

平成 22 年 5 月 2 日現在

研究種目：若手 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791238

研究課題名 (和文) 急性内耳エネルギー不全に対する前庭への骨髄間葉系幹細胞移植

研究課題名 (英文) Mesenchymal stem cell transplantation for the vestibular organ of acute inner ear energy failure

研究代表者

水足 邦雄 (MIZUTARI KUNIO)

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・研究員

研究者番号：40338140

研究成果の概要 (和文)：有毛細胞が特異的に傷害される末梢前庭器に骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の移植を行い有毛細胞の再生の可否を検討した。その結果、移植した MSC の前庭への生着を認めたが、移植細胞の前庭有毛細胞への分化および機能的な回復は認めなかった。今後、さらに投与方法や移植細胞の種類を検討する必要があると思われる。

研究成果の概要 (英文)： In this research, we tried to transplant mesenchymal stem cells (MSC) into the vestibular organ of acute energy failure model, which are damaged in vestibular hair cells. As results, we could observed that transplanted MSCs were migrated and survived in the vestibular organ. However, neither differentiation of MSC into the vestibular hair cells, nor functional recovery of vestibular system were observed. In conclusion, these results suggested that improvement of graft surgery, and MSC pretreatment would be required to regeneration of the vestibular hair cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000 円	510,000 円	2,210,000 円
2009 年度	1,600,000 円	480,000 円	2,080,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：

キーワード：3-nitropropionic acid 平衡障害 骨髄間葉系幹細胞 細胞移植 前庭有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

これまで、本施設ではミトコンドリアの電子伝達系の不可逆的阻害剤である 3-nitropropionic acid (3-NP) を内耳に局所投与することによって、内耳に局限するエネルギー不全モデルを生じるラットを作製し (Hoya et al. Neuroreport, 2004)、その

病態の解明と治療法の検討を行ってきた (Okamoto et al. Audiol Neurotol, 2005)。これまでに蝸牛においては外側壁線維細胞の脱落が難聴の生じる主な原因であり、同部位のアポトーシスを阻害することによって難聴の予防が可能であることを報告した (Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007)。

一方で、同モデルには **rolling** や **head tilt** 等の平衡機能障害も生じることが観察されており、全周波数において永続的に **ABR** 域値上昇を引き起こす **3-NP500mM** の投与において、投与後強い麻痺性自発眼振を誘発し、術後1週間でカロリックテストの反応が消失することが確かめられた。この病態を末梢前庭器の観察を行い検討したところ、蝸牛とは異なり球形嚢、卵形嚢、半規管膨大部における有毛細胞が特異的に障害を受けることが主な原因と判明した (**Mizutari et al. ARO midwinter meeting, 2007**)。臨床的にもめまいを伴う突発性難聴は難治性であり、本モデルで見られるような複合的な障害機序により引き起こされていることが示唆される。これまで、我々の研究グループでは、骨髄間葉系幹細胞 (**MSC**) の移植により **MSC** の外側壁への生着および聴力改善を図ることができる (**Kamiya et al. Am J Pathol, 2007**) ことを報告してきた。**MSC** は患者の骨髄から容易に採取することができるため、移植に伴う倫理的制約が低く、ヒトへの臨床応用が容易なため基礎実験の有用性が高い。永続性平衡機能障害の患者数は極めて多いが、その根本的治療法は依然臨床的に存在しない。

2. 研究の目的

本実験では、有毛細胞が特異的に傷害される末梢前庭器に **MSC** の移植を行い、有毛細胞の再生を図り、永続性末梢平衡機能不全の治療を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

従来我々の施設で使用している **3-nitropropionic acid(3-NP)** を用いた急性内耳エネルギー不全モデルラットを用いる。これまでの報告通り (**Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007, Hoya et al. Neuroreport, 2004**) **S-D** ラットに対して全身麻酔下に **500mM** の **3-NP** を **3 μ l** 内耳正円窓に局所投与する。術後、自発眼振が消失し平衡機能障害が生じたことを確認し、術後1週間目に氷水を用いたカロリックテストにて眼振の誘発がなく末梢平衡機能が廃絶したことを確認する。その後、卵円窓近傍の内耳骨包に小開窓を行い、我々のグループで用いたマイクロカニューレ (**Kamiya et al. Am J Pathol, 2007**) を用い **MSC** を移植する。**MSC** は、市販されている **GFR** ラット (**S-D** ラット、日本クレア) から採取したものをを用い、先に述べた **Kamiya** の方法で採取、培養を行う。**GFP** にてマーキングがされているため、移植後容易に移植細胞の同定できる。移植手術後2週間で、再び氷水を用いたカロリックテ

