運動麻痺は明瞭な所見であるが、併存する失語や記憶障害、遂行機能障害などは外から見えにくく患者の社会復帰で大きな問題となり¹⁾、まとめて「高次脳機能障害」と呼称される。高次脳機能は単純な運動や感覚機能ではなく、知覚・注意・学習・記憶・概念形成・推論・判断・言語・意欲など、感覚入力や記憶に基づいて適切な行動を計画し、実行する脳の働きを指し、主に大脳の連合野とその相互ネットワークがこれを司る。難聴についても、その影響は言語、記憶、思考などの高次機能に及ぶので、疾患の全体像を把握するためには末梢障害だけでなく高次脳機能の観点からの評価も欠かせない。

1. 高度難聴・人工内耳が高次脳機能に及ぼす影響

(1) 人工内耳使用による高次脳機能の可塑的变化

言語習得後失聴者が人工内耳を使って語音を認知する時の皮質活動をPET(positron emission tomography)で観察すると、上側頭回、上側頭溝および中側頭回、ブローカ野、補足運動野、前帯状回の賦活が健常聴力者より有意に高い²⁾。これは、人工内耳で符号化された信号をもとに語音認知を達成するためには、聴覚連合野の広い領域で多量の情報処理が行われると同時に、言語表出に関与する前頭葉の領域も活用されていると解釈できる。特に、聴覚野とウェルニッケ野、ブローカ野、補足運動野の間には解剖学的線維連絡があり(図1)、Roland³⁾はこれらの領域が協同して、入力されたあいまいな言語信号を一旦保持し、複数の候補と照合して最も適切な認知にいたる言語のワーキングメモリを形成しているのではないかと仮説を示している。単純な聴覚認知であれば図1の聴覚入力から上側頭回までの経路で事足りるが、弁別困難な音声入力を適正に認知するためには複数の脳領域を結ぶ高次脳機能ネットワークが必要となるのである。

(2) 聴覚情報処理への視覚の介入

視覚入力が音声認知に介入する例の一つに有名な

McGurk効果(例えば「バ」という声に合わせて「ガ」と発声している顔(口の動き)の画像を見ると「ダ」と知覚される現象)がある。話者の顔を見ながら声を聴く場合、聴覚野、視覚野、上側頭溝、ブローカ野などが活動するが、このうち左半球の上側頭溝でMcGurk刺激により有意の賦活亢進が生じるとの報告がある⁴⁾。McGurk効果を生じやすい個人は聴覚言語と視覚言語の統合についてより寛容な神経機構を有しており、これによって認知の正確性を若干犠牲にしながら困難な聴取状況(例えば強い騒音下など)での語音認知の向上を図っているのではないかと推測される。この「寛容な」音声言語・視覚言語統合を行うのが上側頭溝ということになるが、われわれが人工内耳使用者で観察した広範な聴覚連合野賦活増加領域は上側頭溝・中側頭回を含んでおり²⁾、これが人工内耳による言語聴取で頻繁に必要な聴覚・視覚統合の機能亢進を反映しているのかも知れない。

高度難聴小児においてFDG-PETで視覚的言語刺激を課して脳代謝を計測すると、視覚情報処理の背側経路に

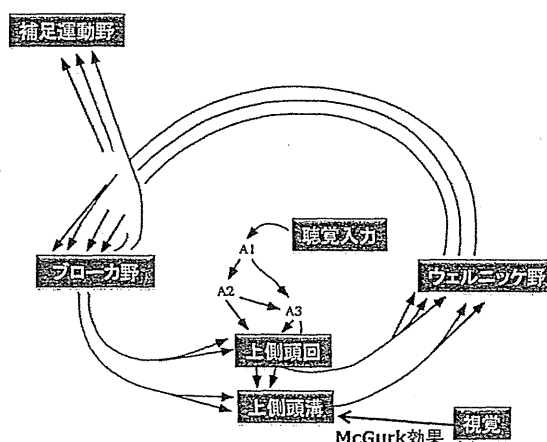


図1 言語の表出と認知を連絡する神経機構
聴覚野(A1-3, 上側頭回), 上側頭溝, ウェルニッケ野, ブローカ野, 補足運動野のネットワークによる言語のワーキングメモリ(文献2)より改変して引用)。

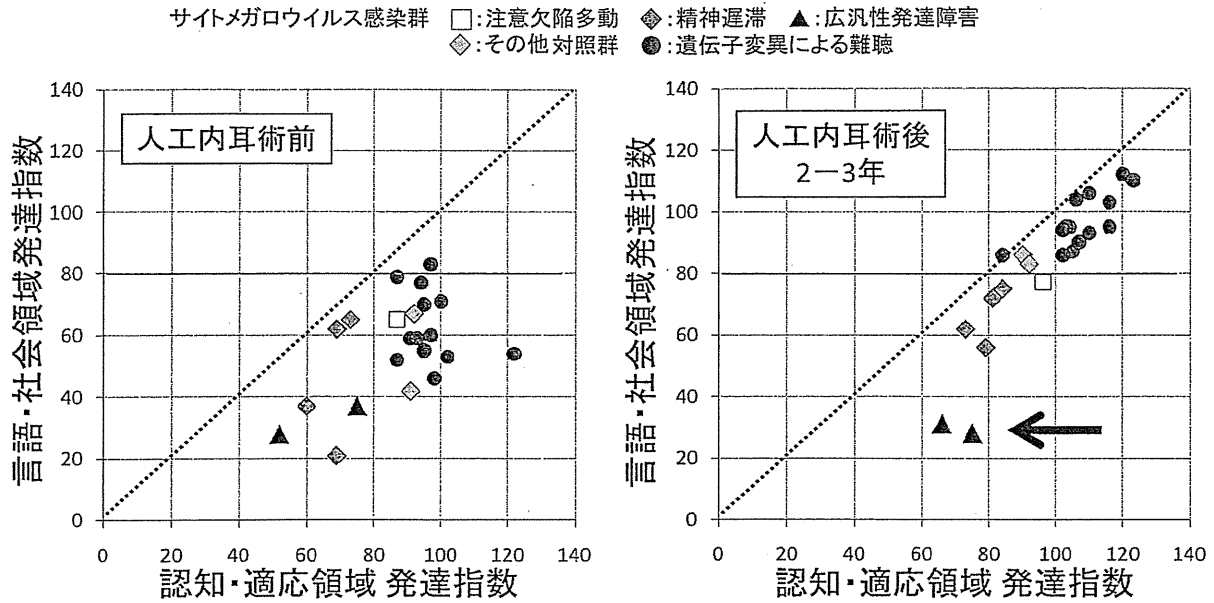


図2 先天性 CMV 感染高度難聴児の人工内耳による言語発達
 広汎性発達障害例 (図中の三角) では術後も言語・社会領域の発達が見られない (矢印) (文献6)より引用

加えて本来なら聴覚連合野である上側頭回も賦活される⁵⁾。これは、聴覚障害によって側頭連合野が視覚野として機能するという、感覚の種類を越えた可塑性(cross-modal plasticity)を直接的に示す所見である。

2. 高次脳機能障害が人工内耳の効果に及ぼす影響
 —先天性サイトメガロウイルス感染

先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染は先天性難聴の15から20%を占めるが、その聴覚障害は末梢内耳から大脳皮質に至るまで多様である。われわれが先天性CMV感染による高度難聴で手術、経過観察している人工内耳装用小児11例のうち、難聴以外の神経学的異常を認めなかったものは2例のみで、残り9名のうち1名がADHD (注意欠陥・多動性障害)、2名がPDD (広汎性発達障害)、6名が精神遅滞を有していた。このうちADHDや精神遅滞例では、人工内耳術後に各々の認知発達レベル相応の言語発達が見られたが、PDD合併例では音の有無や環境音の認知は可能で一定の効果は得られるが言語発達は停滞している (図2)⁶⁾。このように高次脳機能障害は人工内耳による言語習得に大きな影響を与える⁷⁾ので、事前の詳しい評価と十分な説明が大切である。

参考文献

- 1) 武田克彦, 波多野和夫: 高次脳機能障害—その概念と画像診断. 中外医学社; 2006.
- 2) Naito Y, Tateya I, Fujiki N: Increased cortical activation during hearing of speech in cochlear implant users. *Hear Res* 2000; 143: 139-146.
- 3) Roland PE: Chapter 9 Language. *Brain activation*, Roland PE (ed), Wiley-Liss; 1993: pp 269-290.
- 4) Nath AR, Beauchamp MS: A neural basis for interindividual differences in the McGurk effect, a multisensory speech illusion. *Neuroimage* 2012; 59: 781-787.
- 5) Fujiwara K, Naito Y, Senda M, et al: Brain metabolism of children with profound deafness: a visual language activation study by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Acta Otolaryngol* 2008; 128: 393-397.
- 6) Yamazaki H, Yamamoto R, Moroto S, et al: Cochlear implantation in children with congenital cytomegalovirus infection accompanied by psycho-neurological disorders. *Acta Otolaryngol* 2012 (in press).
- 7) 内藤 泰: 補聴と高次脳機能. 音声言語医学 (印刷中).

