

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890056

研究課題名（和文） 哺乳類前庭有毛細胞の再生様式に関する研究

研究課題名（英文） Reserch about the pattern when the mammalian vestibular sensory cells regenerate.

研究代表者

鈴川 佳吾（SUZUKAWA KEIGO）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50447398

## 研究成果の概要：

哺乳類前庭感覚器において、傷害後一定期間が経過した後に有毛細胞の数が増加することが知られているが、その再生の様式については現在のところ一定した見解がない。この機序を解明すべく研究をおこなった。モルモットを用いた実験の結果、支持細胞の非対称的な有糸分裂（mitosis）による有毛細胞形成の可能性は低く、支持細胞の有毛細胞への分化転換もしくは傷害有毛細胞の自己修復の可能性が高いと考えられた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,985,000

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：(1)前庭 (2)有毛細胞 (3)支持細胞 (4)再生

## 1. 研究開始当初の背景

現在までの内耳有毛細胞の再生に関する様々な基礎研究から、哺乳類の蝸牛有毛細胞は傷害後に基本的には再生しないと知られ

ている。しかし変温動物や鳥類では有毛細胞が消失した際、支持細胞がそれを受けて細胞周期に入り分裂・分化することで再生されることがわかっており（Corwin and Cotanche 1988）、さらに哺乳類でも前庭の有毛細胞は

軽微ではあるが、傷害後に再生を示唆する有毛細胞の出現がみられることが確認されている。またこの現象は細胞増殖因子を投与することで促進することが知られている。(Li and Forge 1997)

内耳有毛細胞に再生医療を応用する場合、目的の組織の自発的な再生を促すのが最も自然な方向であると思われる。従って哺乳類前庭有毛細胞に本来備わっている自発的再生の機構解明に関する研究は極めて重要である。さらにその研究成果は蝸牛有毛細胞の再生誘導研究にも役立つことは間違いない。

通常有毛細胞が傷害された後に再生する機序としては 支持細胞の非対称的な有糸分裂 (mitosis) による有毛細胞形成、支持細胞の有糸分裂を経ない有毛細胞への分化転換 (transdifferentiation)、部分的に傷害を受けた有毛細胞による自己修復 (self repair) などが考えられている。

前述の前庭有毛細胞再生の基礎研究においては、傷害後一定期間が経過した後に有毛細胞の数が増加することは確認されているが、この再生のプロセスが上述の機序のいずれに相当するかのコンセンサスは得られていない。

## 2. 研究の目的

上述した機序を解明することは、今後内耳有毛細胞再生の研究をするにあたって、重要な情報となると考えられる。今回の研究では前庭有毛細胞のわずかな再生がいかなる機序で起こっているのかを解明し、将来的には p27siRNA 組み込みアデノウィルスベクターなどを用いた有毛細胞傷害後の再生につなげるべく研究を行った。

## 3. 研究の方法およびその成果

本研究期間中に以下の実験を施行した。

### (1)前庭有毛細胞傷害モデルの作成

体重 250 ~ 300g でプライエル反射陽性のハートレーモルモットを用いて、ゲンタマイシン鼓室内投与 (原液: 10mg/ml) による内耳前庭細胞傷害モデルを作成した。麻酔下にモルモットの片側耳後部を切開、鼓室を開放したのち、ゲンタマイシン溶解液を注入、鼓室を閉鎖しゲンタマイシン注入液が漏出し

ないように注意した。

### (2)モルモット前庭支持細胞に特異的なマーカーの検索 (準備実験)

正常なモルモットの前庭感覚器パラフィン切片を用いて、前庭感覚上皮支持細胞に特異的な染色マーカーを検索した。Cytokeratin、Vimentin、p27、S100A1 の細胞骨格マーカーおよび GFAP などの神経グリアマーカーを検討した。それぞれの物質に対する抗体を用意し、まず酵素抗体法による単染色を施行し各物質の局在を観察、さらにその上で Myosin VIIa 抗体と各候補抗体との蛍光 2 重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、それらの候補抗体が支持細胞に対する有用なマーカーとなりうる可能性を検討した。

