

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462645

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞を用いた虚血性難聴に対する新規の再生治療法の開発

研究課題名(英文) Protective effects of bone marrow-derived mononuclear cells in young gerbils on ischemic cochlear damage

研究代表者

阪中 雅広 (Sakanaka, Masahiro)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60170601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：成人末梢血中に存在する骨髄由来のCD34陽性細胞が血管内皮前駆細胞であり、この前駆細胞が加齢に伴い減少すると虚血性疾患の原因になることが明らかとなってきた。そこで、本研究では幼年期の砂ネズミより採取した骨髄単核球が、虚血性内耳障害を軽減させる効果があるかどうかを老齢砂ネズミ虚血性内耳障害モデルを用いて検討した。その結果、幼若骨髄単核球移植群で老齢骨髄単核球投与群に比して有意に内耳虚血保護効果を認めた。更にCD34陽性細胞を除外した骨髄単核球を移植してもやはり有意に保護効果を認めた。従って幼若骨髄単核球移植による内耳虚血保護効果はCD34陽性細胞以外の要因による可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells have been reported to be originated from bone marrow-derived mononuclear cells (=BMCs) and implicated in homeostasis of the microvasculature. Decreased levels of circulating endothelial progenitor cells, associated with aging correlate with poor clinical outcomes in a range of cardiovascular diseases. Herein, we transplanted BMCs from young animals (=yBMCs) or aged animals (=aBMCs) into aged gerbils. Aged gerbils transplanted with yBMCs after ischemia significantly reduced ischemic cochlear damage comparing with animals transplanted with aBMCs. Furthermore, aged gerbils transplanted with yBMCs depleted of CD34 positive cells after ischemia also reduced ischemic cochlear damage. Although further investigations must be required to elucidate the fundamental mechanism underlying senescence of the vasculature, our results shows the possibility that factors other than CD34 have protective effects on ischemic cochlear damage.

研究分野：神経科学

キーワード：内耳虚血 幹細胞 再生医療

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

## 【1】研究開始当初の背景

従来成体の血管形成は、既存の成熟血管内皮細胞が増殖・遊走して新たな血管を作り出す血管新生 (angiogenesis) という概念が中心であった。しかしながら成人の末梢血単核球分画から単離された CD34 陽性細胞が血管内皮細胞に分化することが発見され、成人末梢血中には血管内皮細胞に分化しうる CD34 陽性の血管内皮前駆細胞が存在することが明らかとなった (Science 275: 964-967, 1997)。更に胎生期にのみ認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) が、成体においても同様に認められ、局所で血管内皮前駆細胞が増殖・分化し、新たな血管形成に係わっていることが明らかとなった (Nat Med. 5: 434-438, 1999)。

その後の研究により、CD34 陽性の血管内皮前駆細胞は骨髄単核球分画に存在し、骨髄単核球を移植すると虚血組織の血管新生を誘導できることが明らかとなった (Circulation. 103: 897-903, 2001)。その結果自己骨髄単核球を用いた再生治療が、虚血性心疾患や末梢動脈閉疾患に対する新たな再生療法として確立されている。例えば急性期心筋梗塞患者に自己骨髄単核球を投与した臨床試験では、血管系を介する自己修復機構の促進により、慢性期に心機能が向上し、死亡率が低下することが報告されている (Am J Cardiol. 98:597-602, 2006)。以上より骨髄単核球を用いた再生治療が様々な虚血性疾患に応用が可能であることが示唆されている。最近の知見では、骨髄単核球は均一な細胞ではなく、前述の血管内皮前駆細胞以外にも造血幹細胞等の種々の骨髄系幹細胞が含まれていることが明らかとなっている。そしてこれらの骨髄系幹細胞を移植すると、虚血領域での血管発生 (vasculogenesis) 効果や、サイトカインや増殖因子の分泌による血管新生 (angiogenesis) 効果 (即ち、既存の血管内皮細胞の増殖・遊走を促進する効果)、更に組織再生効果もあることが確認され、虚血障害が改善することが動物実験レベルで明らかになってきている。

## 【2】研究の目的

骨髄単核球移植による虚血改善効果は、基本的に移植する血管内皮前駆細胞の数 (CD34 陽性細胞の数) に依存することが知られている (PNAS USA 97:3422-3427, 2000)。従ってより多くの血管内皮前駆細胞を確保・投与することが一定の治療効果を得るためには必要と考えられている。しかしながら実際に治療を受ける患者は高齢であったり、種々の基礎疾患を持っている場合が多い。そして加齢と共に骨