連絡先 〒650-0047 神戸市中央区港島南町2丁目1-1
 神戸市立医療センター中央市民病院耳鼻咽喉科
 内藤 泰

高度難聴者における皮質言語機構の再編成

内 藤 泰

Functional Reorganization of Cortical Language Networks in Individuals with Profound Deafness

Yasushi Naito

(Kobe City Medical Center General Hospital)

First, we compared cortical activation by speech in postlingually deafened cochlear implant (CI) users with that in normal hearing subjects using positron emission tomography (PET). Increased activation was observed in CI users not only in the temporal cortices but also in Broca's area and its right hemisphere homologue, supplementary motor area (SMA) and anterior cingulate gyrus. These regions are thought to be establishing working memory for language decoding and encoding, enabling the brain to maintain an internal copy of the original auditory message, which might be activated more in CI users than in normal subjects. Next, we used 18F-fluorodeoxyglucose (FDG)-PET to measure the cortical glucose metabolism in profoundly deaf children with visual language stimuli and observed significantly higher cortical metabolism in the pre-central gyrus, middle temporal gyrus in the right hemisphere, and superior temporal gyrus and superior parietal lobule. Individual analysis revealed a strong cortical activation in a child who was the worst user of spoken language, while there was no significant increase in the overall cortical metabolism in the child who was the best user of spoken language. Our recent study also revealed a correlation between the functional reorganization pattern of language networks and the genetic cause of deafness in profoundly deaf individuals. Our results confirmed that the temporal auditory cortices of deaf children develop to process visual aspects of language if they do not receive sufficient auditory signals and depends on visual cues. FDG-PET with a visual language task provided objective information on the development and plasticity of cortical language networks. Functional brain imaging may be of help for both the parents of hearing-impaired children and the professionals involved in their habilitation and education decide upon the appropriate mode of communication for each child.

Keywords : language, cochlear implant, PET, plasticity, communication

はじめに

感音難聴では音が聴覚路の神経活動に変換される過程が傷害され、聴皮質に入力される音信号の減少や歪みによって語音認知の低下をきたす。難聴がさらに高度になれば手話や書字などの視覚情報への依存が強くなるが、これが小児で生下時から学童期まで音声言語を聴取する機会がなければ、聴皮質は視覚情報処理を行う方向に機能分化してしまい、仮に成人になってから人工内耳で音声を入力しても、「音」や「言葉」を聴取することはできない。このように感音難聴の臨床では、内耳で異常にコー

ドされた音信号が聴皮質でどのように処理されるか、さらに視覚など他の感覚の皮質処理との競合など、聴覚の中枢処理についての理解が重要である¹⁾。本稿では難聴者の脳機能、とくに高度難聴者の大脳皮質における聴覚と視覚情報処理の拮抗的關係について、主に PET (positron emission tomography) による脳機能画像で得られた知見を、われわれの研究結果を中心に概説する。なお、本稿で示した諸研究はヘルシンキ宣言を遵守し、おのおのの所属機関(神戸市立医療センター中央市民病院, 財団法人先端医療振興財団先端医療センター, 京都大学

大学院医学研究科，信州大学医学部）の倫理委員会の承認を得て行われたものである。

中途失聴者の脳機能

聴覚正常で出生して言語を獲得し，成長した後何らかの原因で両側高度難聴となった中途失聴者が人工内耳で聴覚入力を再獲得すると，日常会話ではほぼ不自由しない程度の良いな語音弁別が可能になる。言語習得後失聴者の聴覚連合野は語音刺激で強く賦活される^{2)~4)}が，言語習得後失聴の人工内耳装用者と健聴者の言語聴取時の脳活動を詳しく比較すると，両者には一致しない部分がある。言語習得後失聴者の画像から健聴者のものを差し引くと，人工内耳装用者では両側の上および中側頭回，ブローカ野（左半球），右半球のブローカ野相当部分，補足運動野，前帯状回において語音認知の際の賦活が有意に強い（図1）⁵⁾。これは人工内耳で符号化された，通常より情報量が少なくかつ歪みのある信号をもとに語音認知を行うためには，側頭葉の聴覚連合野でより多くの情報処理が行われると同時に，通常の語音認知ではあまり用いない前頭葉の主として言語の表出に関与する言語領域も活用していると解釈できる。とくに，聴覚連合野（ウェルニッケ野）と前頭葉のブローカ野，ブローカ野と補足運動野の間には解剖学的に線維連絡があり，入力さ

れたあいまいな言語信号をいったん保持し，多くの候補の中から前後関係や文脈に照合してもっとも適切な認知にいたる言語性のワーキングメモリ（図2）⁶⁾を形成しているのではないかと推察している⁵⁾。

先天性高度難聴小児の脳機能検査

一方，先天性あるいは言語を習得する前の乳児期に聴力を失った小児が成長してから人工内耳手術を受けてこれを使い始めても基本的に音声言語を母語とするようにはならず，手話や読話など視覚的な言語を主に用いるようになる。言語習得前失聴者が人工内耳を介して日常会話の言語音を聞いている時の脳血流を計測すると，聴覚連合野の活動がきわめて乏しい事が観察される⁴⁾。たとえば8歳で手術を行った言語習得前失聴小児例では，術後7年の時点でも側頭葉の語音による賦活はきわめて低かった。この小児は人工内耳からの音入力に頼らず読話を多用していたが，PET検査で話者の顔をビデオで呈示すると側頭葉の著明な賦活が観察された（図3）。すなわち，この小児では，健聴者では聴覚情報処理を行う上側頭回が視覚言語処理を行う方向に発達したと考えられる⁷⁾。一方，特定の課題を負荷しない安静時の脳の糖代謝をFDG（fluorodeoxyglucose）-PETを用いて先天性高度難聴児で観察したLeeら⁸⁾の報告を見ると，低年齢小