### (3)モルモット前庭感覚細胞の再生様式の研究 (本実験)

体重 250 ~ 300g でプライエル反射陽性のハートレーモルモットを用いて、前述のゲンタマイシン片側鼓室内投与による内耳前庭細胞傷害モデルを作成し、それぞれ 2 週間後、4 週間後、6 週間後に断頭、前庭組織を採取した (各群 5-6 匹)。その際、断頭 2 週間前より BromodeoxyUridine (BrdU) を 1mg/ml にて調整した飲料水を 2 週間摂取させた。長期にわたる BrdU 投与でマウスが死亡する危険性があるため、今回の実験では投与期間を 2 週間に限って行った。組織採取ののち、固定脱灰を経てパラフィン切片を作成、抗 Myosin 7a 抗体による有毛細胞染色および抗 BrdU 染色による 2 重染色を行い、前庭感覚上皮上で支持細胞の有糸分裂による前庭感覚細胞の再生の有無を検討した。

## 4. 研究成果

前述の実験における成果を以下に示す

### (1)前庭有毛細胞傷害モデルの作成

注入後 2 週間後で断頭したところ無手術側に比べ卵形嚢・球形嚢・半規管膨大部の有毛細胞の脱落がみられ、前庭有毛細胞障害モデルモルモットが作成されたことを確認した。

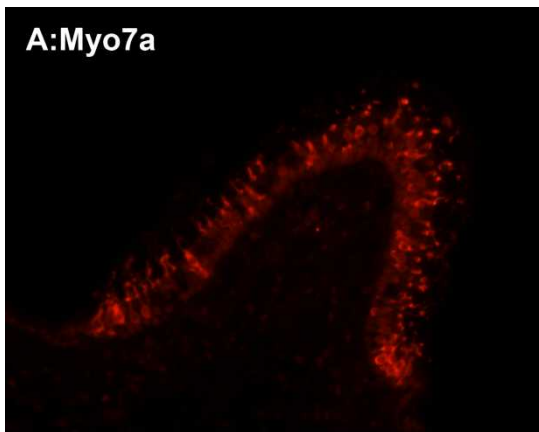
## (2) モルモット前庭支持細胞に特異的なマーカーの検索

正常なモルモットの前庭感覚器パラフィン切片を用いて、前庭感覚上皮支持細胞に特異的な染色マーカーを検索した。Cytokeratin、Vimentin、S100A1 の細胞骨格マーカーにおいて前庭感覚上皮に陽性細胞を認めた。さらに Myosin VIIa 抗体と各候補抗体との 2 重染色を行い、その結果、これらの中では Vimentin 染色において有毛細胞以外の感覚上皮細胞の染色がなされ、支持細胞の染色に有用なマーカーであることが確認された。

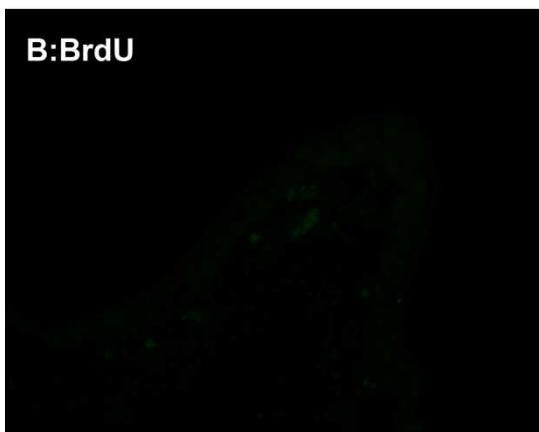
## (3) モルモット前庭感覚細胞の再生様式の研究 (本実験)

