

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09898

研究課題名（和文）蝸牛外側壁組織培養と生細胞蛍光イメージングを用いた難聴予防・治療戦略の探索

研究課題名（英文）Exploration of Hearing Loss Prevention and Treatment Strategies using Cultured Cochlear Lateral Wall and Live Cell Fluorescence Imaging

研究代表者

増田 正次（MASUDA, Masatsugu）

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：20317225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：内耳蝸牛の外側壁細胞群は、正常な聴力の維持に必須の役割を担っている。本研究では、外側壁細胞群の中でも中間細胞に焦点をあてて研究を開始した。外側壁組織培養中の中間細胞の経時的な形態変化を観察した結果、中間細胞は蝸牛内の物質輸送以外にも多彩な機能を有している可能性が示唆された。メラノサイト増殖因子群とサプリメントとして市販されている抗酸化剤が、中間細胞の酸化ストレスや加齢に伴う生存率減少軽減効果を有している可能性が示唆された。現在、歯周組織再生剤として臨床応用されている線維芽細胞成長因子(FGF2)に、外側壁組織の細胞増殖効果を認めた。FGF2が耳科分野にも応用可能であることを示唆する知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴覚にかかわる神経回路の最も末梢にある蝸牛有毛細胞を再生させる研究は世界中で非常に熱心に行われている。しかし、著明な効果を有する薬剤が臨床現場で汎用されるには長い時間と莫大な費用を要することが予想される状況である。一方、外側壁細胞群は薬剤により再生や増殖を促すことが比較的容易であることが示された。外側壁細胞群が正常に機能しなければ有毛細胞も正常な機能、生存は不可能である。急性難聴や加齢性難聴など幅広い病態を含む難聴の新規予防法、治療法を早期に臨床現場へ導入するためには蝸牛外側壁細胞群をターゲットにした研究が有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：The cells in the cochlear lateral wall cell of the inner ear play an essential role in maintaining normal hearing. In this study, we focused on the intermediate cells within the lateral wall cell population and initiated our investigation. Observing the temporal morphological changes of intermediate cells in cultured tissues suggested that these cells may have diverse functions beyond substance transport within the cochlea. It was also suggested that melanocyte growth factors and commercially available antioxidants marketed as supplements potentially have a mitigating effect on the decreased survival rate of intermediate cells due to oxidative stress or aging. Furthermore, fibroblast growth factor 2 (FGF2), currently used clinically as a periodontal tissue regenerative agent, demonstrated cell proliferative effects on the outer wall tissues, suggesting its potential application in otology.

