

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：34441

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11349

研究課題名(和文)「平衡障害に対する新規治療法の開発」- iPS細胞による前庭再生医療 -

研究課題名(英文) Development of new therapy for balance disorders

研究代表者

田浦 晶子 (Taura, Akiko)

藍野大学・医療保健学部・教授

研究者番号：70515345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：平衡障害に対する根本的な新規治療方法の開発のために、至適細胞を部位特異的に内耳前庭及び前庭神経周囲に移植し、細胞移植医療の有用性について検討した。前庭神経障害および前庭有毛細胞モデルマウスを作成し、神経再生にはヒト神経幹細胞(hNSC)を、有毛細胞再生にはマウスES細胞から誘導した細胞塊を使用した。その結果、VOR検査では、各種薬剤投与により両側ゲインの低下を認め、前庭機能障害モデルを作成できた。また行動観察による前庭機能評価では、hNSC細胞移植1ヶ月目では前庭機能の改善を認め、iPS由来細胞を移植することで、前庭機能の改善が一部で認め、細胞移植治療が有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎え、高齢者の健康寿命延伸のために、平衡感覚保持は非常に重要であるものの、前庭再生医療についての研究は殆ど見られない。本研究の特色はiPS細胞から有毛細胞及び前庭神経節細胞を誘導し、それぞれ至適細胞を部位特異的に内耳前庭及び前庭神経に移植することで新規前庭再生治療方法を開発することに着目した点で、将来的に内耳障害への臨床応用も期待出来るトランスレーショナルリサーチとしても非常に有意義な研究と思われる。この研究は、今後の高齢者健康寿命の延伸につながり、社会への恩恵は非常に高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a radically new therapeutic method for balance disorders, optimal cells were site-specifically transplanted into the inner ear vestibule and around the vestibular nerve, and the usefulness of cell transplantation therapy was investigated. Vestibular neuropathy and vestibular hair cell damaged model mice were made and human neural stem cells (hNSC) were used for nerve regeneration, and cell aggregates derived from mouse ES cells were used for hair cell regeneration. As a result, in the VOR test, we found that the bilateral gains were decreased by administration of various drugs. We were able to make a bilateral vestibular dysfunction model. In addition, vestibular function evaluation by behavioral observation showed the improvement in vestibular function 1 month after transplantation of hNSC cells. It was suggested that iPS derived cells transplantation therapy might be useful in future.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：前庭障害 細胞移植 iPS

1. 研究開始当初の背景

めまいやふらつきが持続する平衡障害者は数十万人以上存在するにも拘わらず、平衡障害に対する根本的治療は確立されていないのが現状である。平衡障害の主な原因として前庭障害があげられ、高度前庭障害に対する新規治療方法の開発は重要である。前庭障害に潜む転倒のリスクは数十倍以上と報告されているが、転倒による寝たきり高齢者の増加や、平衡障害による活動範囲の減少により認知症の進行も危惧される。日本はすでに超高齢化社会に突入し、今後さらに高齢者割合の増加が予想されることから、健康寿命の延伸の為に平衡障害の治療は急務である。**前庭神経節細胞**は加齢とともに減少するほか、外傷や虚血などにより、神経伝達物質が過剰産生され、細胞障害が生じアポトーシスに至るとされている。さらに炎症などによりコラーゲンが沈着し、変性することも確認されている。また、**前庭有毛細胞**は加齢に伴い感覚毛が消失し、細胞数が次第に減少することが知られており、加齢性平衡障害の一因と考えられている。このように超高齢化社会を迎え、高齢者の健全な生活の質を維持するために、平衡感覚機能は非常に重要であるものの、前庭再生医療についての研究は殆ど見られないのが現状である。

2. 研究の目的

鳥類では有毛細胞は再生するが、哺乳類では一旦障害されると十分には再生しないとされている。また、前庭神経節細胞も障害後の再生は難しいとされている。そのため、前庭性平衡障害についての新規再生医療の開発が喫緊の課題となっている。本研究では iPS 細胞から有毛細胞及び前庭神経節細胞を誘導し、それぞれ至適細胞を部位特異的に内耳前庭及び前庭神経周囲に移植することで新規前庭再生治療方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

3.1 前庭障害モデルマウスの作製

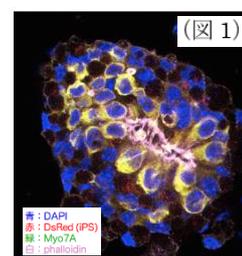
①**前庭神経節細胞障害**：マウスの後半規管を明視野におき、超音波装置を用いて小孔を作成する。そこから神経細胞毒性薬剤として Na-K ATPase (ウアバイン/ジゴシン) を注入し、前庭神経節細胞障害モデルを作成した。

②**前庭有毛細胞障害**：①と同様にマウスの後半規管に小孔を作成し、そこから有毛細胞毒性薬剤としてアミノグリコシド配糖体 (ゲンタシン) を注入し、有毛細胞障害モデルを作成した。

