

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591973

研究課題名(和文) 蝸牛有毛細胞の再生に関わる支持細胞の分裂・増殖・分化とアポトーシスの機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of mechanism of division, proliferation, differentiation, and apoptosis of supporting cells in regeneration of cochlear hair cells

研究代表者

鈴木 光也 (SUZUKI MITSUYA)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：50302724

研究成果の概要(和文)：

生後7日目のラットでは蝸牛支持細胞領域に抗 Caspase 3 抗体および抗 p27 抗体陽性細胞を認め、アポトーシス促進と増殖能の停止が確認できた。生後7日目のラットのコルチ器をネオマイシン1mMまたは酢酸を含有した培養液中に浸漬し、5日間組織培養を行った。感覚細胞傷害後の支持細胞の分裂・増殖の状態を観察するために、培養3日目からはBrdU 1mg/Lを投与しBrdUの取り込みを観察したが、明らかなBrdU陽性細胞を支持細胞領域に同定することは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：

In developing rats, double-staining with antibodies to Caspase 3 and p27 have shown that large numbers of positive staining cells exist in the organ of Corti on 7 days after birth. These findings suggest that apoptosis is promoted and that proliferation was stopped 7 days after birth. The organ of Corti extirpated on 7th day after birth was cultured with 1mM neomycin solution or acidic acid for 5 days. Then, bromodeoxyuridine (BrdU) as a proliferation marker was administered from 3rd day after starting the culture. No BrdU positive staining cell was observed in the supporting cell, suggesting that supporting cells did not proliferate up to 3rd day after missing hair cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：耳科学、内耳形態学

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：未成熟ラット、有毛細胞、支持細胞、増殖、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

アミノグリコシド系 (AG) 抗生物質は、胎盤透過性が良いため母体に投与された薬は速やかに羊水および胎児へと移行する。内耳には血液-内耳関門が存在し血中の薬物が内耳に移行するのを制限しているが、胎生期においては血液-内耳関門が未完成であり内耳への薬の移行は成人に比べて速やかに行われる。よって妊娠後期の AG 抗生物質の投与は胎児の有毛細胞障害をきたし先天的感音性難聴を生じることが推察されるが、臨床例においてはそのような症例は少ない。これに対して、胎生期の有毛細胞が AG 抗生物質に対して耐性を有する可能性や、一旦 AG 抗生物質によって消失した有毛細胞が再生、修復された可能性を指摘しているが明らかではない。哺乳動物の中でも出生直後のラットの内耳は未熟であり、生後もなお 1-2 週間は発達し続けるため、ヒトにおける胎生後期の内耳の状態を反映するとされている。ラットの蝸牛の完成時期から考えると、生後 1 週間から 14 日目までは内耳有毛細胞が形成されている時期と思われるため、その時期のコルチ器では支持細胞の可塑性が維持されている可能性が高く、生後 14 日目までは有毛細胞が再生しやすいことが推察される。まず支持細胞においてアポトーシスの促進と細胞増殖能が停止する時期を同定し、次いで有毛細胞に傷害を与えたことによる支持細胞の細胞増殖能の再開を確認する。

2. 研究の目的

(1) 正常ラットの蝸牛支持細胞の増殖と退縮の観察
未成熟ラット (生後 0 日、1 日、2 日、3 日、7 日、14 日) の蝸牛支持細胞のアポトーシス誘導と増殖能の状態を観察する。

(2) 耳毒性薬物投与で有毛細胞が障害された未成熟ラットの蝸牛支持細胞における増殖能の再誘導の観察

蝸牛支持細胞の増殖能が停止した時期に *in vivo* および *in vitro* において蝸牛有毛細胞を傷害し、支持細胞の増殖能が再び惹起されるか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 支持細胞のアポトーシス誘導と増殖能の観察

未成熟ラット (生後 0 日、1 日、2 日、3 日、7 日、14 日) の蝸牛を摘出しホルマリン固定・脱灰後にパラフィン切片を作成し、抗 Caspase 3 抗体と抗 p27 抗体を用いて支持細胞のアポトーシス誘導と増殖能を観察した。

(2) 蝸牛有毛細胞障害の作成と蝸牛支持細胞の増殖能の再開の観察

in vivo 条件:

