

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791903

研究課題名(和文) ES細胞由来神経幹細胞を用いた、虚血性難聴に対する革新的な再生療法の開発

研究課題名(英文) Innovative regenerative medicine of hearing loss after cochlear ischemia by embryonic stem cells

研究代表者

高木 太郎 (Takagi, Taro)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20601024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：今回、一過性内耳虚血モデルに対し骨髄単核球細胞を静脈内投与し、内耳障害に対する抑制効果を検討した。ABR閾値変化や内毛細胞脱落割合の結果から、細胞投与群は内耳障害が軽微であった。投与された細胞の局所存在を検討した結果、主に蝸牛軸に存在したが、コルチ器周辺には存在しなかったことから、有毛細胞へ分化転換した可能性や、有毛細胞と細胞融合により保護効果を示した可能性は低いと考えられた。そこで局所の栄養因子の発現をウエスタンブロット解析にて評価したところ、GDNFとNT-3の発現が細胞投与群では有意に上昇していた。これらのことより、細胞が栄養因子を分泌して内耳障害抑制に働いた可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the influence of HSCs on progressive hair cell degeneration after transient cochlear ischemia in gerbils. Transient cochlear ischemia was produced by extracranial occlusion of the bilateral vertebral arteries. HSCs were administered via femoral vein. Transplanted cells were confirmed in the spiral modiolar artery but was not found in the organ of Corti. Sequential changes in hearing were assessed by ABR. HSCs group was significantly decreased ABR threshold shift compared to the control group. The average ratio of dead/intact cells of inner hair cells was significantly smaller in the HSCs group than control group. The increasing of trophic factors protein level in the organ of Corti in the HSCs group indicated that HSCs upregulated the trophic factors. The intravenous injected HSCs could prevent hair cell degeneration and ameliorate hearing impairment. These results suggested that HSCs had therapeutic potential possibly through paracrine effects.

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：内耳再生 ES細胞 突発性難聴

1. 研究開始当初の背景

突発性難聴は急激に発症して高度の感音難聴をきたす疾患であり、我が国では年間約25000人が罹患する。感音難聴の多くは内有毛細胞に障害がみられ、哺乳類においては出生後は一度障害されると再生しないとされ、感音難聴の治療は不可能と考えられてきた。

2. 研究の目的

従来治療不可能とされた感音難聴を治療する唯一の手段が幹細胞を用いた内耳再生治療と考えられる。近年、内耳前駆細胞や神経幹細胞、胚性幹細胞などの移植により内耳有毛細胞が再生することが報告されている。以前、我々は一過性内耳虚血モデル動物に対し、造血幹細胞を蝸牛内へ投与することで、内耳障害が抑制されることを報告した。しかし、蝸牛への局所投与では臨床で応用する際に内耳障害を合併する危険性があり、今回、静脈からの全身投与の治療効果について検討した。

3. 研究の方法

一過性内耳虚血モデル動物に対し、幹細胞や種々の幼若な細胞を含む、骨髄単核球細胞群を大腿静脈より全身投与し、組織学的、機能的に治療効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨髄単核球細胞の局在: PKH67 陽性細胞は迷路動脈やらせん動脈の内腔にみられたが、コルチ器や周辺組織への侵入像や融合像はみられず、有毛細胞と置換や融合することはなかった (図4)。

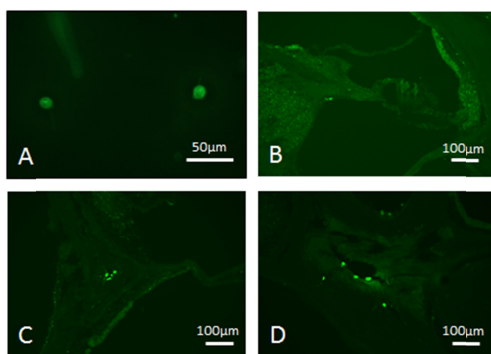


図4. 骨髄単核球細胞の局在

(2) ABR 閾値変化: 虚血前の ABR 閾値を 0dB として、ABR 閾値変化について比較検討した。8000、16000Hz においては、

1、4、7 日後いずれにおいても骨髄単核球細胞投与群では control 群と比較して、ABR 閾値の上昇を有意に抑制していた。32000Hz においては、1、4 日後は有意差がみられたが、7 日後のみ有意差がみられなかった (図1)。