3.2 移植細胞の作成

①**ヒト神経幹細胞 (hNSC)**：ヒト iPS 細胞から神経細胞への分化誘導方法 (Li et al.,2011) を参考にして、ヒト神経幹細胞 (hNSC) を作成した。In vitro において、この hNSC と前庭組織との共培養により有毛細胞とのシナプスの形成および電気生理学的反応について検討し、前庭神経細胞との共通点について確認した。(Taura et al., 2016)

②**iPS/ES 由来の有毛細胞様細胞**：マウス iPS 細胞から有毛細胞への分化誘導方法 (Taura et al.,2014) を参考にして、有毛細胞様細胞



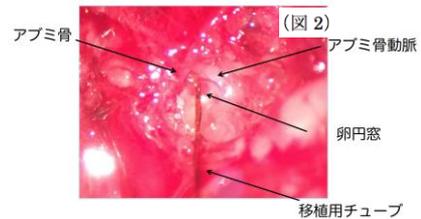
胞を作成した（図 1）。また、マウス ES 細胞から、Hashino らの方法を参考にして内耳オルガノイドを作成した。

3.3 移植方法

①前庭神経細胞障害への hNSC 移植：Na-K ATPase にて障害後 1 週間目に後半規管後方からアプローチし、頭蓋内へシリカガラス注射針にて hNSC を移植した。なお、コントロールとして、細胞培養液のみを同様の方法で頭蓋内に注入した。

②前庭有毛細胞障害への hNSC 移植：ゲンタシン障害後 1 週間目に後半規外耳道的にあぶみ骨を明視野におき、あぶみ骨底板（図 2）もしくは底板付近に小孔を開けて iPS および ES 由来の内耳オルガノイドを内耳前庭に注入した。

なお、ヒト iPS 細胞をマウスに移植すると異種移植であり、免疫拒絶応答が予想されるため、免疫抑制剤（プログラフ）を使用した。

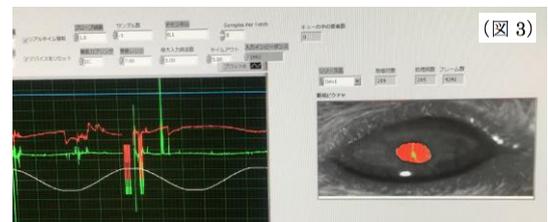


3.4 解析方法

1 ヶ月目〜3 ヶ月後に固定を行い、機能的および組織学的評価を行った。

・機能評価

①前庭機能評価として、前庭動眼反射(VOR)検査を行った。マウスの VOR を測定し（図 3）、ゲインの左右差を計測し、障害の評価判定を行った。



②移植の効果については、表 1 のような行動観察

による前庭機能評価方法を用いて評価した。回旋行動、Trunk curling 現象および遊泳能力の 3 項目で、表 1 のように前庭機能をスコア化して移植前後をコントロールと比較検討した。

表 1 前庭機能評価方法

20 秒間の回旋行動および 10 秒間の Trunk curing 現象、遊泳能力についてスコア化して評価した。

（なお、本研究はガイドラインに沿って、動物の苦痛も最小限にして行い、滋賀県立総合病院研究所および藍野大学動物実験委員会の承認を得て行った。）

スコア	回旋行動	Trunk curling 現象	遊泳能力
0 点	0 回	なし	正常遊泳
1 点	1-4 回	軽度 curling あり	軽度回転傾向
2 点	5-9 回	重度 curling あり	重度回転傾向
3 点	10 回以上	—	遊泳不可

・組織評価

4%PFA にて灌流固定を行い、頭部を摘出し更に一晩固定した。その後、5%EDTA で脱灰後、凍結切片を作成した。免疫染色では、hNSC 細胞移植には、Tuj1（マウス）、抗 GFP（ラット）を、有毛細胞移植には、Myosin7A（マウス）、抗 GFP（ラット）を一次抗体として使用し、抗マウス抗体（568nm）、抗ラット（488nm）を二次抗体として使用した。核染色には DAPI を使用した。

4. 研究成果

VOR を用いた前庭機能検査では、Na-K ATPase (ウアバイン/ジゴシン) およびアミノグリコシド配糖体 (ゲンタシン) 投与により、両側 VOR ゲインの低下を認めた。このことより、両薬剤投与により両側前庭機能障害モデルを作成できた。

行動観察による前庭機能評価では、hNSC 細胞移植 1 ヶ月目ではコントロール群と比較して、移植群では有意に前庭機能の改善を認めた (t 検定)。組織学的評価では、GFP 陽性の移植細胞を頭蓋内に確認することができた。

有毛細胞の移植については、マウス iPS 細胞から誘導した有毛細胞様細胞を予定していたが、誘導効率が低いため、移植細胞として十分量を確保することが出来なかった。そのため、新たにマウス ES 細胞から内耳オルガノイドを作成し、その一部を有毛細胞障害後のマウスに移植した。行動観察による前庭機能評価では、オルガノイド移植群の一部で改善傾向を認めた。