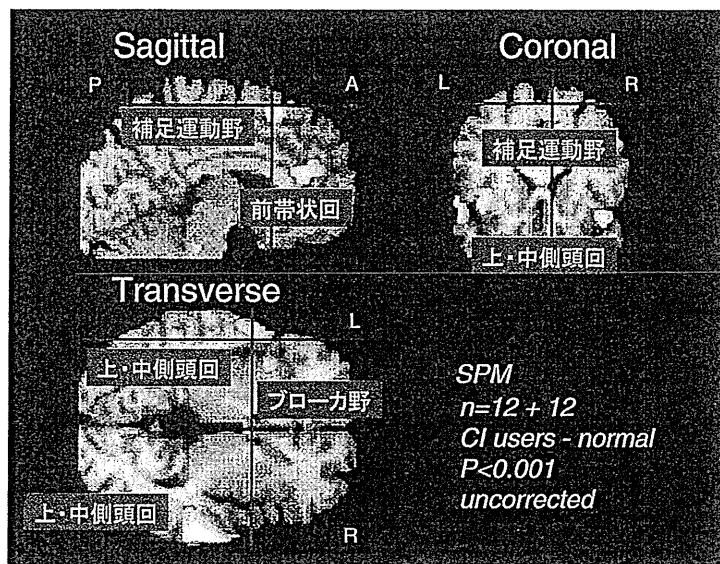


図1 語音聴取時に言語習得語失聴の人工内耳装用者において健聴者より脳賦活が強い領域

人工内耳装用者では両側の上および中側頭回，ブローカ野（左半球），右半球のブローカ野相当部分，補足運動野，前帯状回において語音認知の際の脳賦活が有意に強い。

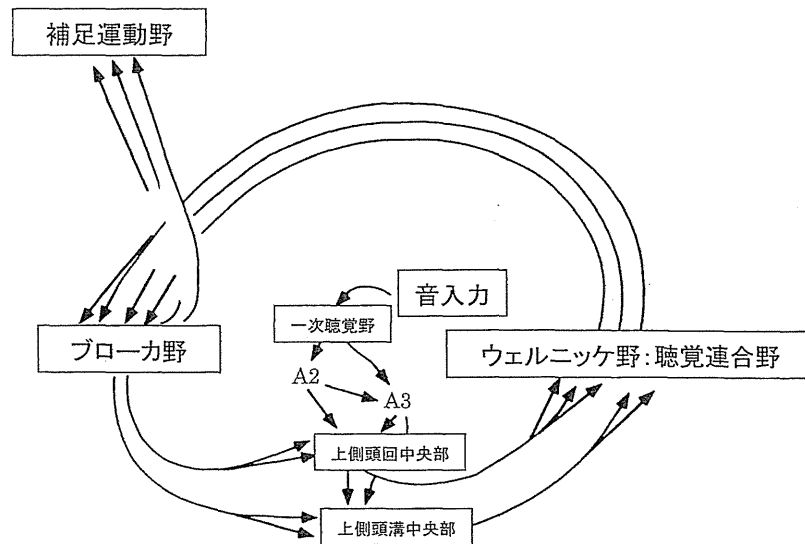


図2 言語の認知と表出を行う領域間を連絡する神経回路

聴覚連合野（ウェルニッケ野）と前頭葉のブローカ野，ブローカ野と補足運動野の間には解剖学的に線維連絡があり，入力されたあいまいな言語信号をいったん保持し，多くの候補の中から前後関係や文脈に照合してもっとも適切な認知にいたる言語性のワーキングメモリを形成しているのではないかと推察される（文献6より改変して引用）。

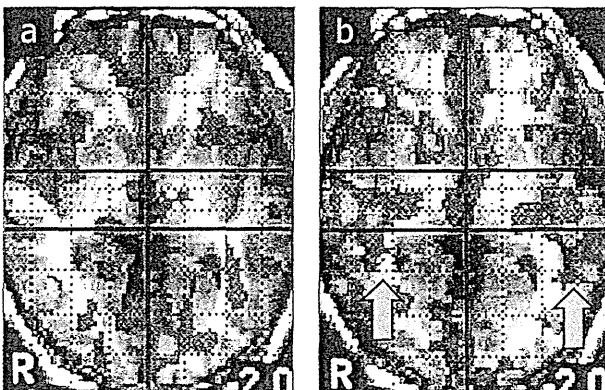


図3 先天性高度難聴児における視覚言語刺激による側頭葉の賦活

患児は8歳時に人工内耳埋め込み術を受けたが，術後7年の時点でも音声言語認知は不良で，人工内耳を介して音声を入力しても側頭葉の血流は増加しなかった（a）が，話者の顔のビデオを見ると上側頭回の血流が著明に増加した（b：矢印）。

児では側頭葉の広い範囲で通常より有意に代謝の低い領域が観察されたが，年齢が高くなるにつれて低代謝領域が小さくなり，20歳前後ではほとんどなくなり，しかも，この低代謝領域が広いほど人工内耳の効果が高い。この論文では，年齢が高くなると音が聞こえないのに聴覚連合野の活動が高くなる理由は解明されていないが，われ

われは，おそらく感覚の種類を超えた可塑性（cross-modal plasticity）によって聴覚連合野で視覚情報処理が行われているためであろうと推測している。しかし，ただ「安静」と指示するだけの条件ではFDG静注後に脳がどのような情報処理をしていたかを判断することはできない。

高度難聴小児における視覚と聴覚の拮抗

FDGを静脈注射すると，投与から40分程度の間を生体内の糖代謝が盛んな細胞にFDGがトラップされてそこに留まる。脳においても，FDGの細胞内への取り込み期間中に特定の課題を負荷すると，その処理にかかわる領域にFDGが集積するので，これを脳賦活検査に用いる事もできる。この方法であれば課題負荷が脳スキャンに先行するので，低年齢小児でも覚醒した状態で言語関連課題を負荷した後に全身麻酔を施行することで安定した脳スキャンができる。われわれが幼小児の脳賦活検査にFDG-PETを用いるのは，このような理由による⁹⁾。

高度難聴小児の言語習得方法については，音声言語を使わずに手話を母語とする方針から，聴覚と音声のみを用いる方法まで幅広い選択肢があり，難聴児とその家族は往々にしてどの方向がその児に適するのかが判断に窮する。そこでわれわれは，高度難聴小児においてFDG-PET

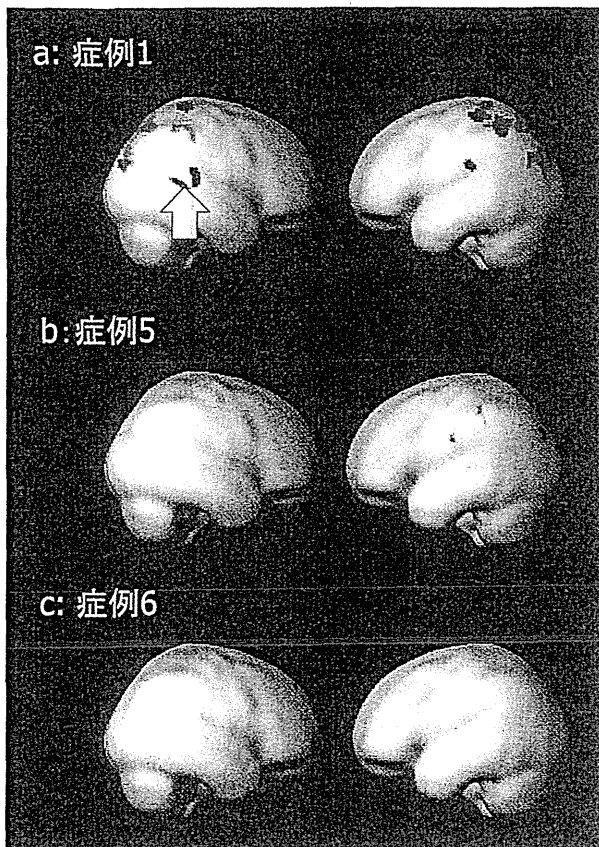


図4 個々の難聴小児における視覚的言語課題負荷時の代謝亢進部位

聴覚と音声言語の活用が進むと過剰な脳活動が減少する。聴覚活用の程度が相対的に低い例 (a: 症例 1) では読話による聴覚連合野の有意な賦活がみられるが、聴覚活用の程度が進んだ例 (b: 症例 5) では聴覚連合野の視覚賦活がなくなっており、高度難聴があっても十分な聴覚活用ができる例 (c: 症例 6) では読話による脳賦活で健聴成人との間に有意な差がなくなっていた (文献 19 より改変して引用)。

で視覚的言語刺激時の脳代謝を分析することで言語発達期における聴覚と視覚の相互関係について検討した。視覚言語刺激 (話者の顔のビデオ画像を無音にしたもの) の結果、難聴小児群で右中心前回 (Brodmann Area: BA4), 右中心後回 (BA3/1/2), 左上および下頭頂小葉 (BA7, 40), 左右の上側頭回 (BA22, 42; 聴覚連合野), 右中側頭回 (BA21; 聴覚連合野) において、健聴成人より高い賦活が認められ、視覚情報処理の背側経路 (上, 下頭頂小葉) に加えて聴覚連合野である上および中側頭回が賦活されることが判明した⁹⁾。言語習得前失聴小児では聴覚情報入力少なく、外部からの聴覚情報入力がないと、

側頭連合野でも相対的に視覚処理が優位になると推測される。

高度難聴小児では上記のような代謝亢進だけでなく、海馬傍回で健聴成人に比して有意に代謝が低下していることが観察された。側頭葉内側領域の海馬、海馬傍回は聴覚連合野との線維連絡がある¹⁰⁾ とともに、記憶、学習、言語の意味処理などに重要な役割を果たしており^{11)~13)}、高度難聴児においてこの領域の活動が低いことは、難聴が記憶や言語学習に何らかの障害となっている可能性を示す所見と考える。

読話の視覚刺激効果を個々の難聴小児で分析すると⁹⁾、聴覚活用の程度が相対的に低い例 (図 4a, 症例 1) ではいわゆる聴覚連合野に相当する上および中側頭回の読話による有意な賦活がみられ、側頭連合野が視覚的情報処理を行う方向に分化していることが見て取れる。一方、聴覚活用の程度が進んだ例では、そうでない例に比して代謝の亢進部分が減少して左半球優位となり、聴覚連合野の視覚賦活がなくなっており (図 4b, 症例 5)、さらに、高度難聴があっても十分な聴覚活用ができる例では読話による脳賦活で健聴成人との間に有意差がなくなっていた (図 4c, 症例 6)。これらの結果は、側頭葉の聴覚連合野の機能は生後に使用する言語の種類に応じて分化し、聴覚と音声言語を使用しないと視覚情報処理、それらを使用すれば聴覚情報処理を主に行う領域として分化することを示唆する。

