

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20591980

研究課題名(和文) ヒト難聴等価モデル動物におけるラセン神経節細胞前駆細胞の可視化と動態に関する解析

研究課題名(英文) Visualizing and dynamic analysis of spiral ganglion cell progenitors b using of human hearing-loss model animals

研究代表者

小島 憲 (KOJIMA KEN)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60378685

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変動物を用いてラセン神経節内の幹細胞マーカー陽性細胞を同定し、*in vivo* および *in vitro* での解析を行った。幹細胞マーカーを発現する細胞は衛星細胞であり、*in vitro* の解析ではラセン神経節細胞に似た性質を持つ細胞に分化することができたが、系譜は本来のラセン神経節細胞とは異なることが判明した。また、今回の *in vivo* の解析では衛星細胞からラセン神経節細胞への分化は認められなかった。衛星細胞を用いたらせん神経節細胞の再生には、なんらかの増殖/分化の制御が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Stem cell marker protein expressing cells identified by use of transgenic animals were analyzed *in vivo* and *in vitro*. In spite of different lineage from spiral ganglion neurons, satellite cells expressing stem cell markers in spiral ganglion were induced to neural phenotypes *in vitro*. *In vivo* analyses showed that no satellite cell were induced to neural phenotypes. These results indicated that some kinds of controls of proliferation and differentiation of the satellite cells were needed for regeneration of spiral ganglion neurons *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床学・耳鼻咽喉科学

キーワード：らせん神経節細胞、前駆細胞、衛星細胞、lineage tracing、難聴モデル動物、*in vivo*、*in vitro*

## 1. 研究開始当初の背景

音刺激は内耳の蝸牛有毛細胞で知覚され、その信号はラセン神経節細胞が受け取り、中枢神経系へと伝達する。内耳が原因の高度難聴に対し、聴覚の(再)獲得を目的とする治療法として現状でもっとも効果が期待できる治療法はラセン神経節を直接刺激する人工内耳である。

しかしながら、ラセン神経節細胞が傷害されている状態では人工内耳の効果は期待できない。傷害の原因として遺伝性素因、耳毒性薬物、auditory neuropathy、聴神経低形成、聴神経腫瘍やその手術後遺症など様々な病態が知られているが、ヒトを含むほ乳類ではラセン神経節細胞は自発的には再生しないとされている。

我々は、研究分担者が神経幹細胞を可視化する目的で開発した Hes プロモーター下に EGFP の発現が制御される pHes-d2EGFP トランスジェニックマウスを使用し、高い増殖能を持つ細胞群がラセン神経節に存在し、神経様細胞への分化能を有することを発表した(小島ら, Neuroscience Res 2007)。この細胞の動態を解析することはラセン神経節の再生/機能回復につながる。

## 2. 研究の目的

可視化したラセン神経節細胞前駆細胞の動態を in vivo および in vitro で検討し、ラセン神経節細胞前駆細胞の増殖・分化の制御方法の開発、さらには、内在性のラセン神経節細胞前駆細胞を利用した再生医療による聴覚路の in situ regeneration へつなげる。

## 3. 研究の方法

### a. トランスジェニック動物の作製

神経幹細胞および神経堤由来の細胞を標識できるプロモーターを利用した遺伝子改変動物および人難聴等価モデル動物である

Gjb2 優性阻害優性遺伝難聴 (Gjb2 DN) マウスからダブルトランスジェニック動物を作製

### b. 前駆細胞の動態検索

ラセン神経節細胞前駆細胞が可視化される pHes マウスを用いて、発達・成熟過程における前駆細胞の分布変化や発現タンパクの変化を免疫組織学的に検索

## 2. in vitro での解析

可視化されたラセン神経節細胞前駆細胞を FACS で回収し、培養系を樹立する。安定的な培養系が得られた時点から解析を行った。

a. 増殖能評価: WST-1 assay, BrdU 取り込み能、細胞周期マーカーで検討

b. 分化能評価: 栄養因子の添加等による神経細胞への分化誘導を免疫組織学的方法により評価

## 4. 研究成果

a. ラセン神経節における神経幹細胞マーカー発現細胞は衛星細胞であった

b. 神経幹細胞マーカーを発現する衛星細胞は成熟とともに減少し、生後2ヶ月のトランスジェニック動物ではごく少数となった。

c. ラセン神経節の衛星細胞は神経堤由来細胞を標識する遺伝子改変動物で標識された

d. in vitro の解析では、培養条件の変更により衛星細胞由来の培養細胞の増殖を制御することが可能であった。

e. in vitro の解析では、培養条件の変更により衛星細胞由来の培養細胞からラセン神経節を構成する2種の神経細胞と同様のパターンのマーカー蛋白を衛星細胞は発現するように分化誘導することができた。