髄幹細胞の数が減少し、その機能も低下していくことが知られている (Curr Mol Med. 8:754-67, 2008)。そこで本研究では幼年期の砂ネズミより採取した幼若な骨髄単核球を用いた細胞治療が虚血性内耳障害を軽減させる効果があるかどうかを、老齢砂ネズミ虚血性内耳障害モデルを用いて検討し、その内耳保護機構を解明することを目的とする。

## 【3】研究の方法

### (1) 動物

本実験には4週、10ヶ月齢の砂ネズミ (Meriones unguiculatus) を用いた。実験動物を一定の明暗サイクル及び温度 ( $22 \pm 1$ ) 条件下に飼育し、餌と水は自由摂取とした。以下の実験は愛媛大学医学部倫理委員会の承諾を得た後、愛媛大学医学部動物実験指針に則り行なった。

### (2) 一過性内耳虚血の作成

内耳虚血は Hata 等の方法 (Neuroscience 56:423-439, 1993) に準じて行なった。生後10ヶ月の老齢砂ネズミに挿管・麻酔後、両側の椎骨動脈を椎体の横突起に入り込む位置で剥離し、一過性に両側椎骨動脈の血流を遮断し、内耳虚血を作成した。

### (3) 聴性脳幹反応 (ABR) の閾値測定

ABR の音刺激としては、8kHz のトーンバースト (立ち上がり、立ち下り時間各 0.5ms、持続時間 10ms) を用い、ビニール製のチューブイヤホンを直接外耳道に密着させることによって、閉鎖系で刺激音を与えた。導出された ABR は信号処理装置 (Synax1200, NEC) にて増幅後、300 回の加算を行なった。

### (4) 内耳有毛細胞の染色

耳胞を取り出した後、前庭窓および蝸牛窓を開窓し、蝸牛頂回転に設けた小孔より 4% パラホルムアルデヒドにて局所灌流固定を施行した。さらに同液にて2時間浸漬固定後、実体顕微鏡下に surface preparation にてコルチ器を採取した。得られた標本を Rhodamine-phalloidin および Hoechst33342 で二重染色し、脱落した有毛細胞の割合を評価した。

### (5) 骨髄単核球の採取

生後4週または10ヶ月齢の砂ネズミの大腿骨と脛骨より骨髄液を採取し、Ficoll- Isopaque 法 (J Cereb Blood Flow Metab. 31: 855-67, 2011) により、骨髄単核球を分離した。生後4週目の砂ネズミより採取した骨髄単核球を幼若骨髄単核球 (young-BMM) とし生後10ヶ月目の砂ネズミより採取した骨髄単核球を老齢骨髄単核球 (aged-BMM) とした。

### (6) FACSsort による、骨髄単核球からの CD34 陽性細胞の除去

The BD™ Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Isolation Kit (BD biosciences) を用いて FACSsort (FACS Aria III sorter, BD biosciences) を行い、CD34 陽性細胞を分離し、CD34 陽性細胞を除外した骨髄単核球を集めた。

### (7) 統計的処理

各分析データは2群の比較に関してはStudent T検定を行い、他群間の解析に関してはOne way 又はTwo way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison testにて評価し、p値が0.05以下を有意とした。全てのデータはmean ± SDにて表記した。\*はp<0.05を、NSは有意差なしを表す。

### 【4】研究成果

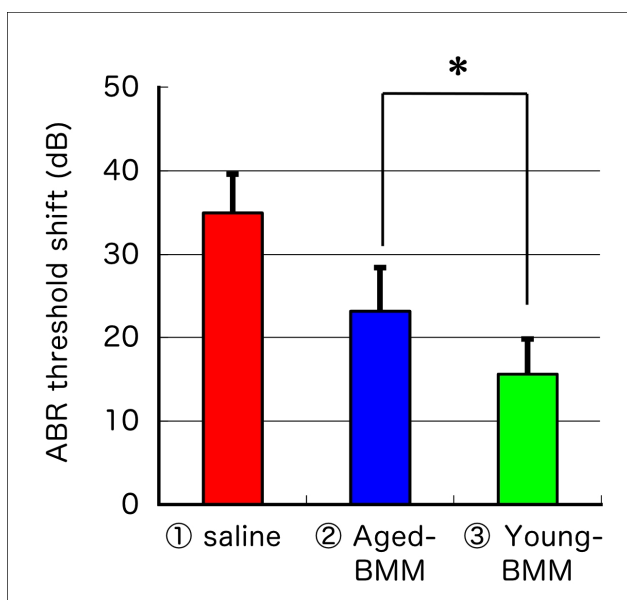
#### (1) 幼若骨髄単核球 (Young-BMM) による内耳虚血保護効果

