

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20226

研究課題名(和文) Muse細胞を用いた内耳前庭の再生

研究課題名(英文) Regeneration of vestibular hair cells using Muse cell

研究代表者

千葉 真人 (Chiba, Makoto)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80594324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはモルモット鼓室内にゲンタマイシン(40mg/ml)を投与した後に安定した内耳障害と、十分な体重増加量、死亡個体がないことなど優れた点を多く確認し、いずれも組織障害は有毛細胞のみであり支持細胞などの周辺環境の組織形態は保たれていることを確認した。これらのモデルにMUSE細胞を投与し、2週間の時点で移植細胞が前庭組織内に生着していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来モルモットにおいて前庭有毛細胞を傷害する方法として、アミノグリコシド系薬剤の投与が施行されてきた。投与薬剤はゲンタマイシンやアミカシンなどの種類があり、投与経路としては腹腔内投与や鼓室内投与がある。いずれの方法においても安定した障害を引き起こすことは困難であったが、今回我々が開発した方法により、個体間のばらつきが少なく安定した内耳障害を達成することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We confirmed many advantages such as stable inner ear injury, sufficient weight gain, and no death after administration of gentamicin (40 mg / ml) to the guinea pig tympanic cavity. In addition, it was confirmed that the tissue damage was hair cells only, and the tissue morphology of the surrounding environment such as supporting cells was maintained. In these models, MUSE cells were administered, and at 2 weeks, it was confirmed that the transplanted cells were engrafted in vestibular tissue.

研究分野：内耳基礎

キーワード：前庭有毛細胞 Muse細胞 内耳再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの聴覚、平衡機能はそれぞれ内耳の蝸牛、前庭の働きにより正常に保たれている。前庭系には、回転角加速度の受容器である半規管膨大部と直線加速度の受容器である耳石器(卵形囊・球形囊)があり、それぞれに感覚細胞である有毛細胞が存在している。

内耳有毛細胞には再生能がない有毛細胞は脆弱であり、加齢、遺伝子欠損、音響外傷、内耳障害性薬剤(抗がん剤、抗生剤など)、微小循環障害、ウイルス感染など様々な誘因によって、容易に傷害を受け脱落する。これらにより毎年数百万人もの人が難聴や平衡機能障害(めまい)を生じているが、我々の内耳有毛細胞には自発的な再生能がないため有毛細胞脱落による機能障害は不可逆的であり、根本的な治療方法は今までのところない。

一度引き起こされた前庭機能障害は回復しない

内耳前庭有毛細胞の脱落によって引き起こされた前庭機能障害は回復することなく、リハビリ等で中枢からの代償を期待し、平衡機能を補っているのが現在の治療法の中心である。

このため前庭機能障害の治療戦略としては内耳前庭有毛細胞の再生による機能回復が最も根本的と考えられる。

### ・ES細胞・iPS細胞には腫瘍化のリスク

基礎研究レベルではHLH型転写因子であるAtoh1による前駆細胞から有毛細胞への分化誘導が報告(Birmingham NA, et al. Science. 1999.)され、その後動物レベルでの前庭機能改善の報告が複数なされている。またES細胞、iPS細胞からの神経細胞誘導、有毛細胞類似の細胞の誘導(Oshima K, et al. Cell. 2010.)などの報告がなされており、今後の発展が期待されている。しかしながら、Atoh1は導入する際にアデノウイルスベクターを使用しており、臨床応用においてはウイルスカプシドに対する免疫反応の問題が常に課題としてつきまとう。他方、ES細胞やiPS細胞は腫瘍化のリスクがつきまとう。

また、前庭の再生は蝸牛と比較し圧倒的に研究報告例が少なく、さらなる研究成果の報告が待たれている分野である。

### ・間葉系幹細胞移植の限界

これまで、移植した間葉系幹細胞のごく一部が障害組織に生着し分化していることが報告されてきた。しかし、あくまで実験レベルの話であり、人への応用ではこのような組織再生効果ははっきりせず、効果としても液性因子による組織保護効果がメインと考えられている。安全性は高いものの間葉系幹細胞移植の限界がここにある。

### ・幹細胞としてのMuse細胞の有用性

近年、間葉系幹細胞の中から、多能性を有するが腫瘍性を持たない、Muse細胞と呼ばれる多能性幹細胞が発見された(Kuroda Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2010.)。Muse細胞の特徴は分化誘導を必要としない「簡便性」と腫瘍形成の可能性が無いという「安全性」である。