また、Moteki ら¹⁴⁾ は同程度の高度難聴を呈するが異なる遺伝子変異、すなわち *GJB2* および *SLC26A4* 変異に起因する成人高度難聴症例で同様の視覚課題を負荷する FDG-PET 検査を行い、前者で上側頭回の有意な賦活を観察した (図 5)。これは、この 2 者を比べると *GJB2* 変異症例の方が現在までの聴覚活用が不十分で、聴覚連合野で視覚情報処理が行われるようになっていることを示している。高度難聴においては、遺伝子変異を検査することでその病因を確定することができるが、同じ遺伝子変異でもその難聴程度には一定のばらつきがあり、また生後の聴覚活用の状況や療育方針の選択もその後の音声あるいは視覚的言語習得に大きな影響を及ぼす。脳機能画像で側頭連合野の機能分化を評価することは、遺伝子変異の検索だけでは把握できない大脳皮質の言語ネットワークの機能的病態を把握するうえで有用な情報を提供する。

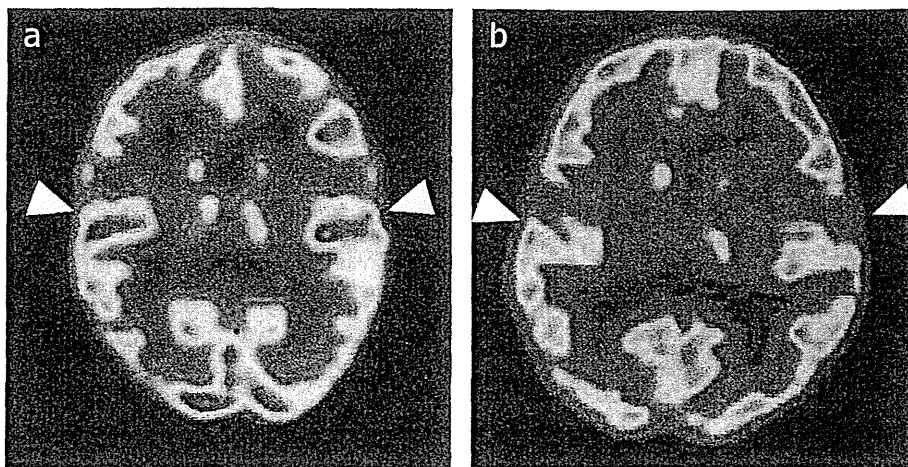


図5 異なる遺伝子変異に起因する高度難聴成人症例の視覚言語負荷による側頭葉賦活

GJB2 (a) および *SLC26A4* (b) 変異に起因する成人高度難聴症例で視覚課題を負荷する FDG-PET 検査を行うと、*GJB2* 変異例で上側頭回の強い賦活 (a: 矢頭) を観察した (文献 14 より改変して引用)。

まとめ

FDG-PET を用いることで、難聴小児の言語ネットワークにおける視覚と聴覚の相互関係を画像として観察、評価することができ、彼らの治療や教育の方向性を考える新たな情報が得られるものと期待される。

謝辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金基盤研究 C (課題番号 22591894) の援助を受けて行われた。また、本研究の要旨は第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会サテライトシンポジウム New Trends in Hearing Implant Science—EAS and VSB Workshop in Hakuba—で発表された。

参考文献

- 1) 内藤 泰：難聴者の脳機能。神経内科 68: 456-462, 2008.
- 2) Naito Y, Okazawa H, Honjo I, et al. : Cortical activation with sound stimulation in cochlear implant users demonstrated by positron emission tomography. Brain Res Cogn Brain Res 2: 207-214, 1995.
- 3) Okazawa H, Naito Y, Yonekura Y, et al. : Cochlear implant efficacy in pre- and postlingually deaf subjects. A study with $H_2^{15}O$ and PET. Brain 119: 1297-1306, 1996.
- 4) Naito Y, Hirano S, Honjo I, et al. : Sound-induced activation of auditory cortices in cochlear implant users with post- and prelingual deafness demonstrated by positron emission tomography. Acta Otolaryngol (Stockh) 117: 490-496, 1997.
- 5) Naito Y, Tateya I, Fujiki N, et al. : Increased cortical activation during hearing of speech in cochlear implant users. Hear Res 143: 139-146, 2000.
- 6) Roland PE : Language (Chapter 9). Brain activation. pp 269-290, Wiley-Liss, New York, 1993.
- 7) Naito Y, Hirano S, Fujiki N, et al. : Development and plasticity of the auditory cortex in cochlear implant users: a follow-up study by PET. Adv Otorhinolaryngol (Basel) 57: 55-59, 2000.
- 8) Lee DS, Lee JS, Oh SH, et al. : Cross-modal plasticity and cochlear implants. Nature 409: 149-150, 2001.
- 9) Fujiwara K, Naito Y, Senda M, et al. : Brain metabolism of children with profound deafness: a visual language activation study by $18F$ -fluorodeoxyglucose positron emission tomography. Acta Otolaryngol 128: 393-397, 2008.
- 10) Tranel D, Brady DR, Van Hoesen GW, et al. : Parahippocampal projections to posterior auditory association cortex (area Tpt) in Old-World monkeys. Exp Brain Res 70: 406-416, 1988.
- 11) DeJong RN : The hippocampus and its role in memory. Clinical manifestations and theoretical considerations. J Neurol Sci 19: 73-83, 1973.
- 12) Barrash J, Damasio H, Adolphs R, et al. : The neuroanatomical correlates of route learning impairment. Neuropsychologia 38: 820-836, 2000.
- 13) Bartha L, Brenneis C, Schocke M, et al. : Medial temporal lobe activation during semantic language processing: fMRI findings in healthy left- and right-handers. Brain Res Cogn Brain Res 17: 339-346, 2003.
- 14) Moteki H, Naito Y, Fujiwara K, et al. : Different cortical metabolic activation by visual stimuli possibly due to different time courses of hearing loss in patients with *GJB2* and *SLC26A4* mutations. Acta Otolaryngol 131: 1232-1236, 2011.

別刷請求先：内藤 泰
〒650-0047 神戸市中央区港島南町2-1-1
神戸市立医療センター中央市民病院耳鼻咽喉科



Yasushi Naito

Kobe City Medical Center General Hospital



Research Report

Ras/p38 and PI3K/Akt but not Mek/Erk signaling mediate BDNF-induced neurite formation on neonatal cochlear spiral ganglion explants

Lina M. Mullen^b, Kwang K. Pak^a, Eduardo Chavez^b, Kenji Kondo^b,
Yves Brand^{b, d, 1}, Allen F. Ryan^{a, b, c, *, 1}

^aSan Diego VA Medical Center, 3350 La Jolla Village Drive, San Diego, CA 92161USA

^bSurgery/Otolaryngology, UCSD School of Medicine, 9500 Gilman Drive MC0666, La Jolla, CA 92093, USA

^cNeurosciences, UCSD School of Medicine, 9500 Gilman Drive MC0666, La Jolla, CA 92093, USA

^dDepartment of Biomedicine and Clinic of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, University Hospital Basel, Hebelstrasse 20, 4031 Basel, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 30 October 2011

Available online 6 November 2011

Keywords:

BDNF

Neuritogenesis

Ras/P38

Spiral ganglion

Signal transduction

TrkB receptor

ABSTRACT

Neurotrophins participate in regulating the survival, differentiation, and target innervation of many neurons, mediated by high-affinity Trk and low-affinity p75 receptors. In the cochlea, spiral ganglion (SG) neuron survival is strongly dependent upon neurotrophic input, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which increases the number of neurite outgrowth in neonatal rat SG in vitro. Less is known about signal transduction pathways linking the activation of neurotrophin receptors to SG neuron nuclei. In particular, the p38 and cJUN Kinase (JNK), mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, which participate in JNK signaling in other neurons, have not been studied. We found that inhibition of Ras, p38, phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) or Akt signaling reduced or eliminated BDNF mediated increase in number of neurite outgrowth, while inhibition of Mek/Erk had no influence. Inhibition of Rac/cdc42, which lies upstream of JNK, modestly enhanced BDNF induced formation of neurites. Western blotting implicated p38 and Akt signaling, but not Mek/Erk. The results suggest that the Ras/p38 and PI3K/Akt are the primary pathways by which BDNF promotes its effects. Activation of Rac/cdc42/JNK signaling by BDNF may reduce the formation of neurites. This is in contrast to our previous results on NT-3, in which Mek/Erk signaling was the primary mediator of SG neurite outgrowth in vitro. Our data on BDNF agree with prior results from others that have implicated PI3K/Akt involvement in mediating the effects of BDNF on SG neurons in vitro, including neuronal survival and neurite extension. However, the identification

* Corresponding author at: Neurosciences, UCSD School of Medicine, 9500 Gilman Drive MC0666, La Jolla, CA 92093, USA. Fax: +1 858 534 5319.