研究分野：耳科学

キーワード：難聴 ストレス 中間細胞 蝸牛 外側壁 メラノサイト 抗酸化剤 線維芽細胞成長因子

# 1. 研究開始当初の背景

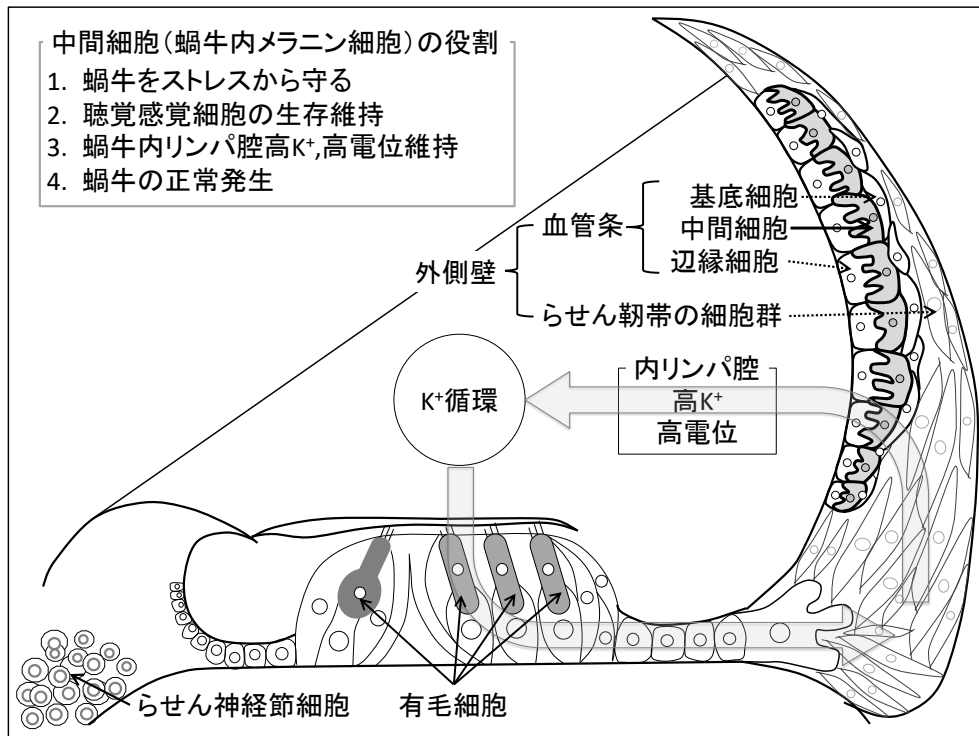


図1 蝸牛断面の模式図

聴覚の末梢感覚器は内耳の蝸牛である(図 1)。鋭敏な聴覚は蝸牛内リンパ液の高  $K^+$ 濃度と高電位が維持され、音刺激に応じて  $K^+$ が蝸牛の感覚細胞(有毛細胞)に素早く十分量流入することにより達成される。蝸牛外側壁では多種の細胞が機能性ネットワークを構築し、リンパ液内の  $K^+$ の還流をコントロールし、内リンパのイオン濃度・電位恒常性を維持している。中間細胞は蝸牛の外側壁の一部、血管条に存在し、イオン循環の”モーター”として、また高電位発生の”電池”として中心的な役割を担っている。よって、中間細胞の正常機能を維持することが良好な聴覚維持に必須である。また、中間細胞の正常機能は有毛細胞の生存にも必須である。<sup>1)</sup>さらに、中間細胞の機能変化が蝸牛加齢性変化のトリガーとなっている可能性が示唆されている。<sup>2)</sup>つまり、今後再生医療で生理的には再生しない有毛細胞が再生されたとしても、正常な中間細胞が維持されていなければ聴力は改善せず、再生有毛細胞も消失してしまう。

中間細胞は蝸牛を様々なストレスから守る防御細胞として機能していることも示唆されている。このことは、中間細胞はメラニン細胞であり、皮膚にメラニン色素を多く有している哺乳類の方が白色の哺乳類より騒音、耳毒性物質による聴覚障害が少ないというような現象からも想定はされてきた。中間細胞による抗酸化物質の産生や、中間細胞から周囲の細胞へのメラニン顆粒の輸送分配が蝸牛細胞群の防御因子として機能している可能性が示唆されているが詳細は不明である。<sup>3,4)</sup>中間細胞の蝸牛防御機能研究が進まない理由は、中間細胞と周囲の細胞とのネットワークを維持しながら外側壁全体を観察するため組織培養を行い且つ多数種の細胞群の中で中間細胞の経時的観察が容易な実験系が確立されていなかったことにある。本研究では研究開始当時、外側壁組織培養中の中間細胞の動態を経時的に評価可能な実験系を確立しており(図 2)、この実験系を用いさまざまなストレス負荷、防御化合物が中間細胞に与える作用を分析する計画であった。

