

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16845

研究課題名(和文)ラセン神経節神経幹細胞の増殖・分化制御機構の解明とその聴力再生への応用

研究課題名(英文) Mechanisms of proliferation and differentiation of spiral ganglion neural stem cells and their application to hearing regeneration.

研究代表者

安井 徹郎 (Tetsuro, Yasui)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：60803468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成体哺乳類ラセン神経節(SG)では、SGNは再生されないとされてきた(Lang et al. Sci Rep 2015)。しかし申請者らは、この通説を覆し、薬剤(ウアバイン)投与によるSGN傷害応答性に増殖を開始し、SGNを産生できる神経幹/前駆細胞(NS/PC)の存在を成体マウスにて証明した。さらに、その増殖・分化・生存制御により、効率的SGN再生と聴力改善に成功した(JCI Insight 2021)。感音難聴の大多数を占める内耳性難聴でも二次性にSGNが変性・脱落するため、高効率SGN補充による聴力再生は、有毛細胞再生に並び立つものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全世界に難聴者は4億7000万人と言われ、全人口の6%に相当する。世界で最も高齢化が進んでいる日本では、2018年に65歳人口が総人口の28.1%を占め、この割合は2065年には約40%に達すると予想される。また難聴は必然的にコミュニケーション障害を引き起こし、社会的孤立、うつ病、身体的・認知的機能の低下と関連し、その社会的損失も極めて大きい。特に後迷路性難聴は言語聴取に劣り、代償が困難であるため、QOLの著しい低下を招くが、根本的な治療法は現在存在していない。申請者らの報告は、変性・死滅する自己SGNを保護・再生させるものであり、今後の後迷路性難聴に対する根本的かつ嚆矢的再生治療となりうる。

研究成果の概要(英文)：It has been believed that adult mammalian spiral ganglion (SG) do not regenerate spiral ganglion neuron(SGN) (Lang et al. Sci Rep 2015). However, the applicants have overturned this prevailing theory and demonstrated the existence of neural stem/progenitor cells (NS/PCs) in adult mice that can initiate proliferation and produce SGNs in response to SGN injury induced by a drug (ouabain). Furthermore, by controlling their proliferation, differentiation, and survival, they succeeded in efficient SGN regeneration and hearing improvement (JCI Insight 2021). Since cochlear hearing loss, which accounts for the majority of sensorineural hearing loss, also causes secondary degeneration and loss of SGNs, we believe that hearing regeneration by highly efficient SGN replacement is comparable to hair cell regeneration.

研究分野：聴覚再生

キーワード：再生医療 聴覚再生 幹細胞 再生・修復 耳科学 聴覚医学 ラセン神経節ニューロン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全世界に難聴者は3億6000万人存在すると言われており(WHO統計、2016年)、全人口の5%に相当する。その原因は胎児期のウイルス感染や遺伝性、中耳炎、薬剤性、音響外傷など多岐にわたるが、治療により改善可能なものはその一部にとどまる。特に内耳及びその電気信号を中枢聴覚野に伝える聴覚神経の傷害は、これらの細胞が哺乳類では可塑性を持たないと言われてきたことから、補聴器や人工内耳などのデバイスによる対症療法が主である。

近年では成体哺乳類中枢神経において神経幹細胞の存在が報告されており、その解析と再生への取り組みは著しい進捗を遂げている。その一方で聴覚神経における神経幹細胞研究は、その由来や分化傾向など未だ不明な点が多く、一次ニューロンである蝸牛ラセン神経節細胞は、成体哺乳類においては一度傷害されると再生しないとされてきた。過去の報告で、成体マウスラセン神経節において、傷害に反応して神経幹細胞様細胞が出現することが報告されたが、それらの神経幹細胞様細胞はシュワン細胞であると結論づけられており、ニューロンに分化することはない、それゆえ聴力の改善も報告されていない。

