

## 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：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791948

研究課題名(和文) 幹細胞移植による内耳再生における細胞間接着調節因子の有用性

研究課題名(英文) The use of junctional modulators for stem cell insertion into the auditory epithelium

研究代表者

上田 祥久 (Ueda, Yoshihisa)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20299415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：前年度までに細胞間隙を開大する効果をH89で確認した。H89で開大された細胞間隙を足場に移植細胞が生着するか確認した。

ハートレー系モルモットを用い、幹細胞移植前5日に難聴モデルを作成した。移植細胞としてマウス由来ES細胞を用いた。H89注入15分後、5 $\mu$ LのES細胞(濃度1000cells/ $\mu$ L)を注入した。移植後1, 2, 4週間後に蝸牛を摘出し、凍結切片を作成した。免疫染色は一次抗体としてOct3/4、二次抗体としてAlexa 594、核染色としてDAPIを用いた。顕鏡の結果、蝸牛基底回転、蝸牛階に少数の上皮内に侵入する移植細胞が確認されたが、いずれも2-3個と少数であった。

研究成果の概要(英文)：Pigmented guinea pigs were used and deafened 5 days prior to the implantation. All guinea pigs were implanted with mouse embryonic stem cells. Inoculation of tight junction modulator H89 and transplantation of mouse embryonic was injected into the the scala media through a cochleostomy in the second turn of the cochlea. Fifteen minutes after the inoculation of H89, five microL of ES cells at a concentration of 1000cells per 1 microL was injected.

1, 2, 4 weeks after transplantation, the cochlea were carefully removed. Cryostat sections were cut at 10 $\mu$ m thick. All sections were immunostained by Oct3/4, Alexa 594 and DAPI. A couple of implanted cells were observed in the scala media at basal turn under the confocal microscopy.

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：移植・再生医療 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

### 学術的背景

高度な内耳障害を受けた内耳有毛細胞の変性は不可逆的で自発的に有毛細胞が再生することは不可能である。病理学的には高度に障害された内耳有毛細胞や支持細胞は消失し、flat epithelium と呼ばれる平坦な上皮に変性している (Merchant et al 2005)。

Flat epithelium となった内耳感覚上皮の再生の戦略として幹細胞移植による細胞置換法が考えられる。Coleman et al (2006) はマウス由来幹細胞をモルモットの内耳に移植し、移植された幹細胞の生存率について検討している。移植された幹細胞は最大 4 週間後まで生存が確認されているが、生存細胞数は 2 週間後と比べ 4 週間後では有意に減少している。また、生存する移植細胞は鼓室階上皮と接してはいるもののリンパ液内に浮遊しており、上皮内に侵入していない。これが長期生存率を低下させている最大の要因と考えた。

また、Ito et al (2001) et al は神経由来幹細胞をラットの内耳に移植し、数個の移植された幹細胞は内耳上皮内に侵入し、形態学的に内耳有毛細胞様に分化したことを報告している。本報告で適切な部位に侵入した幹細胞は本来あるべき細胞に分化する傾向を有すると報告しており、生存率向上のみならず、目的の細胞への分化誘導のためにも移植した幹細胞の上皮内への侵入は、幹細胞移植を成功させるうえで重要な戦略であると考えられる。

そこで細胞間接着 (Tight Junction、以下 TJ) に着目した。TJ は隣接する細胞・細胞間を密に接着させ、上皮の paracellular barrier を形成している。TJ の研究は皮膚・口腔・咽頭・消化管の上皮から薬物吸収率を向上させる目的や通過不可能な脳血液関門 BBB などの膜透過性向上を目的とし、特に薬理学の領域で盛んに研究されて

いる。TJ を調整する signaling pathway や TJ Modulators に関する研究は進歩しており、signaling pathway を TJ Modulators を用いて操作することで paracellular barrier を開放させることが可能となってきている。この知識を内耳における幹細胞移植に応用し、開放された細胞間隙を移植の足場とし、移植された幹細胞の上皮への侵入を可能にできると仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

内耳再生を目的に蝸牛内に移植された幹細胞の生存率向上が目的である。

幹細胞移植による内耳再生の試みは多く見られるが、移植された幹細胞の長期生存率は依然低い。そこで細胞間接着調節因子 (Tight Junction Modulator; 以下 TJ modulator) を用い、細胞間接着 (Tight Junction; 以下 TJ) を一時的に離脱させ、この細胞間隙を移植の足場とし、幹細胞が上皮間に侵入し生着させることで生存率向上を図る。

## 3. 研究の方法

### (内耳組織培養による研究)

生後 2 日の CD-1 マウスから蝸牛組織を摘出し、コラーゲンゼル (Collagen type I、Basal Medium Eagle、Sodium Carbonate) 上に置き、培養液 (DMEM、10% Fetal Bovine Serum、1% Penicillin G) で培養した (37℃、5% CO<sub>2</sub>)。内耳障害モデルを作成するため、培養 2 日目に 0.5mM ゲンタマイシンを含有した培養液で 24 時間培養する。その後ゲンタマイシン含有培養液を完全除去した。更に通常の培養液で 2 日間培養し、培養内耳組織を TJ modulators で処置する。TJ modulators として H89、Sodium Caprate、EGTA、を用い、最適薬剤、濃度を検討した。