15分間の内耳虚血負荷を与えた後、血流再開後30分目に、骨髄単核球の移植を行った。具体的には、採取した幼若骨髄単核球と老齢骨髄単核球を、生理食塩水(saline)に $1 \times 10^6$  cells/mlで溶解し、0.2mlを大腿静脈から20分かけて静脈内投与を行った。

聴性脳幹反応(ABR)の閾値測定は、内耳虚血負荷後7日目に行なった。

その結果、生理食塩水単独投与群(saline)に比して、幼若骨髄単核球投与群(young-BMM)と老齢骨髄単核球投与群(aged-BMM)では有意にABR閾値の上昇が抑制され、更に老齢骨髄単核球投与群(aged-BMM)より若骨髄単核球投与群(young-BMM)の方が有意に閾値上昇が抑制された(図1)。

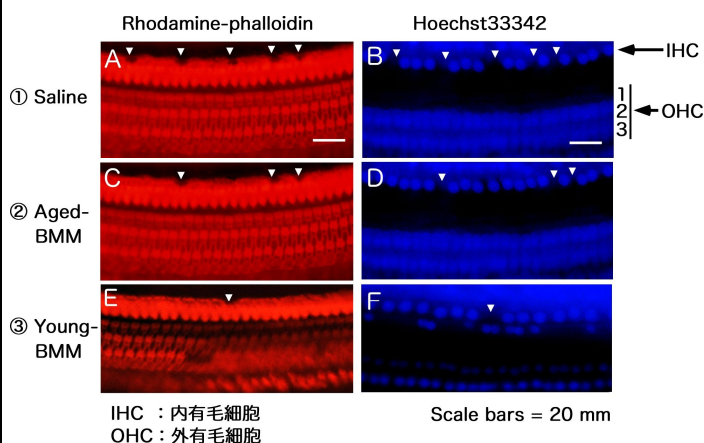
#### 図1：幼若(young)及び老齢(Aged)骨髄単核球移植の、一過性内耳虚血7日目におけるABR閾値変化への作用



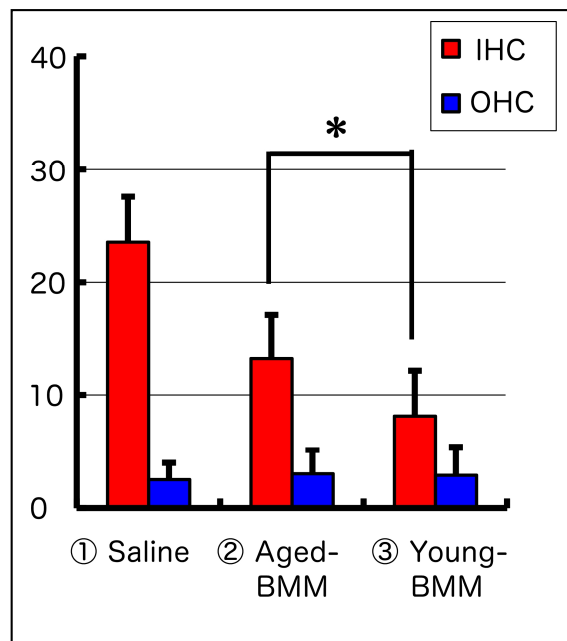
更にABRの閾値測定後に、麻酔薬の過剰投与を行った。その後耳胞を取り出し、surface preparationにてコルチ器を採取した。採取した組織をRhodamine-phalloidinおよびHoechst33342で二重染色し、脱落した有毛細胞の割合を評価した。その結果、ABR閾値の結果と同様に、生理食塩水単独投与群(saline)に比して、幼若骨髄単核球投与群

(young-BMM)と老齢骨髄単核球投与群(aged-BMM)では有意に内耳虚血による内有毛細胞死が抑制され、更に老齢骨髄単核球投与群(aged-BMM)より若骨髄単核球投与群(young-BMM)の方が有意に抑制効果を認めた(図2, 3)。