2. 研究の目的

ラセン神経節ニューロン障害に対する再生治療戦略には、主として以下の2つが考えられる。内因性細胞制御は、ラセン神経節に存在する細胞を活性化することによりラセン神経節ニューロンを増やす方法である。また外因性細胞移植は、iPS細胞などから作られた細胞をラセン神経節に移植することでラセン神経節ニューロンを増やす方法である。両者のうち、内因性細胞の活用は、腫瘍化や免疫拒絶反応などの問題点、複雑な構造をした内耳の手術操作の困難性といった懸念が少ないため、好ましいと考える。

これに関して申請者は、成体マウスのラセン神経節においても内在性神経幹細胞が静止状態で存在するとの仮説を立て、その増殖・分化・成熟の制御が傷害された聴神経回路の再構築に重要な役割を担う可能性を考慮した。そこで本研究では、成体ラセン神経節における内在性神経幹細胞を同定し、このラセン神経節神経幹細胞の増殖・分化制御機構の解明を目指した。さらに、傷害時においてこの制御機構を応用することで、新生ニューロンによる神経回路機能の再獲得および聴力改善を目指した。

3. 研究の方法

・動物

ICR雄マウス(Japan SLC)を使用した。

・ウアバイン投与

先行報告に従い、正円窓を介してウアバインを投与した。8~10週齢の成体マウスを、麻酔のうえ耳後部切開を行い、正円窓に3mMウアバイン50 μ lを含浸させた濾紙にて投与した。左耳を手術耳とし、右耳を無傷のcontrolとして活用した。

・増殖因子(GFs)投与(再手術)

ウアバイン投与後3日目に、マウスを再度麻酔で眠らせ、耳後部切開を開き、正円窓よりゲル状のマトリゲル(Matrigel)と混合した100 μ lのGFs(EGFおよびbFGF、それぞれ20ng/ml; Peprotech)を中耳包内に留置し投与した。

・バルプロ酸(VPA)投与

ウアバイン処置後3日目に再手術でGFsを投与されたマウスの一部に、ウアバイン投与後7日目から1週間、1日1回300mg/kg VPA(Sigma)の腹腔内注射を行った。

・研究の承認

動物プロトコルは、九州大学動物実験委員会によって承認された(A29-274およびA19-341)。

4. 研究成果

1. ラセン神経節ニューロン傷害後に新しいニューロンが出現することを示す

成体マウスのラセン神経節の細胞は、ほとんどが成熟したニューロンとシュワン細胞で構成されており、どちらも生理学的条件下で非増殖性であることが知られているが、以前の報告で成体マウスのラセン神経節細胞に薬剤傷害を与えたところ、増殖性細胞

が出現することが示された。しかしながら、その後の研究報告でこれらの増殖性幹細胞様細胞は、成体マウスラセン神経節においてシュワン細胞マーカーである Sox2 あるいは Sox10 陽性のシュワン細胞であると結論づけられており、聴力改善も見られなかった。

この先行報告を受け、ラセン神経節ニューロンを選択的に損傷することができることが証明されている Na-K ATPase 阻害剤であるウアバインを投与し、傷害後に実際に出現する増殖性細胞が、最終的にどのような細胞へ分化するのかを調べた。成体マウスの内耳にウアバインを投与し、3日目から5日間、増殖性細胞マーカーである BrdU を成体マウスに腹腔内投与して増殖性細胞を標識し、28日目にラセン神経節を観察した。傷害後28日目のラセン神経節における BrdU 陽性細胞の大部分は、Sox2 あるいは Sox10 陽性のシュワン細胞であったが、ごくわずかではあるものの β -III tubulin と BrdU が共陽性である細胞を認めた (図1)。つまり、これら少数の細胞は、ウアバイン投与後3~7日目に増殖していた細胞が、傷害後28日目までにニューロンへと分化したものであり、成体ラセン神経節における細胞が自己増殖能とニューロンへの分化能を持つことを示唆している。