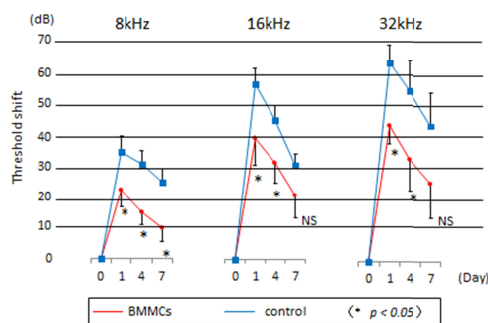


図1. ABR 閾値変化の推移

(3) 内有毛細胞の脱落割合: 骨髄単核球細胞投与群と control 群において、内有毛細胞の核の消失と聴毛の脱落所見を観察したところ、control 群と比較して幹細胞投与群では内有毛細胞の脱落割合が有意に抑制されていた (図2、3)。

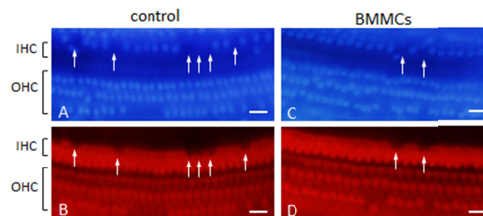


図2. 有毛細胞の脱落

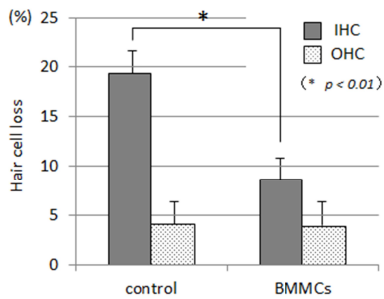


図3．有毛細胞の脱落率

(4) 神経栄養因子蛋白の発現：栄養因子について発現の有無をウエスタンブロット解析にて検討したところ、GDNF と NT-3 の発現量が、骨髄単核球細胞投与群では有意に上昇していた（図5）。

今回の実験では、虚血負荷直後に骨髄単核球細胞を静脈内投与し、内耳障害に対する抑制効果を検討した。ABR 閾値変化や内有毛細胞脱落割合の結果から、骨髄単核球細胞投与群は control 群よりも内耳障害が軽微であり、虚血性内耳障害を保護する効果をもつことが確認された。骨髄単核球細胞による内耳保護作用効果のメカニズムは明らかではないが、投与された細胞の局所存在を検討した結果、主に蝸牛軸に存在したが、コルチ器周辺には存在しなかったことから、有毛細胞へ分化転換した可能性や、あるいは有毛細胞と細胞融合により保護効果を示した可能性は低いと考えられた。このため、骨髄単核球細胞による虚血性内耳障害のメカニズムとして、投与された細胞が局所にて栄養因子を分泌し、その作用によって内耳障害を保護すると

ということが予想された。そこで、神経栄養因子の発現をウエスタンブロット法を用いて解析したところ、実際に GDNF と NT-3 の2種類の神経栄養因子の発現が骨髄単核球細胞投与群では有意に上昇していた。これらのことより、静脈内投与された骨髄単核球細胞が蝸牛軸まで到達し、神経栄養因子を分泌することで虚血性内耳障害に対する保護効果を発揮したと考えられた。

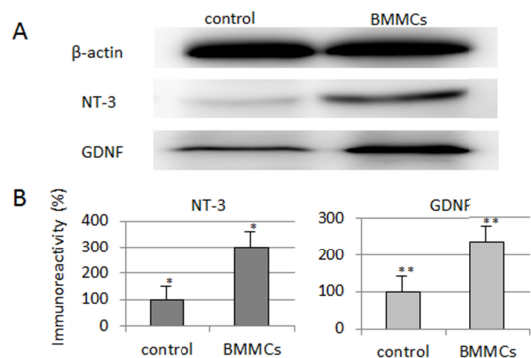


図5．ウエスタンブロット法による神経栄養因子の評価

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

— Taro Takagi, Tadashi yoshida, Nobuhiro Hakuba, Naohito Hato, Kiyofumi Gyo, Hematopoietic stem cells prevent hair cell death after transient cochlear ischemia, 29th Politzer society meeting, 2013年11月14日~2013年11月17日, Susesi Resort(Antalya, Turkey)

- 高木 太郎、吉田 正、白馬 伸洋、暁 清
文、虚血性内耳障害に対する造血幹細胞静脈
内投与の効果、第 58 回日本聴覚医学会、
2013 年 10 月 24 日～2013 年 10 月 25 日、ホ
テルブエナビスタ（長野県松本市）

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 太郎 (Takagi, Taro)
愛媛大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：20601024

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし