

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20179

研究課題名(和文) 多能性幹細胞Muse細胞を用いた蝸牛有毛細胞再生

研究課題名(英文) Regeneration of cochlear hair cell by transplantation of
Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cell

研究代表者

新川 智佳子(Shinkawa, Chikako)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：00571647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：4～8kHzのバンドノイズを130dBの大きさを3時間モルモットに暴露することにより、持続的な高度難聴を示す内耳障害モデルの作製した。この内耳障害モデルに、障害翌日にマイクロカテーテルを用いてMuse細胞の移植を行った。10,000細胞移植した群では、移植後6週から12週まで、4kHzと8kHzにおいて、コントロール群に比べて、有意に聴力の回復を認めた。また移植後12週の時点で外有毛細胞の消失率を検討したところ、8kHzの担当周波数領域において、対象群ではコントロールに比べ有意に外有毛細胞の消失率が低いことが判明した。現在はMuse細胞のコルチ器への遊走や生着について検討中である。

研究成果の概要(英文)：First I made a inner ear degeneration model by band noise exposure. Noise frequency was from 4 to 8 kHz and its sound presser was 130 dB SPL. This condition can make a permanent threshold shift of hearing. I transplanted 10,000 Muse cells into scala tympani of this model using micro catheter 1 day after noise exposure. the hearing threshold recovered significantly on Muse transplanted ear at the area of 4 and 8 kHz from 6 weeks after noise exposure to the end point. I counted the rest of outer hair cell at 12 weeks after noise exposure, this revealed that more outer hair cells were alive in Muse transplanted group than control at 8 kHz area with a statistically significant difference. Now we are investigating whether Muse cells can migrate and engraft to the damaged organ of Corti and differentiate into hair cells or hair cell progenitor cells.

研究分野：耳科学

キーワード：Muse細胞 内耳障害 内耳保護

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴の現状

前述のように高齢化が進む現代で、多くの高齢人口が加齢性難聴に罹患している。加齢性難聴は家族や友人とのコミュニケーション障害の原因となり、うつ病の発症リスクになるとも言われている。しかし**加齢性難聴の有効な治療はなく、補聴器を装用するしかない**が、補聴器は語音聴力の改善は見られないため、患者がその効果を実感することは難しく、また装用をやめてしまう症例も少なくない。組織学的には加齢性難聴は有毛細胞とらせん神経節細胞の脱落が原因と言われているが、哺乳類において一度脱落した有毛細胞は再生しないと言われている。

現在の内耳研究の現状

現在加齢性難聴をはじめとする感音難聴の治療のため、幹細胞や薬剤を用いた研究が行われているが、**in vivo で有意な機能回復が得られたという報告はない**。2012年 Yamamoto¹⁾は 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ことを報告したが、機能回復までには至ってはず、奇形腫が形成したとも報告している。また、遺伝子誘導²⁾やセクレターゼ阻害剤³⁾を用いて形態的な回復を認めた報告もあるが、有意な機能回復までには至っていない。また in vitro ではマウス ES 細胞から有毛細胞を誘導する実験も成果を挙げている⁴⁾が、ES 細胞には倫理的な問題があり、臨床応用は難しい。

Muse 細胞の特長

Muse 細胞は 3 胚葉すべてに分化する能力を有する多能性幹細胞であるが、ヒト間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell(hMSC)や皮膚線維芽細胞からの採取が確立されており、今後の臨床応用が期待される。その特長として、下記が挙げられる。

- ・多能性を有するにも関わらず腫瘍化がみられない。
- ・non-Muse MSC に比較して損傷組織への生着・細胞分化が優れている。
- ・非常に未分化な細胞であり、分化した細胞に比べても高い生着率が期待される。
- ・人工的遺伝子導入をすることなく、ヒト生体から得られる。
- ・ストレス耐性であり(16 時間トリプシンにさらしても死滅しない)、異種移植によって起こる免疫拒絶反応によっても排除されない可能性がある。

2. 研究の目的

65 歳以上の高齢者人口が 20%を超える現在、その約 3 割程度が加齢性難聴を認めると言われている。加齢性難聴は蝸牛の有毛細胞やらせん神経節が脱落するが、哺乳類では脱落した一度脱落した有毛細胞は再生しないと言われており、有効な治療法がなく、生活に支障をきたす場合は補聴器を装用するしか