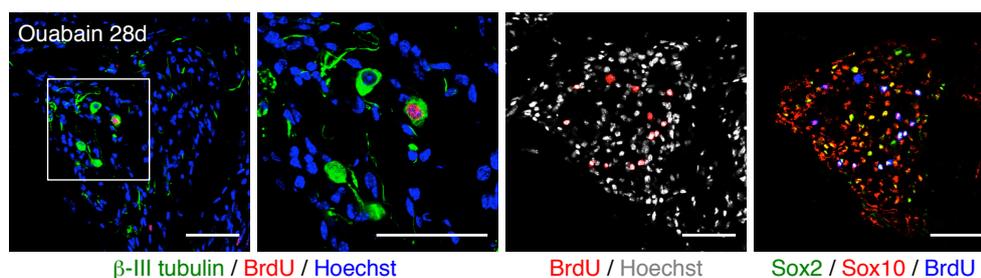


図1. ラセン神経節傷害後に新しいニューロンが出現する

左の2画像では、 β -III tubulin/ BrdU-二重陽性の新生ニューロンを示す。白い四角で囲まれた領域を、右図で拡大している。右の2画像は、BrdU と共陽性である Sox2 あるいは Sox10 陽性のシュワン細胞を示す (Scale bars = 50 μ m)

2 増殖因子とバルプロ酸の併用治療で、傷害後のラセン神経節ニューロンを増やす戦略

過去の研究報告において、聴力を維持・回復するためには、原型のラセン神経節ニューロンの少なくとも約30%が必要であることが示された。しかしながら、本研究におけるラセン神経節傷害モデルではウアバイン投与後28日目に残存したラセン神経節ニューロンの数は、元の数の10%未満であり重度の難聴につながった。そのため、傷害したマウスの失われた聴力を改善するために、傷害後の新生ニューロンの数を増やすことを試みた。

この試行のなかで、ウアバイン投与内耳への増殖因子の単独投与治療では最終的なニューロンの数を増やすことができなかつたので、バルプロ酸を併用して治療することで最終的なニューロンの数を増やすことができるかを検討した。抗てんかん薬として知られている HDAC 阻害薬であるバルプロ酸 (VPA) は、増殖性神経幹細胞のニューロン分化を誘導し、またニューロンの生存を促進することが知られている。

成体マウスの内耳にウアバインを投与し、傷害後3日目に再手術で増殖因子を投与し、3日目から7日目まで BrdU を腹腔内投与して増殖性細胞を標識した後、7日目から13日目までの1週間バルプロ酸を腹腔内投与し、傷害後28日目にラセン神経節を観察した。核内に BrdU を取り込んだ β -III tubulin 陽性細胞の増加を認め、バルプロ酸非投与群では Sox2 陽性シュワン細胞の分化が主体であるのに対し、バルプロ酸投与群では β -III

tubulin 陽性ニューロンの分化が促進されていた（図2）。このことはバルプロ酸が「ニューロン分化」と、「新生ラセン神経節ニューロンの生存」の両方を促進したことを示している。

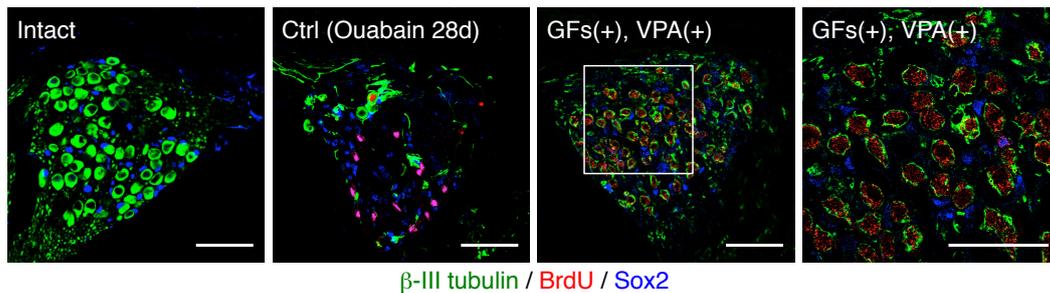


図2. 増殖因子とバルプロ酸の併用療法がラセン神経節ニューロンの再生を促進する
Intact、Ctrl および GFs + VPA 併用治療をしたラセン神経節の免疫染色。白い四角で囲まれた領域を、右図で拡大している (Scale bars = 50 μ m)