#### 図2：一過性内耳虚血7日目における内有毛細胞と外有毛細胞の組織像



#### 図3：幼若(young)及び老齢(Aged)骨髄単核球移植の、一過性内耳虚血7日目における内有毛細胞死への作用



#### (2) CD34欠損幼若骨髄単核球 (Young-BMM) による内耳虚血保護効果の検討

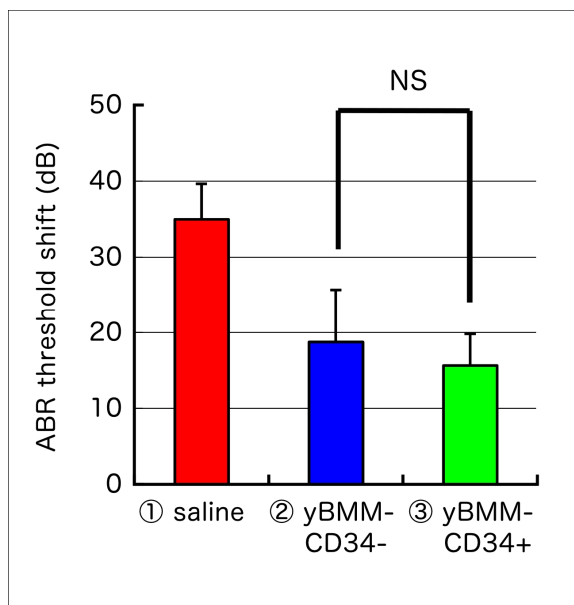
15分間の内耳虚血負荷を与えた後、血流再開後30分目に、CD34欠損幼若骨髄単核球の移植をおこなった。

聴性脳幹反応(ABR)の閾値測定は、内耳虚血負荷後7日目に行なった。

その結果、CD34欠損幼若骨髄単核球投与群(yBMM-CD34-)と幼若骨髄単核球投与群

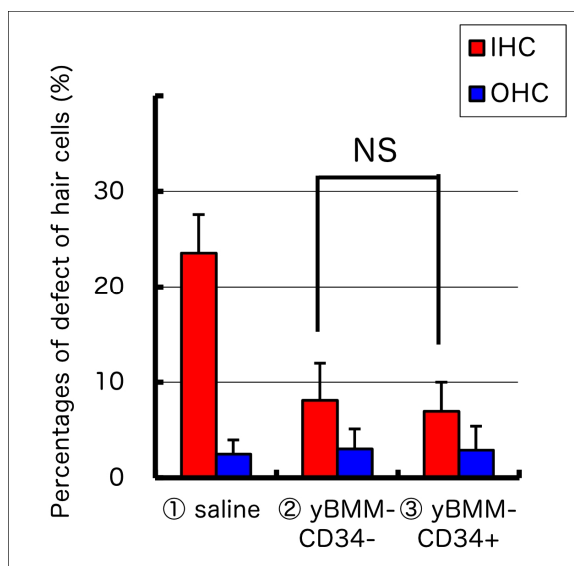
(yBMM-CD34+) では内耳虚血による ABR 閾値の上昇に差を認めなかった (図 4)。

**図 4 : CD34 を含まない幼若骨髄単核球移植群 (yBMM-CD34-) と CD34 を含む幼若骨髄単核球移植群 (yBMM-CD34+) の、一過性内耳虚血 7 日目における ABR 閾値変化への作用**



更に ABR の閾値測定後に施行した組織学的検査でも、CD34 欠損幼若骨髄単核球投与群 (yBMM-CD34-) と幼若骨髄単核球投与群 (yBMM-CD34+) では内耳虚血による内毛細胞死に有意差を認めなかった (図 5)。

**図 5 : CD34 を含まない幼若骨髄単核球移植群 (yBMM-CD34-) と CD34 を含む幼若骨髄単核球移植群 (yBMM-CD34+) の、一過性内耳虚血 7 日目における内毛細胞死への作用**



### ( 3 ) 結語

骨髄単核球は内耳虚血に対する神経保護効果を持ち、その作用は老齡骨髄単核球より幼若骨髄単核

球の方がより強力であることが明らかとなった。

骨髄単核球は内耳虚血に対する神経保護効果を持つが、その作用は必ずしも CD34 陽性の血管内皮前駆細胞によるものではないことが、示された。

骨髄単核球の内耳虚血に対する神経保護効果は CD34 陽性以外の幹細胞の作用による可能性だけでなく、各種栄養因子の分泌など様々な分子機構の可能性が考えられ、CD34 陽性以外の幹細胞の機能を検討するだけでなく、栄養因子の発現量の検討を含め多角的な検討が必要であると考えられた。