E-mail address: afryan@ucsd.edu (A.F. Ryan).

Abbreviations: ANOVA, one-way analysis of variance; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CNS, central nervous system; HC, hair cells; JNK, cJUN Kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NT-3, neurotrophin-3; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; PVDF, polyvinylidene difluoride; SCs, supporting cells; SG, spiral ganglion

¹ Drs. Ryan and Brand contributed equally to the supervision of this work.

of p38 and JNK involvement is entirely novel. The results suggest that neurotrophins can exert opposing effects on SG neurons, the balance of competing signals influencing the generation of neurites. This competition could provide a potential mechanism for the control of neurite number during development.

Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Neurotrophins play a critical role in neural development, regulating differentiation, neurite extension, target innervation and survival (Bibel and Barde, 2000). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) are well known to influence neurons in the inner ear.

In particular, mice deficient in BDNF exhibit reduced cochlear neuronal populations, especially in the apical turn (Bianchi et al., 1996; Ernfors et al., 1994, 1995; Farinas et al., 2001; Fritzsich et al., 1997a, 1997b). We, and others, have noted a dramatic effect of BDNF on developing spiral ganglion (SG) neurons in culture. BDNF treatment enhances survival of dissociated SG neurons (Malgrange et al., 1996), dramatically increases neurite number on SG explants (Pirvola et al., 1994) and promotes SG neurons survival *in vivo* (Leake et al., 2011).

Recently, Leake et al. (2011) demonstrated in neonatally deafened kittens and Landry et al. (2011) in adult deafened guinea pigs that chronic BDNF delivery from a miniosmotic pump improved electrically evoked auditory brainstem response thresholds. The authors therefore concluded that BDNF may have potential therapeutic value for the use with cochlear implants in the future. Furthermore, increasing reports are available on the potential therapeutic role of BDNF in a range of central nervous system (CNS) disorders such as amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, peripheral neuropathy, Alzheimer's disease, Huntington's disease and stroke (reviewed by Nagahara and Tuszynski, 2011).

Neurotrophins signal primarily via high-affinity tyrosine kinase receptors in the cochlea, TrkB and TrkC (Pirvola et al., 1994), with some contribution from the low-affinity p75 receptor (Schechterson and Bothwell, 1994). BDNF signaling is mainly mediated via TrkB receptors and TrkB and p75 receptors are expressed by SG neurons throughout the inner ear (Knipper et al., 1996; Pirvola et al., 1994; Sano et al., 2001). Mice null for TrkB are reported to lose 15–20% of SG neurons (Fritzsich et al., 1997a, 1997b). BDNF increases neurite number on SG explants *in vitro* throughout the entire length of the cochlea with no difference in the responses from different cochlear turns (our own unpublished data).

We previously found that Ras or Mek/Erk inhibition blocked NT-3 effects on SG neurites, while p38 inhibition had no effect (Aletsee et al., 2001). Mice with mutations in the docking site for the Shc adaptor protein on the TrkB receptor, which would be expected to reduce both Ras/MAPK and phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) signaling, showed modest reduction in SG neuron survival (Postigo et al., 2002).

To explore BDNF signal transduction in SG neurons, SG explants were treated with BDNF in the presence of specific inhibitors of intracellular signaling pathways involved in TrkB signaling in the inner ear and other neuronal systems,

and activation of signaling proteins was assessed by Western blotting.

2. Results

2.1. BDNF increases SG neurite number but not length

Consistent with previous studies (Hartnick et al., 1996; Hegarty et al., 1997), treatment of neonatal SG explants with BDNF resulted in a significant increase ($p < 0.05$) in the number of SG neurites present on each explant (Figs. 1 and 2). In contrast, and also consistent with prior results (Malgrange et al., 1996), there was no effect of BDNF treatment on the length of SG neurites (Figs. 1 and 3).

2.2. Inhibitors of several signal transduction pathways alter BDNF-induced increases in SG neurite number

The influence of signaling inhibitors on the BDNF-induced increase in neurites on SG explants is illustrated in Figs. 1 and 2. When BDNF treatment occurred in the presence of the pan-G-protein inhibitor GDPβS, there was no significant influence ($p > 0.06$). In contrast, the specific Ras inhibitor FTI-277 virtually eliminated the BDNF-induced increase in SG neurite number at all inhibitor doses ($p < 0.03$). While the MEK/Erk inhibitor UO126 had no effect ($p > 0.08$), the p38 inhibitor SB203580 reduced the BDNF response at all doses ($p < 0.02$). Interestingly, the Rac/cdc42 inhibitor C difficile toxin B significantly increased the BDNF effect on neurite number, but only at the lowest dose employed ($p < 0.04$). The PI₃ kinase inhibitor Wortmannin reduced the BDNF effect, but only at the highest dose employed ($p < 0.0001$). Akt inhibitor II significantly attenuated the BDNF effect at 100 nM ($p < 0.0001$) and 1 nM ($p < 0.01$), but not at 0.1 ($p < 0.08$). The PKA inhibitor KT5720 did not alter BDNF effects on SG neurites. When applied alone at the effective dose, or at the highest dose used when no effect was observed, none of the inhibitors influenced SG neurite number.

2.3. Signal transduction inhibitors influence SG neurite length

As discussed above, BDNF alone did not affect SG neurite length. Nevertheless, some signaling inhibitors in the presence of BDNF significantly altered neurite length (Fig. 3). The Rac/cdc42, G protein, Mek/Erk and Akt inhibitors each decreased SG neurite length at all doses employed ($p < 0.04$). The PI3K inhibitor Wortmannin decreased length at the highest dose ($p < 0.04$). The PKA inhibitor KT5720 increased neurite length at all doses ($p < 0.04$). When explants were

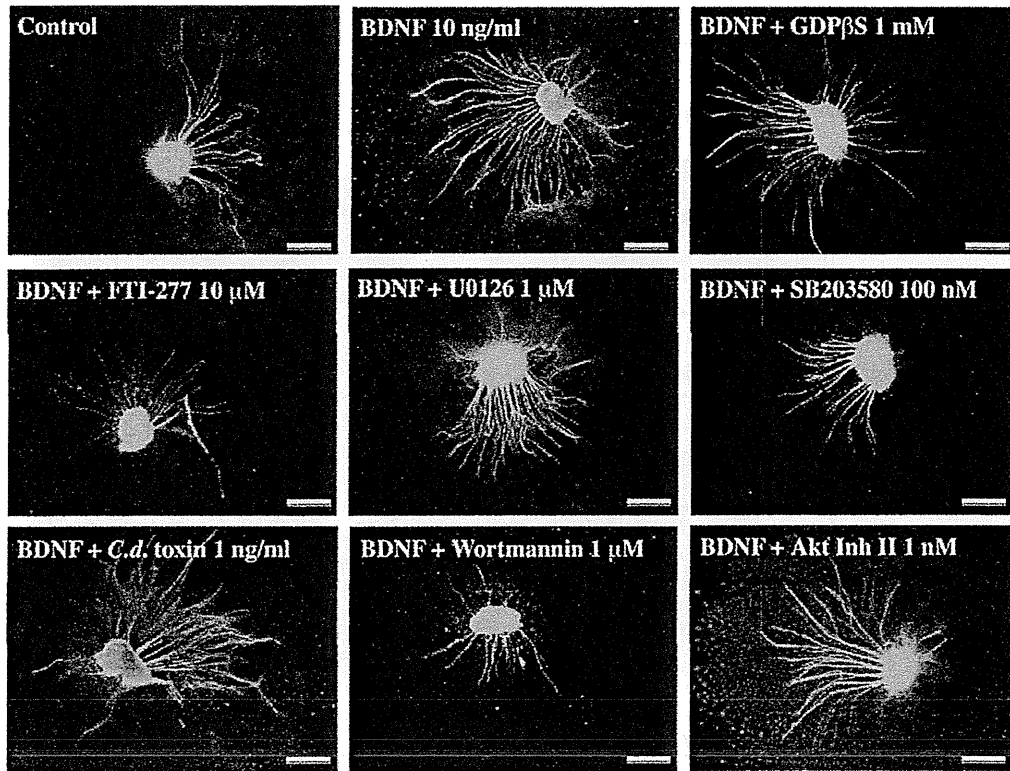


Fig. 1 – Representative SG explants stained with anti-200 kDa neurofilament antibody, for each experimental condition. Scale bar 300 μ m.

exposed to the inhibitors alone, neurite numbers were increased by UO126 at 1000 nM ($p < 0.05$), and decreased by Akt inhibitor II at 1 nM ($p < 0.02$). None of the other inhibitors used affected neurite length when applied alone.