e. 今回の in vitro の解析では、培養条件の変更により衛星細胞由来の培養細胞から中胚葉系の細胞には分化誘導は出来なかつ

た。

F. 今回の人難聴等価モデル動物を用いた *in vivo* の解析では衛星細胞から神経節細胞への分化は認められなかった。

以上から、*in vivo* での衛星細胞を用いたラセン神経節細胞の機能的な再生には、なんらかの増殖／分化の制御が必要であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 森尚彫、伊藤壽一、平海晴一、山口忍、柴田尚美、松井理直、山本典夫、坂本達則、岩井詔子、小島 憲、松本昌宏、扇田秀章 人工内耳装用学童児の聞き取り能力における教室音環境の影響 *Audiology Japan* 2012 Apr;55(2):138-145
- ② Sekiya T, Matsumoto M, Kojima K, Ono K, Kikkawa YS, Kada S, Ogita H, Horie RT, Viola A, Holley MC, Ito J. Mechanical stress-induced reactive gliosis in the auditory nerve and cochlear nucleus. *J Neurosurg.* 2011 Feb;114(2):414-25. Epub 2010 Apr 2. PMID:20367075
- ③ Ono K, Nakagawa T, Kojima K, Matsumoto M, Kawauchi T, Hoshino M, Ito J. Silencing p27 reverses post-mitotic state of supporting cells in neonatal mouse cochlea. *Mol Cell Neurosci.* 2009 Dec;42(4):391-8. Epub 2009 Sep 4. PMID:19733668
- ④ Sekiya T, Canlon B, Viberg A, Matsumoto M, Kojima K, Ono K, Yoshida A, Kikkawa YS, Nakagawa T, Ito J. Selective vulnerability of adult cochlear nucleus neurons to de-afferentation by

mechanical compression. *Exp Neurol.* 2009 Jul;218(1):117-23. Epub 2009 Apr 23. PMID:19393647

- ⑤ Matsumoto M, Nakagawa T, Kojima K, Sakamoto T, Fujiyama F, Ito J. Potential of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. *J Neurosci Res.* 2008 Nov 1;86(14):3075-85. PMID:18543340

[学会発表] (計 7 件)

- ① 小島 憲、松本昌宏、扇田秀章、森尚彫、大西晶子、伊藤壽一 当院における片側聾患者に対する Baha®システム BP100 の使用経験 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会 2011/5/19-22 京都
- ② 松本昌宏、小島 憲、扇田秀章、森尚彫、大西晶子、伊藤壽一 当院における人工内耳と補聴器の両耳装用症例の検討 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会 2011/5/19-22 京都
- ③ 小島 憲、松本昌宏、扇田秀章、森尚彫、大西晶子 当院で経験した骨固定式骨導補聴器 Baha システムの問題点 平成 23 年度通信医学年次大会 2011/10/22 横浜
- ④ 松本昌宏、小島 憲、扇田秀章、森尚彫、大西晶子 当院における人工内耳と補聴器の両耳装用症例の補聴器併用効果について 平成 23 年度通信医学年次大会 2011/10/22 横浜
- ⑤ 小島 憲、小野和也、伊藤壽一 ラセン神経節衛星細胞の多分化能についての検討 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2008/5/16 大阪

⑥ 小島 憲、小野和也、伊藤壽一

ラセン神経節衛星細胞の in vitro における  
自己複製能に関する解析 第 18 回日本耳科  
学会総会・学術講演会 2008/10/16 神戸

⑦ K. Kojima, T. Ohtsuka, T. Tateya, K,  
Ono, S. Takebayashi, R, Kageyama

Satellite cells include stem cells in the  
spiral ganglion of the postnatal mouse  
inner ear 第 31 回日本神経科学大会  
2008/7/11 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島 憲 (KEN KOJIMA)  
京都大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号：60378685

### (2) 研究分担者

大塚 俊之 (OUTSUKA TOSHIYUKI)  
京都大学・ウイルス研究所・准教授  
研究者番号：20324709

池田 勝久 (IKEDA KATSUHISA)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：70159614