

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19591985  
研究課題名（和文） 多能幹細胞から内耳有毛細胞への分化と内耳再生の研究  
研究課題名（英文） Differentiation of multipotent stem cells into inner hair cells for regeneration of inner ear  
研究代表者  
小関 晶嗣 (OZEKI MASASHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：80315887

## 研究成果の概要：

胎生 18 日齢のマウスから蝸牛を取り出し、組織由来多能幹細胞を培養、分離し、セルラインとして確立した。また、音響傷害性難聴モデルマウスの作成に成功した。

しかし、多能幹細胞へのマイコプラズマの感染により、実験は終了となった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：多能幹細胞、内耳再生、内耳性難聴

## 1. 研究開始当初の背景

耳鼻咽喉科医にとって不可逆性の内耳性難聴の治療は現在に残された大きな課題である。急性感音性難聴(突発性難聴を含む)は、

内耳性難聴の原因の大半を占めるが、これらの疾患の原因はほとんど解明されていない。内耳虚血説、ウィルス感染説などがあるが、いずれもはっきりとした原因はわかってい

ない。

内耳有毛細胞、らせん神経節細胞の変性消失などにより難聴が生じることがわかっているが、これらの細胞の変性、消失が生じる機序は不明である。治療はステロイド、ビタミン B12、ATP などを用いているが、これらは経験的なものであり、発症の機序が不明であるため、治療効果は症例により異なっている。しかも急性期を逃した場合、現在の一般的な治療の中で、回復する術はない。今後の展望として、有毛細胞の機能を何らかの細胞で再生できれば、感音性難聴を克服できる可能性があると考えられる。

現在再生医療は、機能損失した器官の治療法として注目を集めており、幹細胞を用いた研究は数多くなされている。しかし、細胞の分化には様々な遺伝子が複雑に関わっており、幹細胞からの分化増殖は簡単ではない。これまで、転写因子 ID1 蛋白 (inhibitors of differentiation) に注目し、内耳の発達における転写因子のネットワーク重要性を示唆した。また、遺伝子操作により内耳前駆細胞をある程度の段階まで分化させ、内耳の障害部位に移植する方法を提案した。前駆細胞を分化させ、有毛細胞の組織特異的マーカー遺伝子の発現を検知することには成功したが、今後は機能回復まで発展させることが課題である。

そこで今回は組織多能幹細胞に注目した。一般に幹細胞は骨髄のみに存在し、その幹細胞が分化して障害部位で機能修復すると考えられてきた。しかし胎児などの未分化な組織は、至るところに組織多能幹細胞が存在し、蝸牛にも分化発達する前段階の細胞も存在することがわかってきた。この組織幹細胞は、成熟細胞に分化する以前の細胞であり、骨髄由来の幹細胞よりも内耳有毛細胞に近い細胞であると考えられる。

組織多能幹細胞を投与することにより、内耳有毛細胞の回復を促すことができれば、今後の内耳性難聴の治療において新たな治療法となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

有毛細胞の機能を何らかの細胞で再生できれば、感音性難聴を克服できる可能性があると考えられる。そのため、組織多能幹細胞セルラインを確立し、その後内耳前駆細胞と共生させ、栄養因子の発現について検討する。

その後、内耳損傷モデルマウスを作成し、幹細胞を局所投与する。幹細胞の放出する成長因子などにより内耳細胞の保護、再生が促進されること、幹細胞そのものが内耳有毛細胞に成長することが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 内耳多能幹細胞のセルライン確立

胎生 18 日齢のマウスから蝸牛を取り出し、抗生剤を含む生理食塩水で洗浄後、蝸牛を粉碎し、ナイロンメッシュにてろ過した後、増殖因子を含む培養液で 37°C で培養する。シャーレ内に浮遊し、球状に増殖する細胞塊のみを選択し、未分化神経細胞に陽性であるネスチンが陽性細胞を分離し、セルラインとして使用する。また細胞の形態的、RT-PCR、cDNAmicroarray、免疫染色にて分子生物学的検討を行い、細胞の性格決定を行う。

### (2) セルラインへの形質導入

ネスチン、Musashil, GFAP 等の神経幹細胞で発現するマーカーを RT-PCR もしくは免疫染色、western blotting 等で検討する。その後、その組織幹細胞に、math1 (atho1) などの転写因子を形質導入する。また、レチノン酸、ビタミン B12、ヘパリンと共培養し、この幹細胞がどのような変化をするか観察す

る。

### (3) 難聴モデルマウスの作成

ICR マウス 8 週齢♂を使用した。音響付加装置内に小さなゲージを入れ、4kHz、120dB にて音響付加を行う。1-2 週間後に ABR にて聴力を計測する。

## 4. 研究成果

### (1) 内耳多能幹細胞のセルライン確立

胎生 18 日齢のマウスから蝸牛を取り出し増殖因子(EGF、VEGF)を含む培養液で 37°C で培養した。シャーレ内に浮遊し、球状に増殖する細胞塊のみを選択し、培養を続けた(neurosphere 法)。分離された細胞を培養し、セルラインとして使用する。

培養細胞は RT-PCR、免疫染色にてネスチンが陽性と認められた。その後、その組織幹細胞に、転写因子である math1 (atho1) の形質導入を試みた。しかし、同じ培養器を用いた他の細胞よりマイコプラズマが検出された。今回セルラインとして使用した内耳多能幹細胞もマイコプラズマ感染が発覚し、細胞は破棄した。

### (2) 難聴モデルマウスの作成

無麻酔下、4kHz、110dB、4 時間の音響付加では、ABR の閾値変化を認めた。しかし。付加音圧を 120dB に増大したところ、ABR にて 20-30dB の ABR の閾値変化を認めた。

上記多能幹細胞の破棄に伴い、実験は中断した。

## 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 1 件)

①小関 晶嗣, Id1 Induces the Proliferation of Cochlear Sensory epithelial cells via the NF- $\kappa$ B/Cyclin D1 Pathway in vitro, J neurosci Res., 査読有, 85(3), 2007, 515-524

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小関 晶嗣 (OZEKI MASASHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号 : 80315887

### (2) 研究分担者

濱島 有喜 (HAMAJIMA YUKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号 : 30343403

中村 善久 (NAKAMURA YOSHIHISA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90360023

高橋 真理子 (TAKAHASHI MARIKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00336687

(3)連携研究者