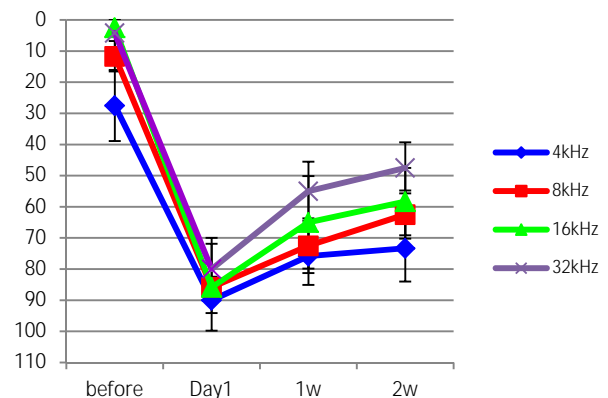
ないのが現状であり、加齢性難聴の有効な治療開発が必要と考えられる。そこで我々は音響暴露により有毛細胞を脱落させた内耳障害モデルに多能性幹細胞である Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) 細胞を移植し、有毛細胞の再生することにより加齢性難聴の治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

内耳障害モデルの作成

全身麻酔下に 4 週齢のモルモットに 4~8kHz、130dB の octave band noise を 3 時間暴露する。暴露前には正常であったモルモットの聴力が暴露翌日には scale out となり、2 週間後には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(図 1)。

図 1、音響暴露後の聴力の変化



また組織学的にも正常蝸牛有毛細胞に比べ、外有毛細胞の脱落が見られる(図 2)

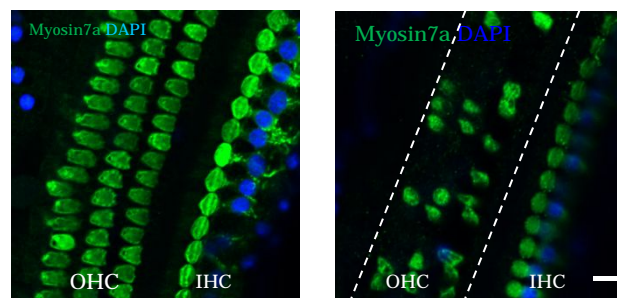


図 2、音響暴露後の外有毛細胞の変化

左図：正常、右図：音響暴露後 2 週間

GFP 陽性 Muse 細胞の採取

hMSC を培養しレンチウイルスベクターを用いて GFP を導入。抗 SSEA-3 抗体で二重染色後 FACS により GFP+/SSEA-3+ Muse 細胞を採取する。

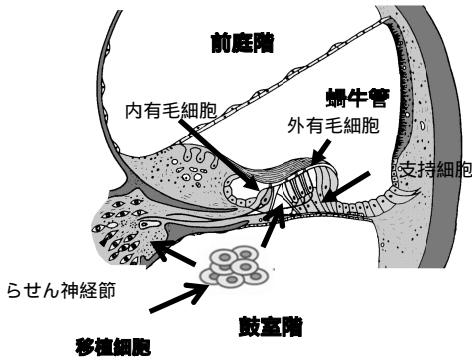
移植

全身麻酔下に耳胞を開放し蝸牛を確認。蝸牛開窓術を行い鼓室階に Muse 細胞を移植する(図 3)。

左耳には PBS5 μ L に懸濁した GFP+/SSEA3+ Muse 細胞を 10,000 細胞移植。右耳には同量

の PBS のみを注入しコントロールとする。

図 3、移植経路



機能評価

Muse 細胞の移植後 12 週までの聴力評価 (ABR) を行う。

免疫組織学的評価

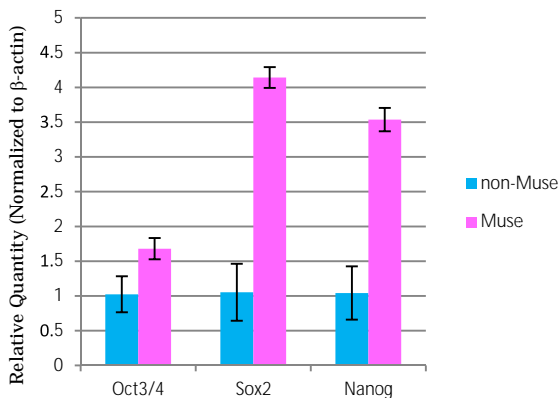
動物を深麻酔下に安楽死させ蝸牛を摘出。脱灰後、免疫組織学的評価を行う。免疫組織染色を行い、残存する外有毛細胞の数を数えることによって、外有毛細胞の消失率を検討し、Muse 細胞による内耳保護効果について検討する。また、Muse 細胞の障害コルチ器への遊走や生着、分化を有毛細胞マーカーを用いて検討する。有毛細胞のマーカーとして Myosin7a, espin, myosin6、支持細胞のマーカーとして Sox2, jagged1、有毛細胞前駆細胞のマーカーとして Pax2, Pax8, jagged2、Prox1 に対する抗体を用いる。