3. 増殖因子とバルプロ酸の併用療法が、ラセン神経節ニューロン傷害後に聴力の再獲得をもたらす

傷害後 28 日目に生成された β -III tubulin 陽性ラセン神経節ニューロンの数は、傷害を与えていない群 (Intact) のほぼ 75%まで回復しており (図2)、聴覚の維持・回復に必要とされる 30%を大きく上回り、聴力の回復が期待された。そこで、他覚的評価として聴性脳幹反応 (ABR) 検査を行い、聴力の機能回復を評価した (図3)。まずウアバイン投与前 (Pre) のマウスで ABR 検査を実施し、約 60dB 前後の聴力であったマウスを集め、引き続き実験を行なった。ABR は、ウアバイン投与後 7 日目に全てのマウスで実施し、増殖因子投与の有無に関わらず、完全に無反応で全く聞こえていない (スケールアウト) の状態であることを確認した。ウアバイン投与後 35 日目のマウスでは、増殖因子もバルプロ酸も投与されていない群では、ABR 検査で無反応 (スケールアウト) のままであったが、一方で増殖因子とバルプロ酸の併用治療を行なった群では ABR 検査で波形の再出現を認め、聴力の回復を認めた (図3)。このことは増殖因子とバルプロ酸の併用治療が、完全ではないものの、聴力の再獲得をもたらしたことを示した。

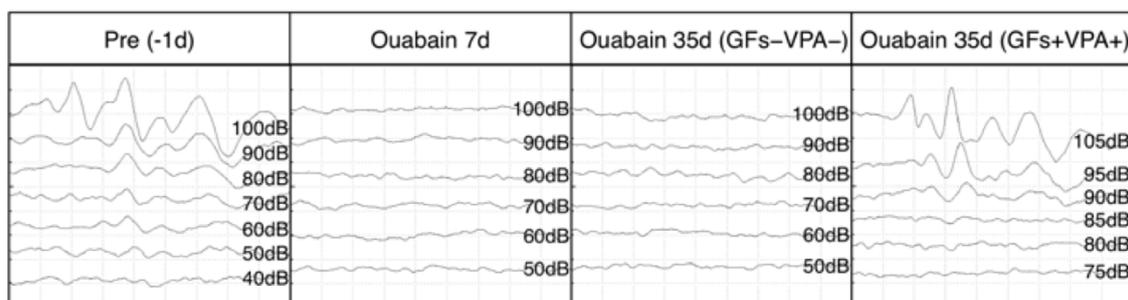


図3. 傷害後のラセン神経節ニューロンの再生が聴力の再獲得をもたらす

ウアバイン投与前 (Pre) には、ABR 検査で波形を記録することができたが、ウアバイン投与後 7 日目までに、ABR 検査で反応は完全になくなった (スケールアウト)。治療なしの

場合は、ABR 検査での反応は傷害後 35 日目も存在しなかった（スケールアウト）が、GFs と VPA の併用治療した群では傷害後 35 日目に波形が再出現した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakizono Takahiro, Nakashima Hideyuki, Yasui Tetsuro, Noda Teppei, Aoyagi Kei, Okada Kanako, Yamada Yasuhiro, Nakagawa Takashi, Nakashima Kinichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Growth factors with valproic acid restore injury-impaired hearing by promoting neuronal regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.139171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 脇園 貴裕, 安井 徹郎, 野田 哲平, 中川 尚志, 中島 欽一
2. 発表標題 成体ラセン神経節における傷害誘導性ニューロン新生
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安井 徹郎、脇園貴裕、青柳圭、野田哲平、中川尚志、中島 欽一
2. 発表標題 ラセン神経節神経幹細胞の微小環境におけるマクロファージ制御
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	脇園 貴裕 (Wakizono Takahiro)	九州大学	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	野田 哲平 (Noda Teppei) (20707179)	九州大学	
研究協力者	青柳 圭 (Aoyagi Kei)	九州大学	
研究協力者	中川 尚志 (Nakagawa Takashi) (70274470)	九州大学・教授	
研究協力者	中島 欽一 (Nakashima Kinichi) (80302892)	九州大学・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関