

令和元年6月20日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05479

研究課題名(和文) ヒト生体から直接得られる多能性幹細胞Muse細胞を用いた内耳再生治療の多面的解析

研究課題名(英文) Multifaceted analysis of inner ear regeneration using Muse cells

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では多能性幹細胞であるMuse細胞を用い、障害された内耳の幹細胞移植による機能再生の可能性を検討した。蝸牛内に生着したMuse細胞がその特異的微小環境によって内耳細胞系譜へと分化していく内耳再生機構と、Muse細胞のtrophic factorにより内耳有毛細胞やシナプスが自己修復することによる内耳再生機構を、機能的・形態学的・免疫組織学的に、モルモット内耳障害モデルとマウス内耳3次元器官培養を用いて多面的に解析した。本研究よりモルモット内耳障害モデルでのMuse細胞による聴力改善の可能性および、内耳3次元器官培養ではMuse細胞自身が神経へ分化する可能性を持つこと示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究よりモルモット内耳障害モデルでのMuse細胞による聴力改善の可能性および、内耳3次元器官培養ではMuse細胞自身が神経へ分化する可能性を持つこと示された。聴力障害から改善がみられた理由として、Muse細胞自身の有毛細胞への分化は確認できなかったが、Muse細胞からの聴神経への分化や、Muse細胞からのtrophic factorが作用している可能性が考えられ、Muse細胞による移植治療応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the possibility of functional regeneration by transplanting Muse cells, a type of the pluripotent stem cell, to the injured inner ear in this study. Inner ear regeneration mechanism of Muse cells engrafted in the cochlea differentiate into inner ear cell lineage by their specific microenvironment and self repair of inner ear hair cells and synapses by trophic factor of Muse cells were analyzed in multiple aspects functionally, morphologically and immunohistologically using a guinea pig inner ear injury model and mouse inner ear three-dimensional organ culture. From this study, possibility of improvement of hearing by Muse cells in the guinea pig inner ear injury model was shown and Muse cells themselves have the possibility of differentiating to nerves in inner ear three-dimensional organ culture.

研究分野：内耳機能再生

キーワード：内耳 再生 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感音難聴の多くは不可逆的であり、現在のところ根本的な治療法は確立されていない。主に補聴器や人工内耳などで聴力を補償しているが、補聴器は高度難聴では調整が困難となることもあり、人工内耳は異物を体内に挿入するため感染などの合併症の可能性がある、さまざまな問題点がある。現在のところ感音難聴に対する治療としては、有毛細胞の障害が初期の段階でまだ障害が可逆的であると思われる場合は、臨床的にはステロイド投与による治療が行われることが多いが、障害が不可逆的な段階になった場合は、薬物治療の適応ではなくなってしまう。基礎研究では、薬剤による Notch 情報伝達系の抑制による支持細胞から有毛細胞への分化転換の報告 (Izumikawa M, et al. Nat Med. 2005) や、ES 細胞、iPS 細胞からの神経細胞誘導、有毛細胞類似の細胞の誘導 (Oshima K, et al. Cell. 2010) などの報告がなされており、今後の発展が期待されている。しかしながら、ノッチ情報伝達系阻害薬は、細胞毒性の問題や、ヒトでも動物実験同様の効果が期待できるか不明な点がある。また、ES 細胞や iPS 細胞は腫瘍化のリスクが臨床応用への大きな障害となっている。

間葉系幹細胞 (MSC) は骨髄、脂肪など比較的入手しやすい組織から得ることができ、さまざまな疾患で移植治療に用いられている。近年、多能性を有するが腫瘍性を持たない、Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞と呼ばれる多能性幹細胞が MSC から発見された (Kuroda Y, et al. PNAS. 2010)。動物実験では劇症肝炎、筋変性、脊髄損傷、皮膚損傷などのさまざまなモデルで移植実験が行われ、損傷部位に生着することと、組織に応じた細胞に分化することが確認されている (Kuroda Y, et al. Arch Immunol Ther Exp. 2011.)。さらに、MSC はすでにヒトに移植されており、腫瘍化のリスクが低いことが示されている。MSC に由来する Muse 細胞も同じく腫瘍化のリスクが低いと予想される。

2. 研究の目的

本研究では、Muse 細胞を用いて、有毛細胞障害モデル動物の有毛細胞を再生させることが目的である。内耳機能の再生は、聴覚障害に対する治療の中で現在最も注目されている分野の一つであるといっても過言ではない。Muse 細胞を用いた内耳再生は安全性も十分高いと予想され、動物実験で得られた知見をもとに、ヒトへの臨床応用できれば革新的な治療方法となることが期待される。

3. 研究の方法

GFP 陽性 Muse 細胞の採取

ヒト Muse 細胞は、リポフェクションにより GFP を導入した MSC から、抗 SSEA-3 抗体で染色後、FACS を用いて GFP 陽性/SSEA-3 陽性細胞として単離した。

in vivo での聴力障害モデル動物への Muse 細胞の蝸牛内への移植実験

1. 障害モデルの作製

実験材料として 4 週齢のモルモットを使用した。全身麻酔下に 4-8kHz のバンドノイズを 130dB の大きさを 3 時間暴露した。

2. Muse 細胞の移植

全身麻酔下に耳胞を開放し蝸牛を確認できる状態にした。蝸牛を開窓し鼓室階に Muse 細胞を移植した。左耳には 10,000 cells/PBS 5 μ l を、右耳には同量の PBS を注入した。

3. 機能評価

移植後 12 週までの期間で ABR による聴力評価を行った。

4. 形態学的評価

モルモットを深麻酔科に安楽死させ蝸牛を摘出し、固定、脱灰を行った後に標本を作製した。有毛細胞のマーカーとして Myo7a、Myo6、支持細胞のマーカーとして Sox2、Jagged1 などを使用し免疫組織化学による染色および、共焦点レーザ顕微鏡 (A1: 株式会社ニコン) を使用し蛍光観察による解析を行った。

in vitro での蝸牛組織と Muse 細胞の共培養

1. 障害モデルの作製

実験材料として C57BL/6 マウスを用いた。蝸牛は生後 2 - 3 日の新生児マウスより、実態顕微鏡下で採取した。障害モデル作製のため採取した蝸牛組織はゲンタマイシン 35 μ M で 48 時間処理した。

2. Muse 細胞との共培養

障害されたマウス由来蝸牛組織と、GFP 標識されたヒト Muse 細胞を共培養した。培養にはコラーゲンゲルを用いた 3 次元培養法を用いた。コラーゲンは新田ゼラチン株式会社

の Cellmatrix® Type I-A を使用した。まず、コラーゲンゲル 20 μ l で下層を作成。37 で加温しゲル化させた。その上に蝸牛組織を置き、さらにその上から Muse 細胞を含んだコラーゲンゲル 20 μ l を重層しゲル化させた。培養液の組成は DMEM/F12、10 % FBS、25 mM HEPES、100 U/1 penicillin G、N-2 Supplement、B-27 Supplement とした。

3. 形態学的評価

コラーゲンゲル内で共培養したサンプルをゲルのまま固定し、免疫組織化学による染色および、共焦点レーザー顕微鏡を使用した蛍光観察による解析を行った。有毛細胞マーカーとして Myo7a、ラセン神経マーカーとして Tuj1 を使用した。

4. 研究成果

1. モルモットを使用した in vivo での聴力障害モデルの作製

音響暴露翌日には 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かった(図 1)。組織学的に正常蝸牛と比較して外有毛細胞の脱落がみられた(図 2 右)。

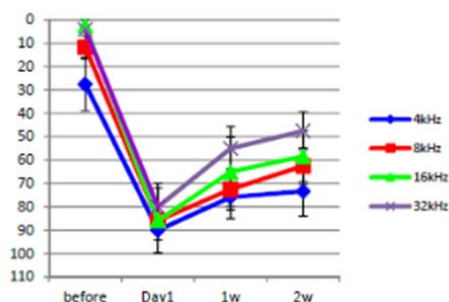


図 1 音響暴露後の聴力の変化

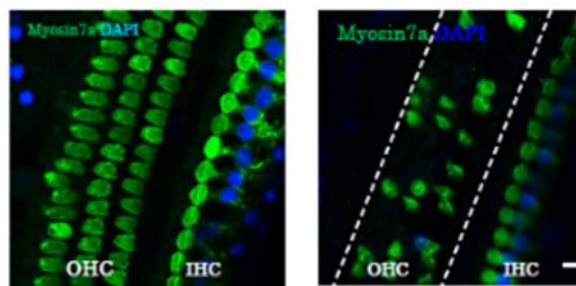


図 2 音響暴露後の外有毛細胞の変化

2. Muse 細胞移植後の聴力の変化

障害モデルに 10,000 個の Muse 細胞を移植した群では、移植後 6 週から 12 週までの期間、4-8kHz の間の周波数でコントロール群と比較して有意に聴力の改善を認めた。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、移植群では対照群に比較して有意に外有毛細胞の消失率が低いことが示唆された(右図 3)。また、その他の周波数領域においても、Muse 細胞移植群では対照群と比較して、外有毛細胞消失率が低い傾向が認められた。

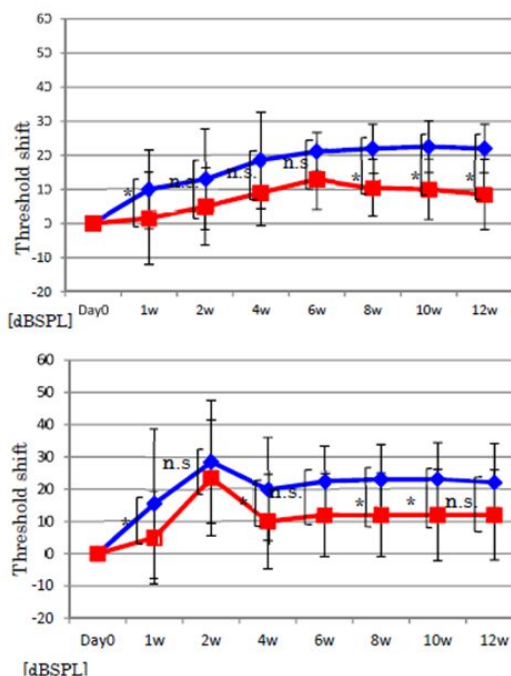
右図 3 Muse 細胞移植後の聴力の変化

上図: 4Hz 周波数領域での聴力閾値の変化

下図: 8Hz 周波数領域での聴力閾値の変化

青: Muse 細胞移植群 赤: 対照群

*: $P < 0.05$



3. マウスを使用した in vitro での障害モデルの作製

摘出した蝸牛をゲンタマイシン(GM) 35 μ M で 48 時間処理することで、無処理群と比較して約半数の外有毛細胞が消失していることが確認できた(図 4 右)。

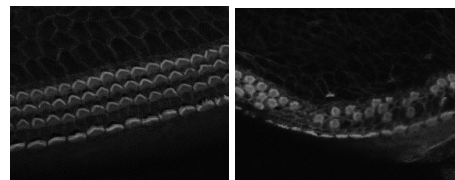


図 4 GM 処理後の外有毛細胞の変化

4. コラーゲンゲルを用いた 3 次元培養

当初は poly-HEMA コーティングによる浮遊培養で実験を行っていたが、薬剤処理をしていない蝸牛組織においても有毛細胞はほとんど消失してしまい、Muse 細胞も凝集してしまうという問題が生じた。このため、組織保護および 3 次元構造の保持の目的で、コラーゲンゲルに包埋した上で培養を行う方法を考案した。このシステムにより、長期間の組織培

養による組織の劣化が抑えられ(図 5 右)、Muse 細胞の凝集も見られなくなった(図 6 右)。さらに、組織が固定されることにより培養液の交換や、その後の免疫染色などの操作が容易となった。

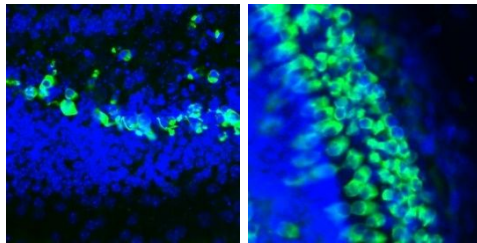


図 5 4 週間培養後の蝸牛組織 (非薬剤処理)
左：浮遊培養 右：3 次元培養

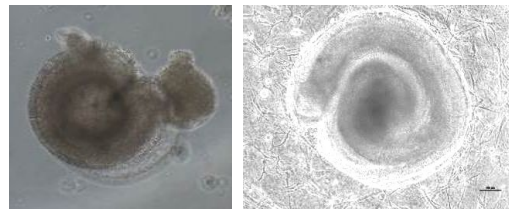


図 6 蝸牛組織と Muse 細胞の共培養
左：浮遊培養 右：3 次元培養

5. 共培養による Muse 細胞の変化

ゲンタマイシン処理した蝸牛組織と Muse 細胞の共培養を行い、Muse 細胞の変化の有無について免疫組織化学での形態学的検討を行った。共培養後 1 週間、2 週間、3 週間、4 週間で解析したところ、すべての期間において Muse 細胞での有毛細胞マーカー Myo7a の発現は陽性とならなかったが、共培養 1 週間、2 週間において、一部の Muse 細胞で神経マーカーである Tuj1 の抗原抗体反応が陽性となっていることが確認できた(図 7)。

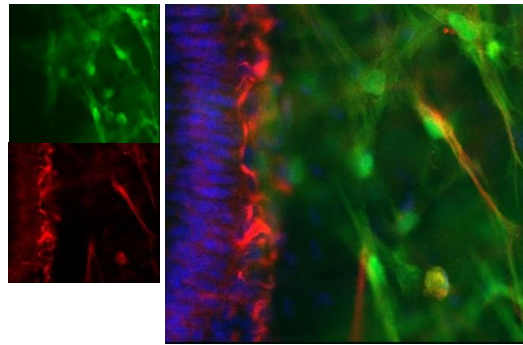


図 7 1 週間共培養後の蝸牛組織と Muse 細胞
緑：Muse 細胞、青：核染色、赤：Tuj1

6. 本研究のまとめ

本研究よりモルモット内耳障害モデルでの Muse 細胞による聴力改善の可能性および、マウス内耳 3 次元器官培養では Muse 細胞自身が神経へ分化する可能性を持つこと示された。聴力障害からの改善がみられた理由として、Muse 細胞自身の有毛細胞への分化は確認できなかったが、Muse 細胞からの聴神経への分化や Muse 細胞からの trophic factor が作用している可能性が考えられた。今後、作用機序のさらなる解析を行うことで、聴力障害に対して Muse 細胞による移植治療が応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shinkawa C, Ito T, Hozumi Y, Chiba M, Matsui H, Goto K, Kakehata S. Expression and localization of diacylglycerol kinase in guinea pig cochlea and its functional implication under noise-exposure stress conditions. *Histochem Cell Biol.* 2019 epub. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

Yutaka Koizumi, Tsukasa Ito, Seiji Kakehata. ROCK inhibitor Y-27632 accelerates auditory nerve fiber growth and synapse formation after excitotoxic trauma in organotypic culture of cochlea. Association for Research in Otolaryngology 42nd Annual MidWinter Meeting 2019

小泉優, 伊藤史, 欠畑誠治. 蝸牛器官培養聴神経障害モデルを用いた聴神経の再生. 日本耳科学会 2018

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

伊藤吏 (ITOU TSUKASA)
山形大学医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科 准教授

研究者番号：50344809

古川孝俊 (FURUKAWA TAKATOSHI)
山形大学医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科 助教

研究者番号：80466630

窪田俊憲 (KUBOTA TOSHINORI)
山形大学医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科 助教

研究者番号：80536954

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。