Muse細胞は、Nanog、Sox2、Oct3/4などの多能性マーカーを発現しており、間葉系幹細胞由来ではあるが、いわゆる間葉系幹細胞とは異なり三胚葉への自発的分化を示す。動物実験では劇症肝炎、筋変性、脊髄損傷、皮膚損傷などのさまざまなモデルで移植実験が行われ、損傷部位に生着することと、組織に応じた細胞に分化することが確認されている(Kuroda Y, et al. Arch Immunol Ther Exp. 2011.)が、これらの移植ではいずれも特定の分化誘導をあらかじめかけたわけではなく、細胞をそのまま静脈投与したに過ぎない。

これはMuse細胞の自発的分化を意味する。

また、ES細胞やiPS細胞は腫瘍性増殖マーカーの発現が高値であり、再生医療に用いる場合そのまま生体に投与すると腫瘍を形成する危険があるため、必ず目的の細胞への分化誘導と分化し損ねた未分化な細胞を除去する過程を行うことが前提となる。間葉系幹細胞はすでにヒトに移植されており、腫瘍化のリスクが低いことが示されている。間葉系幹細胞に由来するMuse細胞の腫瘍性増殖マーカーの発現は線維芽細胞などの体細胞と同程度であり、安全性の高い細胞と考えられている。

## 2. 研究の目的

新たな多能性幹細胞であるMultilineage-differentiating stress enduring (Muse)細胞はこれまでの多能性細胞と異なり腫瘍化のリスクがないと考えられており、臨床応用を行う上で他の幹細胞よりも有利である。内耳前庭有毛細胞の再生を可能にすることは末梢前庭機能障害を改善し、平衡機能障害を根本的に解決できる初めての方法になる可能性を有している。本研究により内耳障害の根本的治療の開発につながる事が期待される。

### 3. 研究の方法

#### 1. 薬剤性障害モデルの作成

モルモットにおいて前庭有毛細胞を傷害する方法として、アミノグリコシド系薬剤の投与があげられる。投与薬剤はゲンタマイシンやアミカシンなどの種類があり、投与経路としては腹腔内投与や鼓室内投与がある。

モルモット前庭機能の障害を評価する方法として、当科ではカロリックテストを用いており、予備試験では半規管を中心とした前庭機能を定量的に計測することが可能であった。

そこで、薬剤別、投与経路別に前庭機能の障害の程度やばらつき、個体の死亡率等を評価し、適切な薬剤、投与方法を検討することで、安定した障害モデルを確立し次のステップである移植へ移行する。

#### 2. 細胞移植手術の確立

内耳は中耳の奥にある構造であり、体表から到達し操作を行うためには高度なテクニックを必要とする。基本的には耳後部皮膚切開後、中耳骨胞を解放し、外側半規管、卵円窓、蝸牛骨壁などを經由して細胞を移植する。現在技術的にはいずれも試行可能な状況であるが、細胞移植の効率を評価し、Muse 細胞の最適な投与方法を検討する。

#### 3. Muse 細胞の前庭への移植実験

東北大学大学院医学研究科細胞組織学教室と共同で、ヒト間葉系幹細胞を継代培養し、SSEA-3をマーカーに FACS にて Muse 細胞を分離、採取する。

免疫抑制下に薬剤障害モデルモルモット内耳に Muse 細胞を移植し、免疫染色などによる組織学的評価を行い内耳への生着を確認する。また、有毛細胞に分化しているかどうかの確認のため、myosin VIIa、F-actin、Espin などの有毛細胞マーカーを用い解析する。前庭機能評価としてカロリックテストを施行する。

### 4. 研究成果

#### ゲンタマイシン鼓室内投与による前庭障害モデルの確立

一方の鼓室内投与法は経鼓膜的に、あるいは耳後部経由で正円窓にゲンタマイシンを滴下し内耳への薬剤浸透により障害を引き起こす。

全身障害はほとんどなく、強い前庭障害も引き起こすことは可能だが、障害にばらつきが大きく安定して一定の病変を引き起こすことが困難とされている。今回われわれは、3つの工夫を加えた新たな鼓室内投与法で、安定的に薬剤の内耳移行を図ることとした。