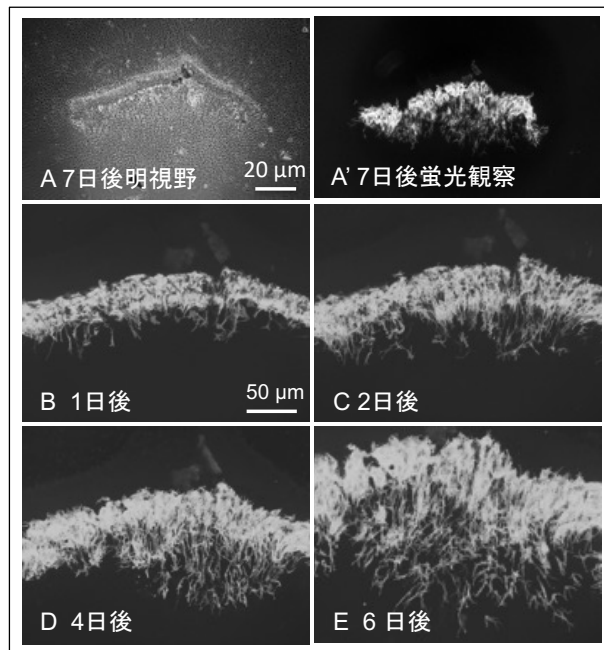


図2 本研究の実験系により外側壁組織培養中の中間細胞を経時的に観察できる様子。

## 2. 研究の目的

- (1) 外側壁組織培養中の中間細胞の形態を経時的に観察し、中間細胞のこれまで注目されていなかった新たな機能の可能性について形態をもとに推察する。
- (2) 中間細胞が再生、増殖過程に関し、蝸牛内においてメラノサイト同様の性質を有しているか、メラノサイト成長因子群への応答を観察することで考察する。
- (3) 老人性難聴、メニエール病など慢性・進行性感音難聴疾患に対し、長期に内服摂取可能で難聴予防に適した内服候補物質が外側壁組織培養中の中間細胞に及ぼす影響を分析する。
- (4) 急性感音難聴の新規治療候補薬が外側壁培養組織に及ぼす影響を分析する。

## 3. 研究の方法

(1) 外側壁の中間細胞が蛍光ラベルされたマウス(生後8日齢以内)を使用した実験  
この実験系においては、外側壁培養組織を蛍光顕微鏡で撮影した際、組織中の総蛍光輝度を中間細胞の生存率を反映する定量値として分析を行った。

- ① 組織培養中(10% FBS 含有)の中間細胞の形態を経時的に観察した。
- ② 通常培地(1% FBS 含有)と同培地にメラノサイト培養サプリメントを添加した培地における総蛍光輝度の変化率の違いを分析した。組織培養開始時の総蛍光輝度を100%とし、7日後に何%の総蛍光輝度が保たれているかを測定した。
- ③  $H_2O_2$ を培地に添加し、酸化ストレス負荷による総蛍光輝度の変化量を経時的に測定した。
- ④ アスタキサンチンはヒト声帯においては抗酸化作用に基づく音声保護機能が示されている<sup>5)</sup>。通常培地(1% FBS 含有)と同培地にアスタキサンチンを添加した培地における双蛍光輝度の変化率の違いを分析した。培養2日後の総蛍光輝度を100%とし、7日後に何%の総蛍光輝度が保たれているかを測定した。

(2) 野生型マウス(生後1週齢以内)の外側壁組織培養を用いた実験

この実験系においては、外側壁培養組織を光学顕微鏡の明視野で撮影した際、組織の総面積を画素数として測定し、画素数の変化が組織の成長率を反映する定量値となるとして分析を行った。塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF2)を通常培養液に添加することにより、外側壁培養組織の成長が促進するかを分析した。

## 4. 研究成果

(1)-① 外側壁採取直後は、蛍光標識中間細胞が外側壁(図3A, B)の血管条内に局限して発現していた。血管条内において樹状突起に類似した構造を有することは知られているが<sup>6)</sup>、組織培養を継続すると中間細胞は樹状突起を著明に伸展させ神経膠細胞様の形態となった(図3C)。中間細胞は骨・軟骨細胞、神経細胞、神経膠細胞、メラノサイト同様に神経堤由来の細胞であるがゆえ、多彩な、未解明の機能を有し、周囲の細胞群、ひいては聴覚感度に影響を与えている可能性を示唆する知見である。

