

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15615

研究課題名(和文) 蝸牛階からコルチ器へ - 高効率な幹細胞誘導への挑戦 -

研究課題名(英文) Challenges for effective delivery of stem cells to the organ of Corti

研究代表者

欠畑 誠治 (Kakehata, Seiji)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90261619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：4週齢のモルモットに全身麻酔下に136dBの超強音を2時間暴露させ、高度難聴モデルを作成に成功した。組織学的にほとんどの外有毛細胞が脱落していることを確認した。音響暴露2週間後の聴力と回転毎での内・外有毛細胞の脱落率を計測し、幹細胞移植後の評価のためのコクレオグラムを作成した。移植する幹細胞はMuse細胞を用い、マイクロカテーテルを蝸牛鼓室階内に挿入して細胞を注入する方法を確立した。音響障害モデルのモルモットに対し、音響暴露翌日に10,000または30,000のMuse細胞を移植したが、細胞移植群では蝸牛内でのGFP陽性Muse細胞はほとんど確認できず、聴力の有意な改善も見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Approximately 250-350g, male Hartley strain guinea pigs were exposed to 4-8 kHz octave-band noise at 136 dB sound pressure level (SPL) for 2 hours in the sound proof box under general anesthesia. All the animals were measured their ABR threshold before and 24 hours, 1 week and 2 weeks after the noise exposure to confirm the permanent threshold shift. The ABR threshold of 2 weeks after the noise exposure showed profound deafness. Cochlear frequency mapping was performed with ImageJ plugin to identify the tonotopic area, demonstrating that outer hair cells were disappeared. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells were transplanted into the Scala tympani of the severely damaged animals of the number of 10,000 or 30,000 cells through a micro catheter. ABR of the transfected ears did not show evident hearing improvement compared to the control group. Immunohistochemical data show no GFP-positive cells alive in the cochlear.

研究分野：聴覚

キーワード：内耳障害 難聴 幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

これまで幹細胞を用いた内耳再生で有意な機能回復は得られていない。現在、幹細胞を用いた内耳再生の研究は世界で行われているが、in vivo で有意な機能回復が得られたという報告はない。

幹細胞を用いた内耳再生の戦略として、幹細胞移植と内耳幹細胞の分化・誘導の2つの戦略がある。iPS細胞を内耳障害マウスに移植し、移植細胞が内耳へ生着した報告はあるが、誘導効率が低く機能回復までには至ってはず、さらに奇形腫の形成も報告されている(Yamamoto, et al, 2012)。内耳幹細胞に対して遺伝子誘導(Ouji, et al, 2013)やセクレターゼ阻害剤(Mizutari, et al, 2013)を用いて部分的な形態的回復を認めたと報告もあるが、有意な機能回復までには至っていない。

幹細胞移植ルートとして鼓室階が臨床応用に最も適しているが、鼓室階からコルチ器まで細胞が誘導される時に最大の障壁になるのが細胞外マトリックスである基底板であり、30 μ m程度の大きさの幹細胞が通過できるルートはない。一方、130dB超の強大音にて基底回転の基底板に平均90 μ mの裂隙が生じることが報告されている(Rauchegger and Spöndlin, 1981)。

2. 研究の目的

内耳はその構造的特徴から、幹細胞を内耳再生の標的部位であるコルチ器へ誘導することが困難であるため、内耳幹細胞移植により有意な機能回復が得られたという報告はない。

本研究では、コルチ器への幹細胞誘導の最大の障壁である基底板に130dB超の強大音にて基底板裂隙を生じさせ、さらに強い組織傷害によって産生される幹細胞誘導因子により、鼓室階から傷害部位であるコルチ器へ幹細胞を効率的に誘導する画期的な手法を用いる。幹細胞として、腫瘍形成の危険性がなく損傷部位に生着し機能的な細胞に分化することが知られている Muse 細胞 (Multilineage differentiating Stress Enduring cell) を用いて、新たな効率的組織誘導法の開発へ挑戦する。