2.4. BDNF increases both SG neuron survival and neurites/neuron

The methods used above could not distinguish whether BDNF-induced increases in the number of neurites on SG explants were due to increased SG neuron survival, neurite branching within the explant, or both. We therefore explored alternate methods, and found that a different fixation and staining regimen combined with clearing allowed visualization of SG somata in explants larger than those used for the studies above. The results of culture and BDNF treatment on SG neuron survival in this model are illustrated in Fig. 4. Freshly dissected SG explants contained an average of 0.466 SG neurons/ μ m of ganglion. Control samples cultured without BDNF for 72 hours showed 0.050 (± 0.010) neurons/ μ m, while explants cultured with BDNF showed 0.131 (± 0.014) neurons/ μ m. Thus, BDNF resulted in a 162% increase in SG neuron survival compared to untreated explants. Of course, no neurites were observed on freshly dissected explants. However, control explants cultured without BDNF for 72 hours showed 0.020 (± 0.006) neurites/ μ m. Thus, neurites extending from the explants represented only 40% of surviving neurons. BDNF resulted in a 520% increase in the number of neurites that extended from

the explant when compared to control explants, representing both increased survival and increased neurites/neuron.

2.5. BDNF activates p38 and Akt in SG

Western blotting revealed specific activation of cell signaling in SGNs by BDNF. Using Actin as an internal control, normalized phospho-38, phospho-Akt and phospho-Erk levels were expressed as % of control. In three replicates, the relative intensity of phospho-p38 and phospho-Akt was increased in BDNF treated tissue compared to tissue in culture media only. In contrast, only a modest not statistically significant increase in activated Erk MAPK was noted (Fig. 5).

3. Discussion

In the current study, we show that Ras/P38 and PI3K/Akt but not Mek/Erk signaling mediate BDNF-induced neurite formation on neonatal cochlear SG explants. In order to assess the signaling pathways mentioned above, we first evaluated the effects of BDNF alone on SG neurites *in vitro*. Then, SG explants were treated with BDNF in the presence of specific inhibitors of the intracellular signaling pathways involved downstream from TrkB signaling. Finally, we confirmed activation of signaling proteins by Western blotting.

The observation that BDNF treatment results in substantially more neurites on SG explants is consistent with increases

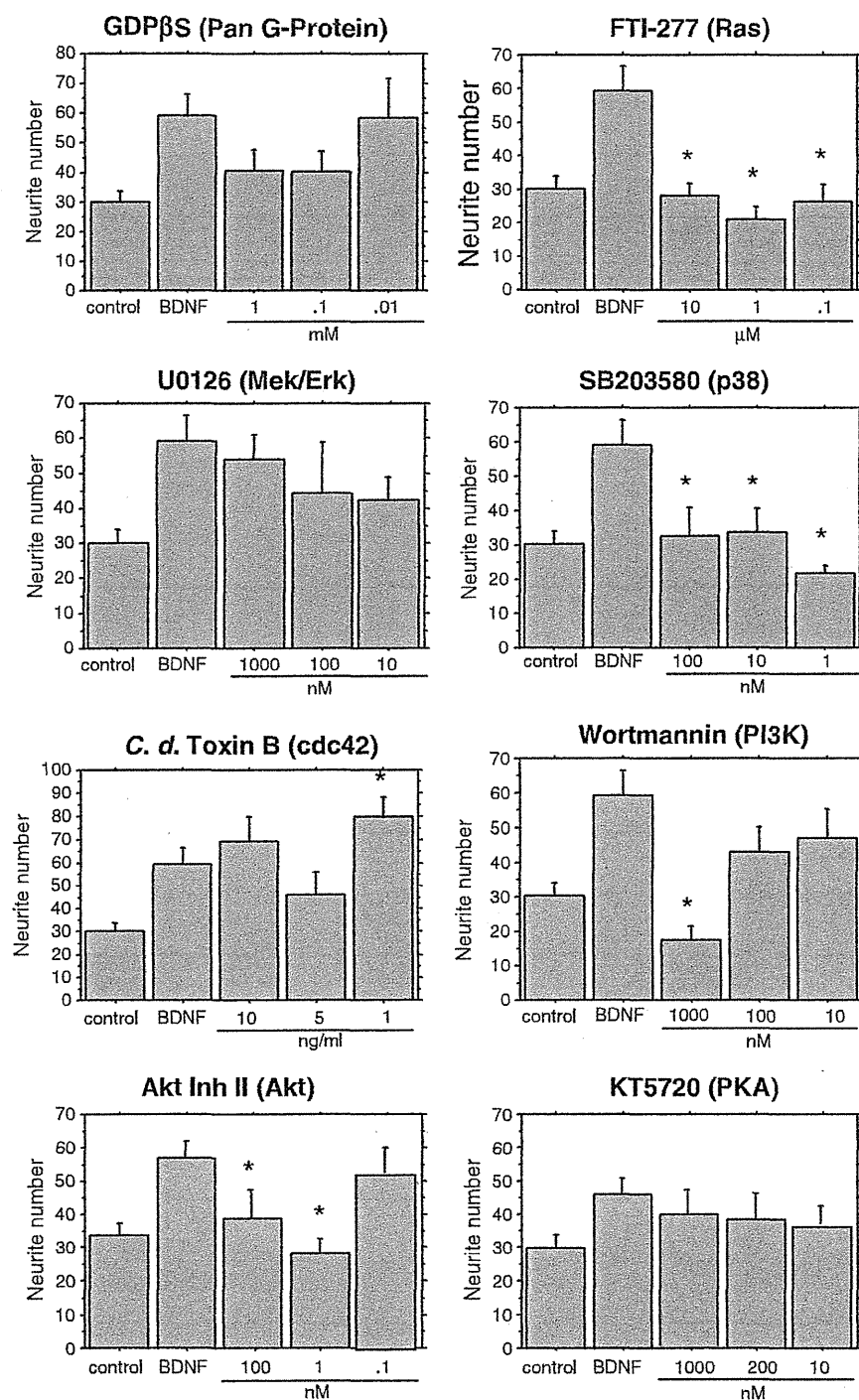


Fig. 2 – Average number of SG neurites observed on SG explants. The number of neurites observed on control and BDNF-treated explants are compared to that seen with three different levels of each signaling inhibitor in addition to BDNF. Lines represent one SEM. BDNF was significantly different from control in all cases. Asterisks denote statistical difference of inhibitor plus BDNF groups from the BDNF-alone group. n = 12 for each experimental condition, except Rac/cdc42 inhibitor *C. difficile* toxin B n = 18.

in neuronal survival that have been observed with dissociated SG neurons (e.g. Hartnick et al., 1996). However, when survival and neurite number were compared directly, we noted an even greater increase in the number of neurites/neuron following BDNF treatment. This was not associated with an obvious branching of the fibers, nor did the number of neurites exceed

one per neuron, indicating that BDNF also increased the production of individual, unbranched neurites on SG neurons. Thus, BDNF appears to be both a survival promoting and neuritogenic factor for SG neurons. The lack of effect of BDNF on neurite length also agrees with several previous studies (Hartnick et al., 1996; Malgrange et al., 1996).