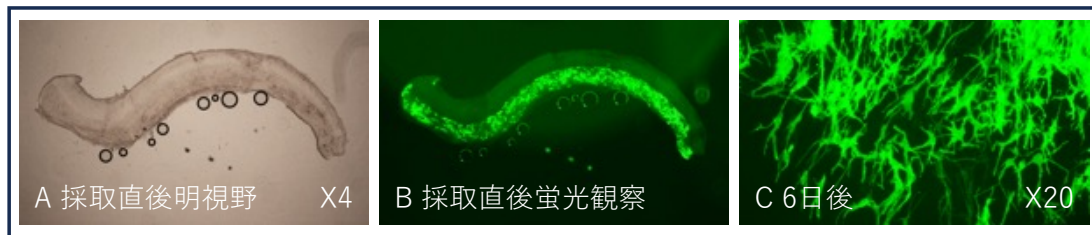


図3 培養継続に伴う中間細胞の形態変化。

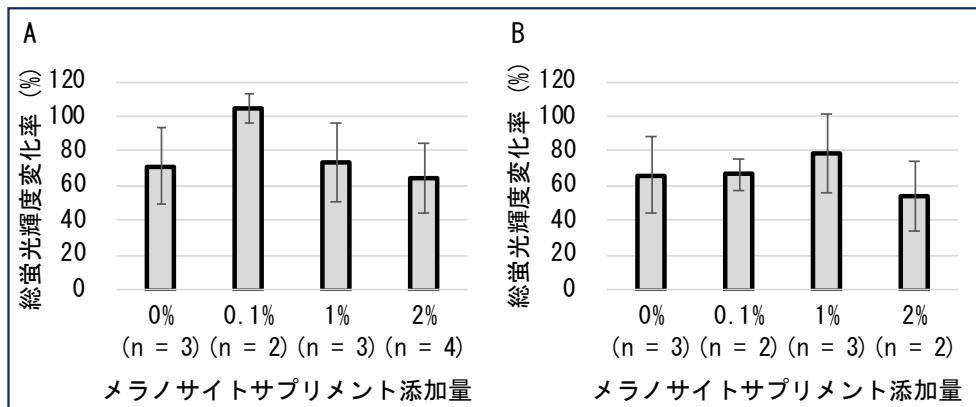


図4 メラノサイトサプリメントが中間細胞生存率に与える影響。A: 通常培地へサプリメントを添加した効果。B: 通常培地へ $H_2O_2$ 酸化ストレスとサプリメントを同時に添加した効果。

(1)-②③ メラノサイト増殖培地により、中間細胞の生存率増加傾向を認めた(図4A)。メラノサイトの減少がヒトにおける加齢性難聴にも関与していることが示されており<sup>7)</sup>、メラノサイトを活性化させる因子が加齢性難聴にも有効な可能性を示唆する所見である。酸化ストレスにより中間細胞が障害されることを観察可能であることを確認したのち(図5)、メラノサイトサプリメントにより中間細胞の酸化ストレス障害が軽減されるか検討した。酸化ストレスがメラノサイトサプリメントにより軽減される傾向は認めなかった(図4B)。経時的な変化ではなく、強度のストレス負荷の軽減にはメラノサイト活性化は不十分なことを示唆している。

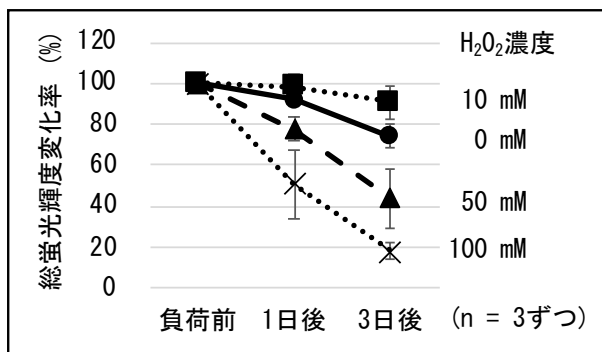


図5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>酸化ストレスが中間細胞の生存率に与える影響。

(1)-④ アスタキサンチンを培地へ添加することにより、時間経過に伴う中間細胞の生存率低下が軽減する傾向を認めた(図6)。アスタキサンチンはサプリメントとして市販されている抗酸化剤である。マウス内耳への投与により、蝸牛有毛細胞の音響障害軽減作用報告されている<sup>8)</sup>。我々の研究結果は、強大音による急性障害のみならず、継続的な摂取により、加齢のような経時的変化に伴う難聴の予防にも有益である可能性を示唆する知見である。

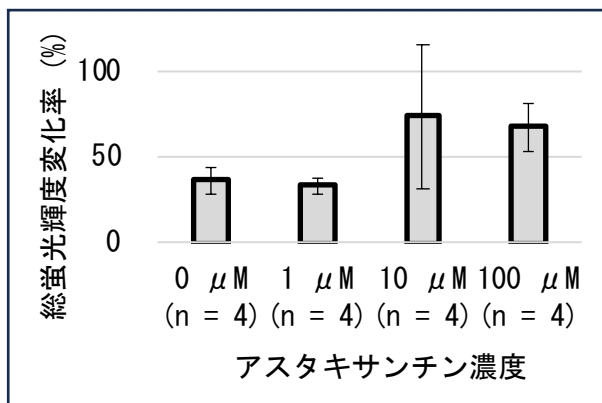


図6 アスタキサンチンが中間細胞の生存率に与える影響。

(2) FGF2 を培地へ添加することにより、外側壁組織の増殖が促進されることを認めた(図7)。外側壁細胞の中でどの細胞が特に増殖促進効果を受けているかについては未評価である。マウスにおいて、耳毒性物質により内耳障害を誘導後、FGF(FGF分子種のうちどの種であるかは不明)の蝸牛内持続投与により、外側壁の複数の細胞腫が増殖することが報告されている<sup>9)</sup>。FGF2は現在歯周組織再生剤リグロス<sup>®</sup>として使用されている。本研究結果は過去の報告と矛盾せず、FGF2が耳科分野へ応用可能であることを示唆している。