ストにて眼振の誘発の有無を確認しその持続時間を測定し、無処置である対側のカロリックテストの結果を比として末梢平衡機能を定量する。さらに、ビデオカメラを用い **head tilt** および **swim test** を経時的に観察し、中枢代償機能も加味した行動観察を行う。さらに本モデルに対して、組織学的な検討を行う。**MSC** を移植し2週間後のラットで組織切片による卵形嚢、および半規管膨大部を光学顕微鏡下に組織所見を詳細に検討する。より詳細な組織所見を得るため、解剖する際は緩衝液で全身を貫流した後、グルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒドの混合液で全身を灌流固定した後、内耳を摘出。**EDTA** にて脱灰後、**OSMIUM** にて後固定を行い **EPON812** にて包埋し、ガラスナイフにて切片を作成、トルイジンブルーで染色を行い光学顕微鏡下の観察を行う。また、ダイヤモンドナイフにて薄切切片を作成し、透過型電子顕微鏡を用い前庭器のさらに詳細な組織変化の観察を行う。また、パラホルムアルデヒドによる固定を行い、パラフィンで包埋を行った検体について免疫組織化学的検討を行う。まず、移植を行った **GFP** ラットの **MSC** が発する蛍光を確認することで、移植細胞の局在と前庭感覚上皮への生着数の定量を行う。さらに、移植細胞の有毛細胞への分化を確認するため、有毛細胞のマーカーを免疫染色にて確認する。また、**MSC** の有毛細胞への分化を確認するために球形嚢および外側半規管の膨大部を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定したものをプラチナで蒸着し、走査型電子顕微鏡を用いて感覚毛の観察を行う。感覚毛の密度を定量的に評価し、解剖前に観察したカロリックテストおよび **head tilt** と **swim test** との相関を検討する。

4. 研究成果

従来我々の施設で使用している **3-nitropropionic acid(3-NP)** を用いた急性内耳エネルギー不全モデルラットを用いた。これまでの報告通り (**Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007, Hoya et al. Neuroreport, 2004**) **S-D** ラットに対して全身麻酔下に **500mM** の **3-NP** を **3 μ l** 内耳正円窓に局所投与した。術後、自発眼振が消失し平衡機能障害が生じたことを確認し、術後1週間目に氷水を用いたカロリックテストにて眼振の誘発がなく末梢平衡機能が廃絶したことを確認した。さらに、手術後1週間で全身麻酔下に内耳を摘出し、組織標本を作製したところ、球形嚢・卵形嚢・半規管膨大部のいずれの部位においても、高

度の有毛細胞脱落が生じることが確認され、細胞移植動物モデルとして極めて適した性質を持っていることが確認できた。

その後、骨髄間葉系幹細胞細胞を外側半規管より行った。移植に先立ち外側半規管からの人工リンパ液の灌流において特に平衡・聴覚障害を認めず、本方法が内耳に対して低侵襲であることが確認された。移植により、内耳外リンパ腔内へ広範な移植細胞の生着を認めたが、内リンパ腔への移植細胞の移行はごく少数しか認められなかった。細胞移植後の平衡機能検査では、氷水を用いたカロリックテストにて術後も眼振の誘発がなく、現時点で明らかな機能回復を認めることはできなかった。今後、さらに投与方法や移植細胞の種類を検討する必要があると思われた。

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 8 件)

Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, Mizutari K, Fujii M, Matsunaga T.

Enhanced expression of C/EBP homologous protein (CHOP) precedes degeneration of fibrocytes in the lateral wall after acute cochlear mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid.
Neurochem Int. 2010 Feb;56(3):487-94.

Saito H, Nishiwaki Y, Michikawa T, Kikuchi Y, Mizutari K, Takebayashi T, Ogawa K.
Hearing handicap predicts the development of depressive symptoms after 3 years in older community-dwelling Japanese.
J Am Geriatr Soc. 2010 Jan;58(1):93-7.

Michikawa T, Nishiwaki Y, Kikuchi Y, Nakano M, Iwasawa S, Asakura K, Milojevic A, Mizutari K, Saito H, Ishida S, Okamura T, Takebayashi T.
Gender-specific associations of vision and hearing impairments with adverse health outcomes in older Japanese: a population-based cohort study.

BMC Geriatr. 2009 Nov 22;9:50.

Michikawa T, Nishiwaki Y, Kikuchi Y, Hosoda K, Mizutari K, Saito H, Asakura K, Milojevic A, Iwasawa S, Nakano M, Takebayashi T.
Serum Levels of Retinol and Other Antioxidants for Hearing Impairment Among Japanese Older Adults.

J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009 Aug;64(8):910-5.

Mizutari K, Tsunoda K, Matsunaga T, Masuda K, Fujii R, Fujii M.
Oropharyngeal tuberculosis
Internal Medicine Journal 2008 ; 38(6) : 449-450.

水足邦雄

補聴器の最新知見「インテリジェンス補聴器」 特集、補聴器と人工内耳-最近の進歩と将来展望-
JOHNS 2008 ; 24(9) : 1307-1311.

水足邦雄、齊藤秀行、神崎晶、鈴木隆史、大石直樹、岡本康秀、栗田昭宏、井上泰宏、小川郁

耳科手術における周術期レボフロキサシン経口投与の有用性と適応の検討
Otology Japan 2008 ; 18(2) : 120-125.

水足邦雄

補聴器 -補聴器の最近の進歩- 図説 感覚器疾患シリーズ No. 5
医療 2008 ; 62(5) : 302-305.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 1 件)

水足邦雄

「12. 中等度難聴児にふさわしい補聴器」

小児の中等度難聴ハンドブック、編集：加我
君孝、内山勉、新正由紀子
金原出版、2009、pp87-93.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kankakuki.go.jp/lab_c-1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水足 邦雄 (MIZUTARI KUNIO)

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・研究員

研究者番号：40338140