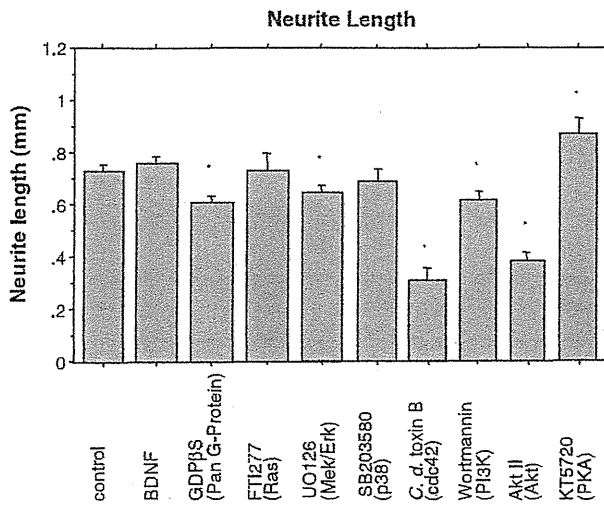


Fig. 3 – The average length of SG neurites observed on SG explants. The length of neurites observed on control and BDNF-treated explants is compared to that seen with signaling inhibitors in addition to BDNF. Lines represent one SEM. Asterisks denote statistical difference of inhibitor plus BDNF groups from the BDNF-alone group. n=12 for each experimental condition, except Rac/cdc42 inhibitor *C. difficile* toxin B n=18. Since BDNF did not alter neurite length, the inhibitors are presumably affecting alternative signaling, perhaps integrin activation by the fibronectin substrate.

It should be noted that we could not distinguish between the dendrites and axons of SG neurons, since we have not found markers that distinguish between the two in explants.

Similarly, we could not distinguish between type I and type II SG neuron neurites, since peripherin labeling does not distinguish these two classes of neurons in the rat in culture, due to up-regulation of peripherin in type I neurons *in vitro* (Lallemend et al., 2007). However, since 95% of SG neurons are type I cells, it seems likely that this class of neuron dominates our results.

Our *in vitro* data on neuronal survival can also be related to *in vivo* observations of the SG. The endogenous expression of BDNF in the cochlea appears to vary during the period under study. At birth, BDNF is seen in rat inner and outer hair cells (HC) and along the length of the cochlea (Pirvola et al., 1992) and is present in the supporting cells (SCs) of the mouse organ of Corti only in the apical turn (Farinas et al., 2001). Wheeler et al. (1994) and Wiechers et al. (1999) reported that BDNF mRNA in HCs declined to background levels by P3–P4. Wiechers et al. (1999) observed BDNF mRNA in SCs and outer HCs at P6–P8, while Ylikoski et al. (1993) noted BDNF mRNA in both inner HCs and outer HCs at P7. Weichers et al. (1999) evaluated the expression of BDNF at the protein level during the first two postnatal weeks in mice, using immunohistochemistry. They found that BDNF is present in inner HCs and outer HCs at P1, and then disappears at P3. However, at P3 BDNF is found in some SG neurons. BDNF then reappears in HCs and SCs at P6, and is observed at high levels in SG neurons. At P10, BDNF is only present in some SCs and in scattered SG neurons. These results suggest that HCs produce BDNF during the first few days after birth, with a decline around P3–P4, but recovery by P6–P7. SG neurons also transiently express BDNF, beginning around P6. Rüttiger et al. (2007) showed that BDNF is not expressed in the organ of Corti, but in the SG in adult gerbils. While there was no change in BDNF expression in the apical turn, a moderate

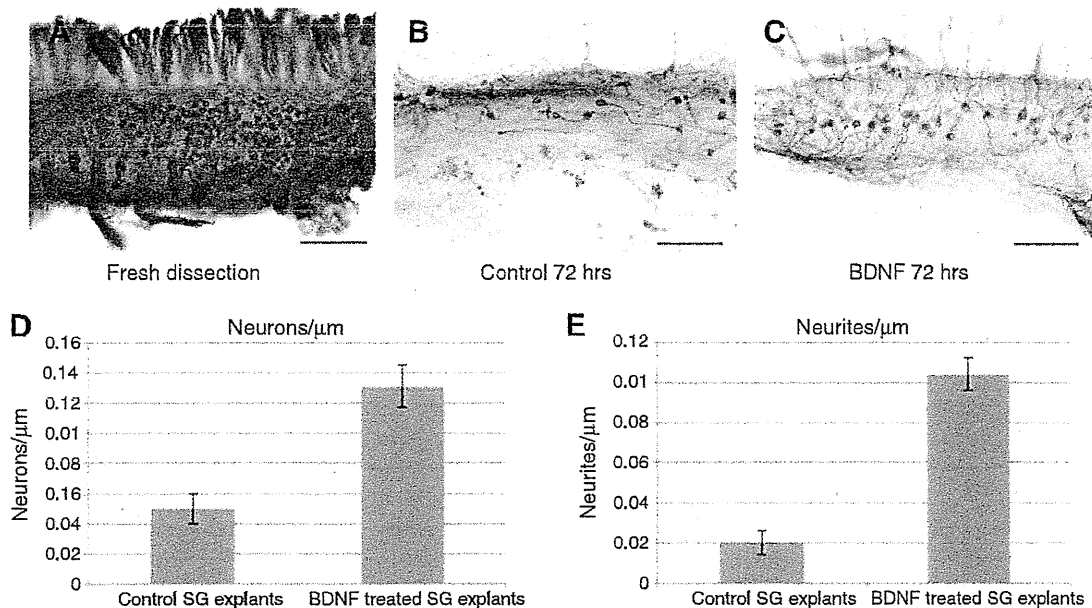


Fig. 4 – Effects of BDNF treatment on neuronal survival and extension of neurites from half-turn SG explants. (A) Explant from a fresh dissection. (B) Explant after 72 hours in culture without BDNF treatment. (C) Explant after 72 hours in culture with BDNF treatment. (D) BDNF resulted in an increased SG neuron survival and (E) increased number of neurites that extended from the explant compared to untreated explants. Scale bar 100 μm. n=12 in each experimental condition. Lines represent one SEM.

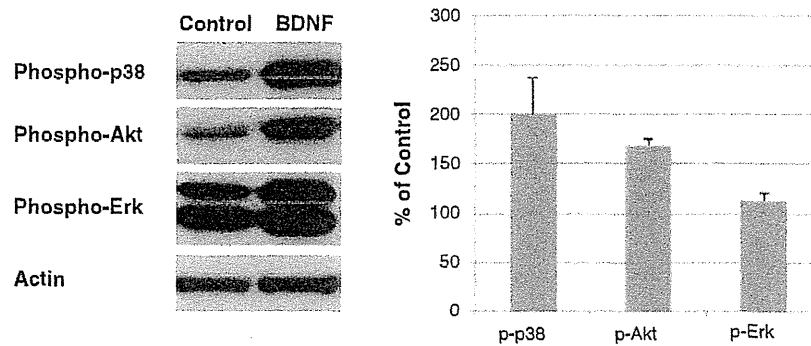


Fig. 5 – Representative Western blots of phosphorylated p38, phosphorylated Akt and phosphorylated Erk. SG explants were exposed either to culture media alone or with 25 ng/ml BDNF. Six whole SG were used per individual blot. Actin was used as an internal control. Phospho-protein levels were determined by densitometry and were normalized against actin. BDNF treated levels are expressed as % of control values. Phospho-p38 and phospho-Akt were significantly increased by BDNF treatment ($p < 0.05$), whereas phospho-Erk levels were not. Bars show the mean \pm one SEM of 3 independent experiments.

decrease in expression was seen in midbasal turns during aging. In contrast, a recent study by Liu et al. (2011) on adult surgical human cochlear specimens showed no expression of BDNF protein either in the organ of Corti or in the SG.

Our data indicate that SG neurons and neurites are highly sensitive to BDNF during the period in which declines in production are observed, around P3–P5. This is in line with electrophysiological experiments on P3–P8 neonatal mouse SG. Adamson et al. (2002) demonstrated that BDNF alters the endogenous membrane properties and channel types in such a way as to generate faster accommodation and kinetics. It can be speculated that Akt and/or p38 signaling may contribute to these effects.

It is possible that early postnatal production of BDNF in the organ of Corti maintains SG neurons and neurites during the period of reorganization of innervation. The decline in production may then induce apoptosis, with those neurons that ultimately survive having successfully innervated HCs, while neurons that fail to synapse on HCs die from lack of trophic support. SG neurons are reported to undergo substantial apoptosis during the first postnatal week in rodents (Echteler and Nofsinger, 2000).

