

平成23年 5 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591996

研究課題名 (和文) 内耳再生治療を目指して蝸牛外側壁線維細胞の再生因子の解明

研究課題名 (英文) Identification of regenerating factors that induce regeneration of spiral ligament

研究代表者

孫 廣煒 (SON KOUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・外国人客員研究員

研究者番号：40425773

研究成果の概要 (和文)：

蝸牛線維細胞は難聴の発症、聴力の回復、および聴覚の維持に大きく関与している。我々は骨髄間葉系幹細胞 (MSC) から分泌した蝸牛線維細胞の増殖促進因子を同定した。正常培地と比べ、骨髄 MSC の培養上清の中 TGF β の濃度が上昇し、TGF β を線維細胞に添加すると線維細胞の増殖を促進することが確認された。さらに、MSC 上清の蝸牛線維細胞への増殖促進作用が TGF β 阻害剤の添加により一部抑制されたことを確認した。これらの結果より、骨髄 MSC から分泌された TGF β は他の因子との相互作用により蝸牛線維細胞の増殖を促進している可能性が示唆される。

研究成果の概要 (英文)：

Spiral ligament fibrocytes (SLFs) play important role in normal hearing as well as in several types of sensorineural hearing loss attributable to inner ear homeostasis disorders. In this study we identified TGF β secreted from mesenchymal stem cells (MSCs) had a stimulatory effect on proliferation of SLFs and the effect was blocked by adding TGF β inhibitor. Our results suggested TGF β secreted from MSCs promote the proliferation of SLFs by interaction with other factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード： 骨髄間葉系幹細胞、内耳再生、蝸牛外側壁線維細胞、再生医学、成長因子

1. 研究開始当初の背景

蝸牛外側壁に存在する蝸牛線維細胞は正常の聴覚に必要とされる内耳のイオン環境を維持するために特異的に分化した細胞である。近年、様々な難聴の病態に蝸牛線維細胞の障害が関与していることが明らかになりつつある。我々はこれまでに開発した蝸牛線維細胞が選択的障害を受けたモデル動物（3NP ラット）の解析により、蝸牛線維細胞が難聴の発症、聴力の回復、および聴覚の維持に大きく関与していることが明らかになってきた。これまで、蝸牛線維細胞の発生、分化、再生に関する情報は少なく、蝸牛線維細胞の障害に対する効果的な治療方法は臨床の場において確立していない。このため難聴治療において、蝸牛線維細胞の増殖・分化に関与する因子を解明することの意義は極めて大きい。

当研究室では蝸牛線維細胞が障害されたモデルラットの蝸牛に骨髄間葉系幹細胞（骨髄 MSC）を移植したところ、一部の幹細胞は傷害部位に生着した上、分化を示すマーカーを発現し、その聴力にも有意な回復が見られることを報告した。生着した移植細胞の性質と聴力回復のメカニズムを解明することを目的として、申請者は骨髄 MSC と蝸牛線維細胞の共培養をした。その結果から、骨髄 MSC 移植による蝸牛機能の回復は、骨髄 MSC が蝸牛線維細胞に分化する以外にも、骨髄 MSC が蝸牛線維細胞の増殖を促進している可能性が考えられる。今後さらに骨髄 MSC から分泌されて線維細胞の再生に働く未知の因子を発見するために、新たな方法を要求されてある。

2. 研究の目的

近年、内耳に存在する蝸牛線維細胞は難聴の発症、聴力の回復、および聴覚の維持の大きく関与していることが報告された。しかし、現在蝸牛線維細胞の障害に対する効果的な治療方法は未だ確率されていない。本研究では、蝸牛線維細胞障害による難聴の再生治療の開発を目指して、蝸牛線維細胞の増殖を促進する因子を特定し、最終的に新しい治療方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄 MSC からの培養上清を回収し、蝸牛線維細胞へ添加した7日後、細胞を回収する。DNA アレイ法（フィルジェン株式会社）を利用して、刺激された細胞の遺伝子変化を調べる。

(2) 骨髄 MSC の培養上清と正常培地を抗体アレイと抗サイトカイン抗体アレイ（フィルジェン株式会社）にかける。コントロール（正常培地）と比べて、濃度に顕著な差を認める因子を探索する。蝸牛線維細胞の培養系を利用して、同定された因子の線維細胞への影響を調べる。