今回われわれは強大音により生じる基底板の裂隙を利用した幹細胞の内耳への誘導について検討した。

3. 研究の方法

超強大音による経基底板ルートの創出と幹細胞の組織誘導を試みた。

音響暴露システム

モルモット蝸牛基底回転に相当する周波数帯で136dBの超強大音を発生させることのできる音響暴露システムの構築を試みた。

4~8kHz、136dBAのoctave band noise

を用いた。

音響暴露前後の聴力測定

全身麻酔下に4週齢のモルモットに125dB、130dBまたは136dBの強大音を暴露させ、音響暴露時間を2, 3時間と変化させた各群(各群6匹)で、Auditory brain stem response (ABR)にて聴力の評価を暴露前、暴露翌日、暴露後1週と2週に行った。

コクレオグラム作成

音響暴露2週間後の回転毎での内・外有毛細胞の脱落率、基底板裂隙部位と大きさを計測した。組織学的評価はアクチン線維を染めるPhalloidinと有毛細胞マーカーであるMyosin7a、DNAを染色するDAPIを用いて三重染色を行った。基底回転~第三回転の5ヶ所を観察し、外有毛細胞の平均消失率を算出した。

GFP陽性 Muse 細胞の採取

移植する幹細胞は Muse 細胞を用いた。Muse細胞はリポフェクションによりGFPを導入したヒトMSCから、FACSを用いてSSEA-3陽性細胞として単離した。GFPの発現が安定した後に、抗SSEA-3抗体で染色しFACSを用いてGFP陽性/SSEA-3陽性の Muse 細胞を採取した。

内耳高度障害モデルの鼓室階への Muse 細胞の鼓室階への移植

全身麻酔下に耳胞を開放し蝸牛を確認後、蝸牛開窓術を行い鼓室階にマイクロカテーテルにて細胞を移植する手技を確立した。移植方法については、当初はガラス管を用いていたが、細胞の移植をより確実にするためにマイクロカテーテルを蝸牛鼓室階内に挿入して細胞を注入した。

幹細胞移植内耳の形態的・機能的評価

移植後1週、2週、4週で聴力評価を行う。聴力評価後、動物を深麻酔下に安楽死させ蝸牛を摘出。脱灰後免疫組織学的評価を行う。免疫組織染色には有毛細胞のマーカーとしてMyosin7a、espin、Myosin6、支持細胞のマーカーとしてSox2、jagged1、有毛細胞前駆細胞のマーカーとしてPax2、Pax8、jagged2、Prox1に対する抗体を用いた。

4. 研究成果

音響暴露システムの構築

モルモット蝸牛基底回転に相当する周波数帯で136dBの超強大音を発生させることのできる音響暴露システムの構築し、従来の音響曝露に比較してより強い組織障害を惹起することに成功した。

最適な音響暴露条件の決定

コクレオグラムの作成

全身麻酔下に4週齢のモルモットに125dB、130dBまたは136dBの強大音を暴露させ、音響暴露時間を2, 3時間と変化させた各群(各群6匹)で、音響暴露2週間後の聴力をABRにて測定した。

さらに、回転毎での内・外有毛細胞の脱落率、基板裂隙部位と大きさを計測したコクログラムを作成し、幹細胞誘導に最適な騒音暴露条件を決定した(表1、2)

136dBの超強大音の2時間暴露で、音響暴露翌日のABRでは聴力がscale outとなり、2週間後には15-25dBの閾値の改善を認め高度難聴程度まで改善するが、それ以降は改善を認めないこと、また組織学的にも正常蝸牛有毛細胞に比べ、高度の外有毛細胞の脱落を確認した。2週後に断頭後側頭骨を摘出し組織学的評価を行ったところ、内有毛細胞は維持されていたが、外有毛細胞の多くが脱落している像が得られた。外有毛細胞の消失率は平均で92.8%(85.1~100%, n=5)であった。

これらの結果は、136dBの強大音による音響暴露により、従来の音響暴露に比較してより強い内耳障害を惹起したことを示している。

以上の結果より、以後の実験では136dBの超強大音の2時間暴露モデル(高度障害モデル)を使用した。

GFP陽性 Muse 細胞の採取

リポフェクションによりGFPを導入したヒトMSCから、FACSを用いてSSEA-3陽性細胞としてMuse細胞を単離した。GFPの発現が安定した後に、抗SSEA-3抗体で染色しFACSを用いてGFP陽性/SSEA-3陽性のMuse細胞を採取した。