これらのことから、iPS および ES 細胞から分化誘導を行った細胞を障害後に移植することで、前庭機能の改善が一部で認められたことから、細胞移植治療が有用である可能性が示唆された。今後は臨床応用に向けて安全性および有効性の厳密な検討が必要であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 田浦 晶子、大西 弘恵、西村 幸司、扇田 秀章、三輪 徹、伊藤 壽一	4. 巻 80
2. 論文標題 平衡障害に対する新規治療法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 216-222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiko TAURA, Yukiko ITO, Kana NAGAHARA, Takashi TSUJIMURA, Shinpei KADA, Masakazu MIYAZAKI, Ryo ASATO, Jun TSUJI	4. 巻 19
2. 論文標題 Clinical study of vertigo in the outpatient clinic at Kyoto Medical Center	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aino Journal	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideaki OHGIT, Akiko TAURA, Koji NISHIMURA, Hiroe OHNISHI, Shiho MIKI, Yoshihiro YAMADA, Juichi ITO	4. 巻 19
2. 論文標題 Digoxin induces inner ear damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aino Journal	6. 最初と最後の頁 15-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田浦晶子	4. 巻 4
2. 論文標題 めまいの検査 問診	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 めまい診療 ハンドブック	6. 最初と最後の頁 220-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 扇田秀章、田浦晶子	4. 巻 37
2. 論文標題 高齢者のめまい	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOHNS 最新知識からめまい症例を診る	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西村幸司、田浦晶子	4. 巻 1969
2. 論文標題 第12節 突発性難聴: 10章 遺伝子、その他	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 難病における診断・治療の現状と求める医薬品・医療機器・再生医療像	6. 最初と最後の頁 531-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森田真美、田浦晶子	4. 巻 -
2. 論文標題 各疾患に対するフレイル-その他の症状・合併例と対応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 聴平衡覚と健康長寿・フレイル対策	6. 最初と最後の頁 62-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 5. 田浦晶子、大西弘恵、西村幸司、扇田秀章、中川隆之、山本典生、岡野高之、大森 孝一、伊藤壽一	4. 巻 -
2. 論文標題 前庭再生医療研究の将来展望	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田浦晶子、扇田秀章、西村幸司、伊藤壽一
2. 発表標題 内耳前庭における血管新生と低酸素応答についての検討
3. 学会等名 第81回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akiko TAURA, Hideaki OHGITA, Koji NISHIMURA, Hiroe OHNISHI, Toru Miwa, Shiho MIKI, Yoshihiro YAMADA, Juichi ITO
2. 発表標題 Examination of angiogenesis and hypoxic response in the cochlea
3. 学会等名 EES 2022 4th World Congress on Endoscopic Ear Surgery (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田浦晶子、大西弘恵、扇田秀章、西村幸司、伊藤壽一、大森孝一
2. 発表標題 ヒト内耳オルガノイドを用いた前庭再生への試み
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 内耳前庭における血管新生と低酸素応答についての検討
3. 学会等名 第81回めまい平衡医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 AKIKO TAURA
2. 発表標題 Examination of angiogenesis and hypoxic response in the cochlea
3. 学会等名 EES 2022 4th World Congress on Endoscopic Ear Surgery
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 血管新生と内耳障害についての検討
3. 学会等名 第80回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 細胞移植による両側前庭障害治療への試み
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 「平衡障害に対する新規治療法の開発、Possible application of regenerative medicine to bilateral vestibulopathy
3. 学会等名 第79回日本めまい平衡医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 眼位と眼振についての検討
3. 学会等名 第82回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 細胞移植による両側前庭障害治療への試み
3. 学会等名 20回 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Taura
2. 発表標題 The regenerative research for vestibular disorder
3. 学会等名 Inner ear Biology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 PKC経路と前庭機能障害
3. 学会等名 第78回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 平衡障害への新規治療法の開発
3. 学会等名 第3回 藍野大学 中央研究施設シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 n vivoでのiPS細胞による内耳再生医療への試み
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 めまいの診療と研究
3. 学会等名 第6回宮城若手めまい研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 前庭再生医療研究の将来展望
3. 学会等名 第77回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田浦晶子
2. 発表標題 In vivoでの内耳前庭再生への試み
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田浦晶子、中川隆之、船曳和雄、辻純、扇田秀章、西村幸司、伊藤壽一、大森孝一
2. 発表標題 iPS細胞による前庭再生医療への試み
3. 学会等名 第76回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田浦晶子、中川隆之、船曳和雄、伊藤壽一、大森孝一
2. 発表標題 iPS細胞による前庭再生医療への試み
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北尻 真一郎 (Kitajiri Shinichiro) (00532970)	信州大学・医学部・特任准教授 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西村 幸司 (Nishimura Koji) (20405765)	滋賀県立総合病院（研究所）・その他部局等・嘱託研究員 (84203)	
研究分担者	扇田 秀章 (Oogita Hideaki) (20761274)	滋賀県立総合病院（研究所）・その他部局等・専門研究員 (84203)	
研究分担者	大西 弘恵 (Ohnishi Hiroe) (50397634)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	
研究分担者	伊藤 壽一 (Ito Juichi) (90176339)	滋賀県立総合病院（研究所）・その他部局等・所長 (84203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関