4. 研究成果

骨髄 MSC からの因子を解明するため、我々は DNA アレイ法を用いて、骨髄 MSC の刺激によって蝸牛線維細胞の遺伝子変化を調べた。その結果、MSC の刺激によって蝸牛線維細胞で発現が上昇する遺伝子が 321 個、低下するのは 214 個であった。その遺伝子が Wnt Pathway、Notch Pathway、および TGF- β Pathway に関連した。

抗体アレイ及び抗サイトカイン抗体アレイ法の結果では、コントロール群と比較して骨髄 MSC の培養上清から 6 種類の蛋白質が発現が上昇していることが確認された。その内、TGF-Beta という増殖因子が同定された。

TGF-Beta を単独で蝸牛線維細胞に添加した結果、線維細胞の増殖を促進することも確認されたが、骨髄 MSC の培養上清添加組より促進能力が低い。一方、MSC 上清の蝸牛線維細胞への増殖促進作用が TGF-Beta 阻害剤の添加より一部抑制されたことも確認された。これらの結果より、骨髄 MSC から分泌された TGF β は他の因子との相互作用により蝸牛線維細胞の増殖を促進している可能性が示唆される。

本研究で TGF-Beta は蝸牛線維細胞の増殖に関与することが解明した。増殖因子は既に幾つの組織において薬物治療として臨床応用がなされている。そこで、本研究から得られた因子は難聴治療の臨床応用にも新規治療薬としての実現性が高くなると予想される。さらに、細胞移植も今後の再生医療にとって期待される治療手段である。本研究で同定された因子と一緒に内耳に投与すると、移植細胞を効率よく傷害部位に接着、増殖、分化することが期待できる。これから日本の高齢化社会に伴い、難聴は深刻な社会問題として解決せざるを得ない状況である。本研究は蝸牛障害の重要な責任部位の 1 つである蝸牛線維細胞の再生の薬剤開発を目的としており、難聴治療に新しい展開をもたらさるう。

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 1 件)

① Cui Y, Sun GW, Yamashita D, Kanzaki S, Matsunaga T, Fujii M, Kaga K, Ogawa K.

Acoustic overstimulation-induced apoptosis in fibrocytes of the cochlea spiral limbus of mice. Eur Arch Otorhinolaryngol. 査読有、2011 Volume 268, Number 7, 973-978。

[学会発表] (計 4 件)

① Guangwei Sun, Masato Fujii, Tatsuo Matsunaga. Functional interaction between Mesenchymal stem cells (MSC) and spiral ligament fibrocytes underlies hearing recovery after MSC transplantation into the inner ear. Cell Transplant Society (CTS), April 20-21, 2009, Okayama

② 孫 廣煒、山下大介、松長達雄、藤井正人; 内耳におけるシグマ 1 受容体の生後は発達に伴う発現パターン; 第 18 回日本耳科学総会学術講演会; 2008 年 10 月 16-18 日 神戸

③ 山下大介、孫 廣煒、神崎晶、松永達雄、小川郁; 音響外傷性難聴に対する SA4503 の内耳神経保護効果; 第 18 回日本耳科学総会学術講演会; 2008 年 10 月 16-18 日 神戸

④ 瀧口洋一郎、孫 廣煒、崔勇、務台英樹、幸池浩子、水足邦雄、藤井正人、小川郁、松永達雄; 急性内耳エネルギー不全による蝸牛外側壁線維細胞の可塑的变化; 第 18 回日本耳科学総会学術講演会; 2008 年 10 月 16-18 日 神戸

[図書] (計 1 件)

松永達雄、孫 廣煒、務台英樹 金原出版 病因と遺伝子 小耳症・外耳道閉鎖に対する機能と形態の再建. 2009、11 - 16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

孫 廣煒 (SON KOUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・外

国人客員研究員
研究者番号：40425773

(2) 研究分担者

松永 達雄 (MATSUNAGA TATSUO)
独立行政法人国立病院機構東京医療セン
ター（臨床研究センター）・聴覚平衡研究
部・室長
研究者番号：90245580 (H20)