まず一つ目の工夫は、中耳腔内に空気が残ると内耳移行を妨げる原因となりうるため鼓膜に二か所穿孔をあげ、一つは注入用、もう一つは鼓室内の空気を抜くために使用した。

続いて二つ目の工夫は鼓膜経由で鼓室が完全に満たされるまでゲンタマイシンを注入し、卵円窓、正円窓両方からの内耳移行を安定させるようにした。

動物が覚醒すると嚥下等の影響で耳管経由に徐々に薬液は咽頭に流れ出てしまいます。これを防ぐため、麻酔管理の上2時間、あるいは6時間この状態をキープした。

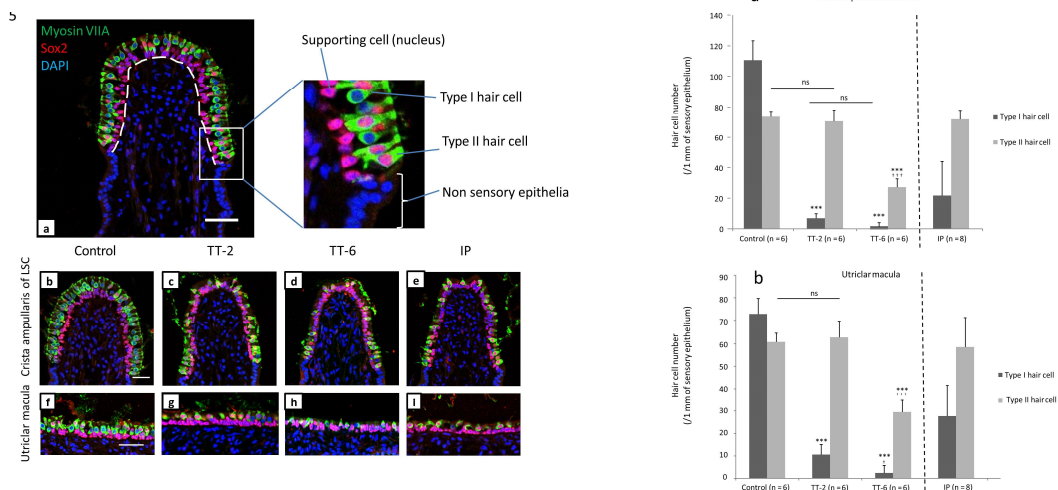
そして、最も重要な3つ目の工夫として一定時間の麻酔ののち覚醒直前に生理食塩水で内耳を洗い流し、薬剤を鼓室内に存在する時間を一定とするようにした。

#### (1) 前庭機能

鼓室内投与は2時間、6時間群とも障害14日目のカロリックテストで眼振が消失しており、ばらつきなく全例障害が可能であった。

#### (2) 前庭有毛細胞障害

外側半規管、卵形囊ともに2時間障害群ではII型有毛細胞を減少させることなく、I型有毛細胞を特異的に減少させることに成功した。6時間群では両細胞とも減少しており、時間により障害強度を調節することが可能であった。(下図)



## 内耳への Muse 細胞移植

これらのモデルに MUSE 細胞を投与し、2 週間の時点で移植細胞が前庭組織内に生着していることを確認したが、一方で前庭感覚上皮への生着は見られておらず、有毛細胞マーカーの発現も見られていない。投与細胞数を変更したがこの点に関して改善がみられなかった。その後、障害から細胞投与までの期間を短縮し、遊走因子の高いと考えられる時期での投与を行ったがやはり生着は得られなかった。しかし、これらの過程で安定した内耳障害を与えるメソッドを確立できたことは本研究の大きな成果といえる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

千葉真人 暴露時間依存性に前庭障害を調節しうるゲンタマイシン鼓室内投与法の新規開発  
めまい平衡学会 2017

Makoto Chiba Selective Removal of Type I Hair Cells in Vestibular End Organs Using a  
Transtympanic Gentamicin Damage Protocol in Guinea Pigs Inner Ear Biology 2017

Makoto Chiba Unilateral intratympanic administration of gentamicin creates  
optimal vestibular disorder model in guinea pigs Inner Ear Biology 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名 : 欠畑 誠治

ローマ字氏名 : KAKEHATA SEIJI

研究協力者氏名 : 伊藤 吏

ローマ字氏名 : ITO TSUKASA

研究協力者氏名 : 新川 智佳子

ローマ字氏名 : SHINKAWA CHIKAKO

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。