### 1. 細胞間隙開大の観察

前述の TJ modulators による処置直後に

4%ホルマリンで1時間固定し、免疫染色した。

## 2. 移植細胞の上皮内侵入の観察

前述の TJ modulators による処置後に、培養組織を mCherry 細胞と共に 24 時間培養した。その後 PBS にて 3 回洗浄し、生着していない mCherry 細胞を除去した後、免疫染色した。

### 染色方法

一次抗体として ZO-1(1:500、4、overnight)を用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488 (1:200、室温、30分)を用い、蛍光顕微鏡下に観察した。

### (in vivo 研究)

ハートレー系モルモット(300-500g)を使用した。全ての動物は幹細胞移植前5日にネオマイシンを用いて難聴モデルを作成した。

### 難聴モデルの作成

Ketamine と xylazine で沈静した後、1% lidocaine を耳後部に注入し、側頭骨を露出した。経正円窓で 10% neomycin 10 $\mu$ L (5  $\mu$ L / 分) を注入した。

### 移植幹細胞

マウス由来 ES 細胞 N7K9 (pUS2-eGFP-Hyg) を移植細胞とした (Dr Reyes, University of Michigan) より提供)。同細胞は移植後同定を可能にするため、EGFP が遺伝子導入されている。

### TJ modulators 注入と幹細胞移植

顎下部からアプローチして中耳腔を開放し、蝸牛第二回転・蝸牛階に cochleostomy を行い、1 $\mu$ L / 分の速度で TJ modulators を注入した。TJ modulators は先の実験で細胞間隙開大効果が確認された H89 を用いた。TJ modulators 注入15分後、5  $\mu$ L の ES 細胞 (濃度 1000cells/ $\mu$ L) を同部位から注入した。移植後蝸牛開窓部は carboxylate cement (Duleron) にて閉鎖した。

## Tissue preparation

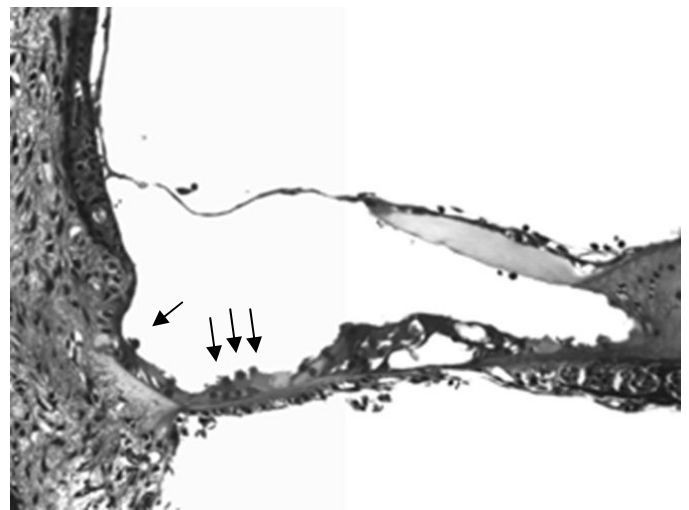
移植後 1, 2, 4 週間後に PBS と 4% PFA で全身環流固定を行い、蝸牛を丁寧に摘出し、更に 4 時間 4% PFA で固定した。10% EDTA で脱灰後 (4 $^{\circ}$ C、10 日間) 10 $\mu$ m 厚で凍結連続切片を作成した。5 切片毎、蛍光抗体にて染色した。

### 免疫染色

PBS で洗浄後、0.3% Triton X-100、5% goat serum で前処置を行った。一次抗体として Oct3/4 (1:500、overnight、4 $^{\circ}$ C) を用いて染色した。PBS で洗浄し、二次抗体として Alexa 594 phalloidin (1:200、30分、室温) を用いた。DAPI にて核染色し顕鏡した。サンプルは蛍光顕微鏡、confocal microscopy で観察した。

## 4. 研究成果

顕鏡の結果、蝸牛基底回転、蝸牛階に少数の上皮内に侵入する移植細胞が確認されたが、いずれも 2-3 個と少数であった。



## 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)

[学会発表](計 1 件)

上田祥久、Raphael Yehoash、中島 格

「幹細胞移植による内耳再生における細胞間接着調節因子の有用性」

平成 23 年 5 月 19 日 日本耳鼻咽喉科学会総会 (京都) にて発表。

6. 研究組織

( 1 ) 研究代表者

上田祥久 ( Ueda Yoshihisa )

久留米大学医学部講師

研究者番号 : 20299415