### 【 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 32 件 )

全ての論文査読有

01) Sakai K, Senda T, Hata R, Kuroda M, Hasegawa M, Kato M, Abe M, Kawaguchi K, Nakai S, Hiki Y, Yuzawa Y, Kitaguchi N. Patients that have Undergone Hemodialysis Exhibit Lower Amyloid Deposition in the Brain: Evidence Supporting a Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease by Removal of Blood Amyloid. J Alzheimers Dis. 51: 997-1002, 2016

02) Zhu P, Hata R, Nakata K, Cao F, Samukawa K, Fujita H, Sakanaka M. Intravenous infusion of ginsenoside Rb1 ameliorates compressive spinal cord injury through upregulation of Bcl-xL and VEGF. Int J Neurol Neurother. 2: 2-7, 2015

03) Kimura Y, Sumiyoshi M. Antitumor and antimetastatic actions of dihydroxycoumarins (esculetin or fraxetin) through the inhibition of M2 macrophage differentiation in tumor-associated macrophages and/or G1 arrest in tumor cells. Eur. J Pharmacol. 746: 115-125, 2015

04) Kimura Y, Sumiyoshi M, Usuki K. Effects of Agaricus blazei extract plus lactoferrin or lactoferrin alone on tumor growth and UFT-induced adverse reactions in sarcoma 180- or highly metastatic osteosarcoma LM8-bearing mice. Nat. Prod. J. 5: 57-69, 2015

05) Sei H, Taguchi A, Nishida N, Hato N, Gyo K. Expression of atrophy-related transcription factors in the process of intrinsic laryngeal muscle atrophy after denervation. European Archives of Oto-Rhino-Laryngolog 272: 137-141, 2015

06) Sei H, Taguchi A, Nishida N, Hato N, Gyo K. Preventive effects of bortezomib on denervation-induced atrophy of the intrinsic laryngeal muscles: an experimental study in the rat. Acta Otolaryngol 135: 713-717, 2015

07) Hakuba N, Hato N, Okada M, Mise K, Gyo K. Preoperative factors affecting tympanic membrane regeneration therapy using an atelocollagen and basic fibroblast growth factor. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 141: 60-66, 2015