鼓室階への細胞移植

マイクロカテーテルを蝸牛鼓室階内に挿入して細胞を注入する方法を確立した。この方法を用いても聴力に与える侵襲は低く、聴力は変わらないことを予備実験で確認した。

音響障害モデルのモルモットに対し、音響暴露翌日に左耳に10,000または30,000のMuse細胞を移植し、右耳にはPBSのみを注入した。

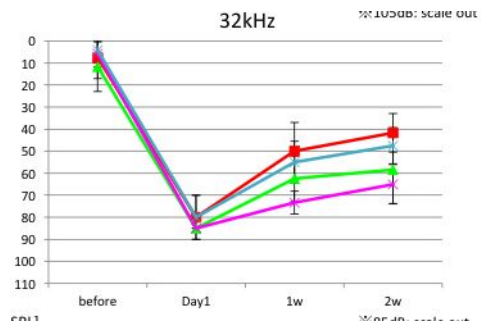
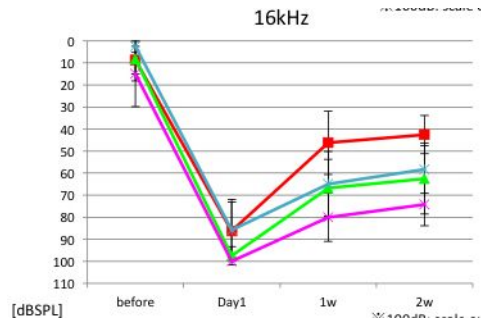
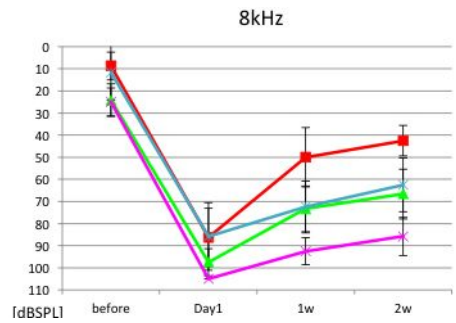
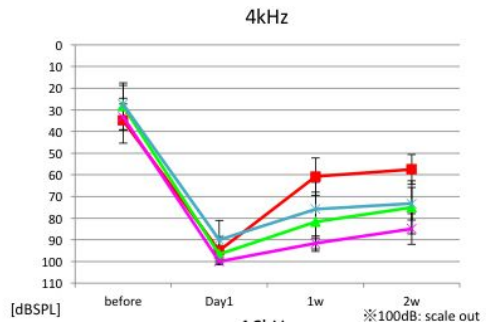
Muse細胞移植群では蝸牛内でのGFP陽性Muse細胞はほとんど確認できず、聴力の改善傾向も見られなかった。

The average of rate of OHC disappearance (%)

frequency	time	sound pressure	4kHz	8kHz	16kHz	32kHz
4~8kHz	2hrs	130dB(A)	1 Day N=4 44.3% (2.9~85.7)	49.3% (0~100)	47.1% (0~97.1)	25.7% (0~100)
		2 weeks N=6	91.9% (48.6~100)	93.8% (74.3~100)	70.5% (11.4~100)	60.9% (0~100)
	3hrs	125dB(A)	3 Days N=4 55.7% (11.4~100)	65.7% (80.0~100)	53.6% (14.3~100)	48.6% (0~100)
		2 weeks N=4	72.9% (42.9~88.6)	66.4% (42.9~82.9)	36.4% (8.6~97.1)	49.2% (0~100)

Average Hearing change after noise exposure

frequency: 4-8kHz
 125dB(A),2hrs 125dB(A),3hrs 130dB(A),2hrs 136dB(A),2hrs (N=6 ears)



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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

欠畑誠治 (KAKEHATA, Seiji)
山形大学・医学部耳鼻咽喉科・教授
研究者番号：90261619

(2) 研究分担者

伊藤吏 (ITO Tsukasa)
山形大学・医学部耳鼻咽喉科・講師
研究者番号：50344809
窪田俊憲 (KUBOTA, Toshinori)
山形大学・医学部耳鼻咽喉科・助教
研究者番号：80536954

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()