Our signaling results suggest that a number of pathways participate in transmitting the effects of TrkB receptor activation to the nucleus. Our conclusions are summarized in Fig. 6. The strong effects of FTI-277 on neurite number suggest a major role for Ras in mediating the survival- and neuritogenesis-promoting effects of BDNF. The reduction in neurite number was observed at all FTI-277 dosages employed, including the lowest (0.1 μ M). This implies that the effect is mediated at least in part by H-Ras, since other isoforms of Ras such as N- or K-Ras are only inhibited at higher levels (5 and 10 μ M, respectively; Lerner et al., 1995). Also, a combination of p38 MAPK and PI3K-Akt signaling appears to stimulate SG neurites, while the UO126 data suggest that the promotion of SG neurite number by BDNF does not involve the canonical Ras-Mek-Erk MAPK survival pathway. This conclusion is supported by our Western blotting data, which demonstrated strong activation of p38 and Akt, but not Erk, in SG neurons after BDNF treatment. Similarly, in sympathetic

neurons, NGF promotes survival via a Ras-PI3K-Akt pathway rather than Mek-Erk (Vaillant et al., 1999). Other studies have also shown BDNF mediated activation of PI3K-Akt signaling in SG in vitro (Lallemend et al., 2005; Hansen et al., 2001). However, our observation that BDNF does not involve the canonical Ras-Mek-Erk MAPK survival pathway is in contrast to a report by Lallemend et al. (2005) who found that BDNF enhancement of dissociated SG neuron survival was decreased by UO126. Since they used rat SG neurons of a similar age, the difference may be related to dissociation of the ganglion.

The p38 and cJUN kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase (MAPK) families have not yet been investigated in BDNF signal transduction in the SG. Our findings that Ras/p38 promotes BDNF mediated effects on SNG while Rac/cdc42/JNK signaling reduces the BDNF mediated formation of neurites are novel.

While signal transduction pathways that mediate BDNF effects have received little attention in the inner ear, several pathways have been implicated in other neuronal systems. Results from pharmacological studies suggest that both MAPK and PI3K pathways mediate BDNF-induced neurite outgrowth from retinal ganglia (Bonnet et al., 2004), while Erk5 activation is critical to BDNF-promoted survival of developing cortical neurons (Liu et al., 2003). Activation of the PI3K target Akt (also known as protein kinase B), mediates BDNF effects on hippocampal neurons (Lee et al., 2002). It has been shown that p38 and JNK MAPK pathways can also be activated by Trk receptors in the nervous system. While in general they promote apoptosis (Mielke and Herdegen, 2000; Ishikawa et al., 2003), several examples of survival enhancement by these pathways have been documented (Nishina et al., 1997; Du et al., 2004). The p75 receptor can also be involved in BDNF signaling. As a dependence receptor (Mehlen and Bredesen, 2004), p75 requires neurotrophin binding to prevent cleavage of its intracellular domain and release of an apoptosis-promoting fragment. Alternatively, neurotrophin binding to p75 can induce apoptosis. This is thought to be Trk-dependent when a neurotrophin binds to a mismatched Trk in association with p75 (Bredesen and Rabizadeh, 1997).

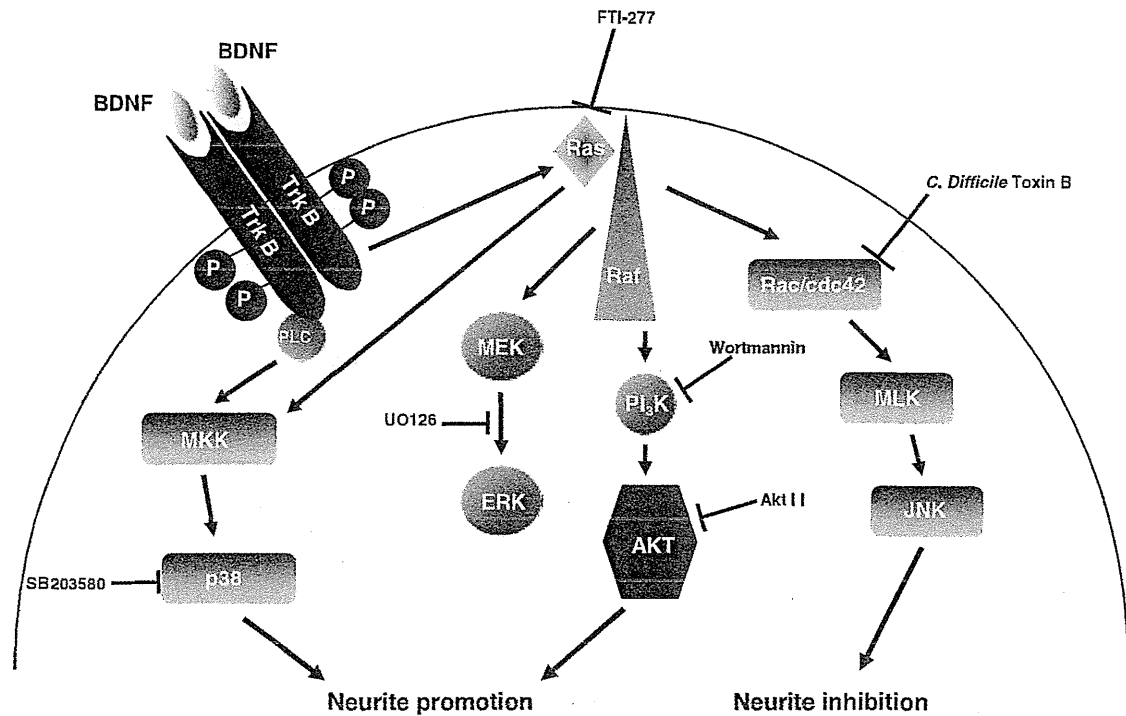


Fig. 6 – Schematic representation of possible signal transduction pathways involved in BDNF effects on SG neuritis, and the inhibitor used in the present study.

It is intriguing that Rac/cdc42 inhibition enhanced the neurite-promoting effects of BDNF. This observation suggests that BDNF may have a complex effect on SG neurons, with neurite number being promoted by p38 and Akt signaling, while being opposed by a Rac/cdc42/JNK pathway. However, the neurite-promoting effects of BDNF were only enhanced at the lowest concentration of the Rac/cdc42 inhibitor applied. A BDNF-independent effect seems unlikely, since Brors et al. (2003a) showed that Rac/cdc42 inhibition led to a dose-dependent decrease of SG neurite number cultured on laminin. The idea that BDNF may activate competing survival and death signals is consistent with current theories of apoptosis regulation in which it is the balance of such competing signals that determine a cell's fate (Salvesen, 2002).

The general G protein inhibitor GDP β S did not influence BDNF effects at any dosage. However, specific inhibition of the G protein Ras reduced BDNF effects, while inhibition of the Rho family G protein Rac/cdc-42 enhanced BDNF. The simplest explanation for the lack of effect of GDP β S is that inhibition of Ras and Rac/cdc42 signaling cancelled each other, resulting in no net effect. While this may well be the case, the very large number of G proteins that might potentially be involved in SG neurons suggests that there may well be a more complex explanation.

Agerman et al. (2003) replaced the coding sequence of the BDNF gene in mice with that of NT3, to analyze the selective roles of BDNF and NT3 during inner ear development. They found that NT3 largely replaced the actions of BDNF in the cochlea, indicating that these two neurotrophins have common and redundant functions. Interestingly, our data indicate that despite the fact that NT3 can largely replace the effects of

BDNF in the cochlea, the signaling pathways activated by these neurotrophins are quite different. Aletsee et al. (2001) demonstrated that Ras/Mek but not p38 signaling mediates NT3-induced effects on SG neurons *in vitro*. This implies that the different signaling pathways activated by BDNF versus NT3 nevertheless converge on similar cell functions. The reason for the utilization of different signaling cascades is unclear. However, this might relate to the evolutionary history of the two receptors involved. It might also be speculated that different opportunities for regulation are provided by the two patterns of intracellular signaling.

In the current study, BDNF treatment alone did not affect neurite length. Therefore, the effects of signaling inhibitors on neurite extension without BDNF presumably reflect an influence independent of this neurotrophin. One candidate for the mediation of length effects is alteration of extracellular matrix signaling via integrins. We have previously shown that extracellular matrix molecules enhance neurite outgrowth at the level used to coat the culture wells in the present experiment (Aletsee et al., 2001; Evans et al., 2007). It should be noted that integrin signaling is unlikely to mediate the effects of BDNF on SG neuron survival of neuritogenesis as discussed above, as we have not found in past experiments that ECM molecules influence SG neurite number (Aletsee et al., 2001). In the case of inhibitors that only influenced length in the presence of BDNF, it is possible that BDNF has both positive and negative influences upon neurite length, that on balance result in no effect. Inhibitors may upset this balance. While this hypothesis is perhaps too complex to be attractive without additional supporting data, it is at least consistent with our observations.