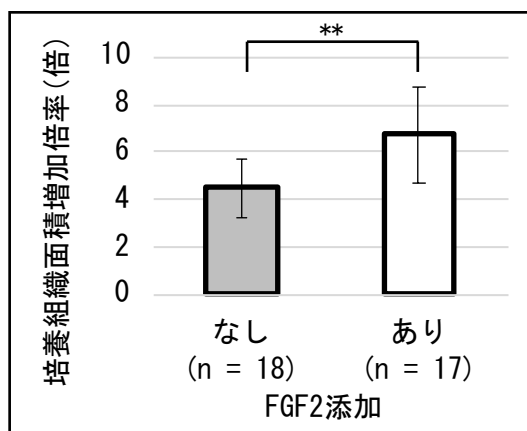


図7 FGF2が中間細胞の増殖率に与える影響。

\*\*： p = 0.0004, Mann-Whitney test.

[参考文献]

- 1) Liu H, Li Y, Chen L, et al.: Organ of Corti and Stria Vascularis: Is there an Interdependence for Survival? PLoS One 11: e0168953, 2016
- 2) Herranen A, Ikaheimo K, Virkkala J, et al.: The Stress Response in the Non-sensory Cells of the Cochlea Under Pathological Conditions-Possible Role in Mediating Noise Vulnerability. J Assoc Res Otolaryngol, 2018
- 3) Fujimura T, Suzuki H, Udaka T, et al.: Immunoreactivities for glutathione S-transferases and glutathione peroxidase in the lateral wall of pigmented and albino guinea pig cochlea. Med Mol Morphol 41: 139-144, 2008
- 4) Ohlemiller KK, Rice ME, Lett JM, et al.: Absence of strial melanin coincides with age-associated marginal cell loss and endocochlear potential decline. Hear

Res 249: 1-14, 2009

- 5) 平野滋: 高齢者音声障害への対応 高齢者音声障害への対応 アンチエイジング 酸化ストレスへの対応. 喉頭 33: 144-148, 2021
- 6) 竹内 俊: 血管条の組織構築と機能メカニズム. Audiology Japan 45: 271-277, 2002
- 7) Li CL, Ma SH, Wu CY, et al.: Association between sensorineural hearing loss and vitiligo: a nationwide population-based cohort study. J Eur Acad Dermatol Venereol 36: 1097-1103, 2022
- 8) 小林由貴, 菅原一真, 竹本洋介, et al.: アスタキサンチンナノ製剤による有毛細胞保護効果についての検討. 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 34: 53-55, 2020
- 9) 山下裕司: 内耳への直接的薬剤注入法による蝸牛血管条の再生に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 <https://research-er.jp/projects/view/142473>: 1997

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuda Masatsugu, Morita Masahiro, Matsuda Takehiro, Nakamura Takehiro, Matsumoto Jobu, Miyama Yoshiko, Kasakura-Kimura Natsuko, Kohno Naoyuki, Saito Koichiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Risk of Sensorineural Hearing Loss in Patulous Eustachian Tube	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 e521 ~ e529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000003059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

杏林大学 医学研究科 研究室・研究グループ紹介：耳鼻咽喉科 耳科学（聴覚）に関する研究 <a href="https://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/otolaryngology/">https://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/otolaryngology/</a> 杏林大学医学部 教室紹介 耳鼻咽喉科学教室 <a href="http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/otolaryngology/">http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/otolaryngology/</a> 杏林大学 医学研究科 研究室・研究グループ紹介 <a href="http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/otolaryngology/">http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/otolaryngology/</a> 杏林大学 医学研究科 研究室・研究グループ紹介：耳鼻咽喉科学教室 <a href="https://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/otolaryngology/">https://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/otolaryngology/</a>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------