体重 250 ~ 300g でプライエル反射陽性のハートレーモルモットを用いて、ゲンタマイシン片側鼓室内投与による内耳前庭細胞傷害モデルを作成し、それぞれ 2 週間後、4 週間後、6 週間後に断頭、前庭組織を採取した (各群 5-6 匹)。その際、断頭 2 週間前より BromodeoxyUridine (BrdU) を 1mg/ml にて調整した飲料水を 2 週間摂取させた。2 週間の投与期間では実験期間中すべてのモルモットが生存した。組織採取ののち、抗 Myosin 7a 抗体による有毛細胞染色および抗 BrdU 染色による 2 重染色を行い、前庭感覚上皮上で支持細胞の有糸分裂による前庭感覚細胞の再生の有無を検討した。結果、各群において明らかにゲンタマイシン注入側で卵形嚢・球形嚢および半規管膨大部の有毛細胞の脱落がみられた。BrdU と Myo7a の 2 重染色では、各群とも感覚上皮の中でも基底膜に沿った部位に BrdU 陽性細胞が数個確認される個体が見られた。これによりまず飲水によって体内に取り込まれた BrdU が内耳まで到達し、分裂細胞内に取り込まれることが証明された。しかし、これらの細胞はいずれも基底膜直上に存在するのみで、有毛細胞のマーカーである Myo7a に陽性となることはなかった (図 1)。これより、前提有毛細胞の再生様式としては、支持細胞の有糸分裂以外の様式の可能性が高いと考えられた。

A: Myo7a



B: BrdU



(図 1) ゲンタマイシン傷害 6 週間後のモルモット半規管膨大部の抗 Myo7a 抗体免疫染色 (A) および抗 BrdU 抗体免疫染色 (B): 2 重陽性になる細胞はみられなかった

前庭 (耳石器・半規管) 感覚上皮におけし傷害後の反応として、有毛細胞の分裂の有糸分裂はなく、支持細胞の増殖はあるものある程度限られており、あきらかに前庭有毛細胞の再生に寄与する可能性が低いことが今回の実験で示唆された。

今後の方針として、支持細胞の形質転換の有無や障害有毛細胞の自己修復の有無の確認をすべく今後検討を行う必要性が考えられた。

## 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 3 件)

Kondo K, Watanabe K, Sakamoto T,

Suzukawa K, Nibu K, Kaga K, Yamasoba T.:  
Distribution and severity of spontaneous  
lesions in the neuroepithelium and  
Bowman's glands in mouse olfactory mucosa:  
age-related progression. Cell Tissue Res  
3352008 489-503 査読有

Suzukawa K, Karino S, Yamasoba T.:  
Surgical treatment of medial meatal  
fibrosis. Report of four cases. Auris  
Nasus Larynx 85 2007 1403-12 査読有

Kashio A, Sakamoto T, Suzukawa K, Asoh  
S, Ohta S, Yamasoba T.: A protein derived  
from the fusion of TAT peptide and FNK, a  
Bcl-x(L) derivative, prevents cochlear  
hair cell death from aminoglycoside  
ototoxicity in vivo. J Neurosci Res 85  
2007 1403-12 査読有

[学会発表](計 3件)

鈴川佳吾, 近藤健二, 坂本幸士, 渡辺健  
太, 山嵜達也 : 嗅上皮傷害モデルマウス  
における嗅上皮再生に及ぼす加齢の影響, 非  
傷害動物の細胞動態との比較: 日本鼻科学会  
学術講演会 2008.9.27 名古屋市

鈴川佳吾, 近藤健二, 坂本幸士, 渡辺健  
太, 山嵜達也 : 嗅上皮傷害物質メチマゾ  
ール投与マウスにおいて加齢変化が嗅上皮  
の再生過程に及ぼす影響の検討: 第46回日本  
鼻科学会総会 2007.9.28 宇都宮市

鈴川佳吾, 伊藤健, 山嵜達也, 加我君孝:  
当科における小児人工内耳61症例の検討: 第  
108回日本耳鼻咽喉科学会総会 2007.5.17 金  
沢市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴川 佳吾 (SUZUKAWA KEIGO)

東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50447398

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

山嵜達也 (YAMASOBA TATSUYA)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 60251302

鈴木光也 (SUZUKI MIYUYA)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 50302724

樫尾明憲 (KASHIO AKINORI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20451809