4. 研究成果

Muse 細胞の採取

山形大学において Muse 細胞の採取を確立し、その多能性を確認した。FACS により採取した Muse 細胞を RT-PCR にて解析したところ、non-Muse 細胞に比べて多能性因子である Sox2, Oct3/4, Nanog の発現が有意に高いことを確認した(図 4)。

図 4、Muse 細胞における多能性因子の発現



Muse 細胞移植後の聴力の変化

音響暴露後に Muse 細胞を 10,000 細胞移植し、聴力の推移に与える影響を検討した。

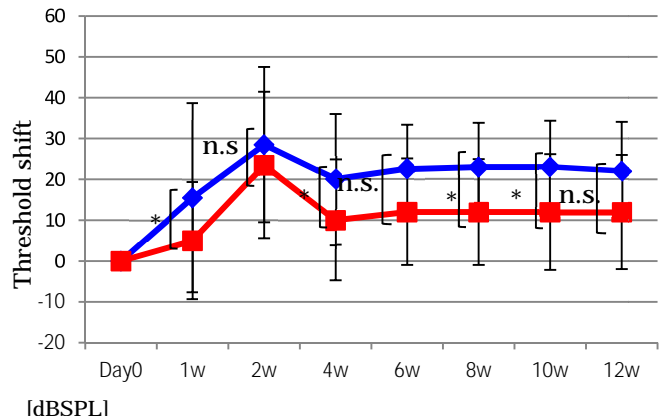
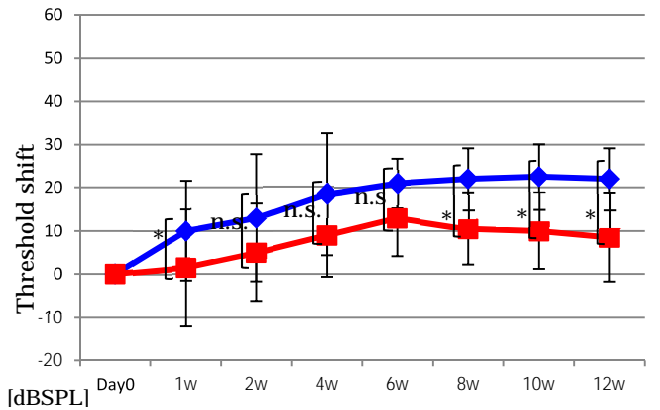
聴力は音響暴露後 6 週目以降エンドポイントである 12 週まで、4kHz、8kHz において有意差を持って Muse 群で回復した。また、音響暴露翌日の聴力を基準とし、回復する聴力の推移 (threshold shift) も検討したところ、移植後 8 週目以降で、4kHz、8kHz において有意に聴力が回復することを確認した(図 5)。

図 5、Muse 細胞移植後の聴力の変化

青：Muse 細胞移植側、赤：コントロール側

上図：4kHz、下図 8kHz

: p < 0.05



Muse 細胞移植後の外有毛細胞の消失率

Muse 細胞移植後 12 週の時点での外有毛細胞の消失率を検討したところ、8kHz 担当周波数領域では、有意の外有毛細胞の脱落率が低いことが分かった。またその他の周波数領域においても、Muse 細胞移植群で外有毛細胞消失率が低い傾向が認められた。

以上の結果から、Muse 細胞の音響暴露後の蝸牛における内耳保護効果があると考えられる。今後は Muse 細胞のコルチ器への遊走や生着について検討し、さらには生着した Muse 細胞が有毛細胞や有毛細胞前駆細胞への分化について検討する計画である。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新川 智佳子 (SHINKAWA, Chikako)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：00571647

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

欠畑 誠治 (KAKEHATA, Seiji)

伊藤 吏 (ITOU, Tsukasa)

小泉 優 (KOIZUMI, Yutaka)