- 08) Kobayashi T, Gyo K, Komori M, Hyodo M. Efficacy and Safety of Transcanal Endoscopic Ear Surgery for Congenital Cholesteatomas: A Preliminary Report. *Otol Neurotol* 36: 1644-1650, 2015
- 09) Sumiyoshi M, Sakanaka M, Taniguchi M, Baba K, Kimura Y, Anti-tumor effects of various furocoumarins isolated from the roots, seeds and fruits of *Angelica* and *Cnidium* species under ultraviolet A irradiation, *J Nat Med*. 68: 83-94, 2014
- 10) Kimura Y, Sumiyoshi M, Kobayashi T. Whey peptide prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin aging in melanin-possessing male hairless mice, *J. Nutr*. 144: 27-32, 2014
- 11) Okada M, Gyo K, Takagi T, Fujiwara T, Takahashi H, Hakuba N, Hato N. Air-bone gap in ears with a well-repaired tympanic membrane after Type and Type tympanoplasty. *Auris Nasus Larynx* 41: 153-159, 2014
- 12) Hakuba N, Fujiwara T, Hato N, Gyo K. Gelatin hydrogel with basic fibroblast growth factor for tympanic membrane regeneration. *Otol Neurotol* 35: 540-544, 2014
- 13) Takagi T, Gyo K, Hakuba N, Hyodo J, Hato N. Clinical features, presenting symptoms, and surgical results of congenital cholesteatoma based on Patsis staging system. *Acta Oto-Laryngologica* 134: 462-467, 2014
- 14) Takagi T, Yoshida T, Okada M, Hata R, Hato N, Gyo K, Hakuba N. Intravenous administration of bone marrow mononuclear cells alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroreport*. 25: 807-813, 2014
- 15) Nakashima T, Sato H, Gyo K, Hato N, Yoshida T, Shimono M, Teranishi M, Sone M, Fukunaga Y, Kobayashi G, Takahashi K, Matsui S, Ogawa K. Idiopathic sudden sensorineural hearing loss in Japan. *Acta Oto-Laryngologica* 134: 1158-1163, 2014
- 16) Hato N, Fujiwara T, Gyo K, Yanagihara N. facial nerve grading system as a prognostic tool in Bell's palsy. *Otol Neurotol* 35: 1669-1672, 2014
- 17) Kimura Y, Sumiyoshi M, Sakanaka M, Taniguchi M, Baba K. In vitro and in vivo antiproliferative effect of a combination of ultraviolet-A and alkoxy furocoumarins isolated from umbelliferae medicinal plants, in melanoma cells, *Photochemistry and Photobiology*, 89: 1216-1225, 2013
- 18) Kimura Y, Sumiyoshi M, Tamaki T. Effects of the extracts and an active compound curcumenone isolated from *Curcuma zedoaria* rhizomes on alcohol-induced drunkenness in mice. *Fitoterapia* 84: 163-169, 2013.
- 19) Sumiyoshi M, Kimura Y. op (*Humulus lupulus* L.) extract inhibits obesity in mice fed a high-fat over the long term. *Br. J. Nutr.* 109: 162-172, 2013
- 20) Kimura Y, Sumiyoshi M. Anti-tumor and anti-metastatic actions of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis* roots through anti-lymphangiogenesis. *Phytomedicine* 20: 328-336, 2013
- 21) Terashita T, Saito S, Nabeka H, Hato N, Wakisaka H, Shimokawa T, Kobayashi N, Gyo K, Matsuda S. Prosaposin-derived peptide alleviates ischaemia-induced hearing loss *Acta Otolaryngol* 133: 462-468, 2013
- 22) Nota J, Takahashi H, Hakuba N, Hato N, Gyo K. Treatment of neural anosmia by topical application of basic fibroblast growth factor-gelatin hydrogel in the nasal cavity: an experimental study in mice. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 139: 396-400, 2013
- 23) Hakuba N, Hato N, Omotehara Y, Okada M, Gyo K. Epithelial pearl formation following tympanic membrane regeneration therapy using an atelocollagen/silicone membrane and basic fibroblast growth factor: Our experience from a retrospective study of one hundred sixteen patients *Clin Otolaryngol* 38: 394-397, 2013
- 24) Fujiwara T, Hato N, Gyo K, Yanagihara N. Prognostic factors of Bell's palsy: prospective patient collected observational study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271: 1891-1895, 2013
- 25) Hakuba N, Fujiwara T, Hato N, Gyo K. Gelatin hydrogel with basic fibroblast growth factor for tympanic membrane regeneration. *Otol Neurotol* 35: 540-544, 2013
- 26) Ugumori T, Hyodo J, Hato N, Gyo K. Survival in primary carcinoma of the external and middle ear is strongly dependent on stage at diagnosis. *IJOHNS* 2: 221-227, 2013
- 27) Okada M, Kawaguchi AT, Hakuba N, Hyodo J, Hato N, Gyo K. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia: an experimental study in the gerbil. *Neurosci Lett* 553: 176-180, 2013
- 28) Okada M, Gyo K, Takagi T, Fujiwara T, Takahashi H, Hakuba N, Hato N. Air-bone gap in ears with a well-repaired tympanic membrane after Type and Type tympanoplasty. *Auris Nasus Larynx* 41: 153-159, 2013
- 29) Hato N, Kohno H, Yamada H, Takahashi H, Gyo K. Role of Nitric Oxid in the Inset of Facial Nerve Palsy by HSV-1 Infection. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 139: 1339-1342, 2013
- 30) Gyo K. Experimental study of transient cochlear ischemia as a cause of sudden deafness. *World J Otorhinolaryngol* 28; 3: 1-15, 2013

31) Hato N, Tsujimura M, Takagi T, Okada M, Gyo K, Tohyama M, Tauchi H. Infantile inflammatory pseudotumor of the facial nerve as a complication of epidermal nevus syndrome with cholesteatoma. *Auris Nasus Larynx*. 40: 569-572, 2013

32) Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Nakano R, , Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A $\beta$  and Differential Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell*. 12:487-96, 2013

## 【 6 】研究組織

### (1)研究代表者

阪中 雅広 (Sakanaka, Masahiro)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60170601

### (2)研究分担者

暁 清文 (Gyo, Kiyofumi)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00108383  
削除：平成 26 年 4 月 14 日

住吉 真帆 (Sumiyoshi, Maho)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60444767  
削除：平成 27 年 3 月 13 日

秦 龍二 (Hata, Ryuji)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：90258153

朱 鵬翔 (Ju, Pensyan)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40380216  
追加：平成 27 年 3 月 13 日