蝸牛障害を有する未成熟ラットの作成を目的に妊娠ラットに対して出産予定日 7 日前よりカナマイシンを連日投与し、出産後は母親ラットに BrdU (1mg/L) を 1 ml/回, 2 回/日皮下注した。BrdU を母ラットに 7 日間投与した後、未成熟ラットの蝸牛を摘出し、*surface preparation technique* を用いてコルチ器を分離し、Rhodamin Phalloidin 染色を行い、蛍光顕微鏡にて有毛細胞と支持細胞の形態学的変化を観察した。

In vitro 条件:

surface preparation technique を用いて生後 7 日目の未成熟ラットからコルチ器を分離後、ネオマイシン 1 mM または酢酸 (pH3.7) を含んだ培養液中に浸漬し、5 日間組織培養を行った。培養 3 日目からは BrdU 1 mg/L を培養液中に混入させた。培養 5 日目に 10% ホルマリンで固定し、Rhodamin Phalloidin

染色を行い、蛍光顕微鏡にて有毛細胞と支持細胞の状態を観察し、また BrdU 陽性細胞の有無を確認した。BrdU が取り込まれた細胞を同定するために、BrdU 陽性細胞が認められた標本をプレパラートから取り出し、通常の工程を経てエポキシに包埋した後に 5-7 μ m の連続切片を作成して観察した。

4. 研究成果

(1) 生後 0 日~3 日までのラットにおいて、Greater epithelial ridge および lesser epithelial ridge が認められた。

Greater epithelial ridge の領域に抗 Caspase 3 抗体陽性細胞が確認されたが、抗 p27 抗体陽性細胞は認められなかった。生後 7 日および 14 日目の一部のラットにおいて抗 Caspase 3 抗体および抗 p27 抗体ともに陽性細胞が観察された。これらの結果から生後 7 日目以降では支持細胞のアポトーシスは継続し増殖能は抑制されることが示唆された。

(2) in vivo 実験では、カナマイシンを 7 日間投与された後に生まれた未成熟ラットにおいて、Greater epithelial ridge 領域の支持細胞および有毛細胞の減少みられず、また BrdU 陽性細胞も観察されなかった。以上の結果より、妊娠ラットに対する 7 日間のカナマイシン連日投与では、胎児ラットの有毛細胞に障害を与えることは困難であることが示唆された。

(3) in vitro 条件下でネオマイシンまたは酢酸を投与したところ、どちらの薬剤においても外有毛細胞の脱落が見られたが、ネオマイシンを投与された群の方が外有毛細胞の損失は顕著であった。ネオマイシンを投与された群において、ごく少数ながら支持細胞もしくはその直下の細胞内に BrdU 陽性反応がみられたが、surface preparation によるコ

ルチ器の観察では、BrdU 陽性細胞が支持細胞か否かを判断することは困難であった。次いで連続薄切片を作成して BrdU 陽性細胞の観察を行ったが、薄切片の観察では BrdU 陽性の支持細胞を確認することは出来なかった。以上の結果から、培養条件下におけるネオマイシン 1mg 投与は、5 日間の組織培養によって著しい蝸牛有毛細胞の損失を起こさせるものの、支持細胞とその周囲の細胞の BrdU 陽性率はきわめて低く、蝸牛有毛細胞の損失 3 日以内に支持細胞の増殖能が再び高まる可能性は低いと推察した。

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 2 件)

Suzuki M, Kashio A, Sakamoto T, Yamasoba T: Effect of Burow' s solution in the guinea pig inner ear. Ann Otol. Rhinol. Laryngol. 119:495-500, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. Mitsuya Suzuki, Hitoshi Iwamura, Takashi Sakamoto, Akinori Kashio:

Effect of Burow' s solution on the basement membrane anionic sites in the stria Vascularis. 33th ARO Mid-Winter meeting, February 7, 2010, (CA, USA)

2. Mitsuya Suzuki, Akinori Kashio, Takashi Sakamoto, Tatsuya Yamasoba: Changes in the structure and function of the inner ear caused by Burow' s solution

32th ARO Mid-Winter meeting, February 17, 2009, (Baltimore, USA)

3. Mitsuya Suzuki: Induction of hair cell regeneration via the proliferation of supporting cell. 第 31 回日本神経科学大会 (シンポジウム) 2008. 7. 11

(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 光也 (SUZUKI MITSUYA)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：50302724

(2) 研究分担者

山嵜 達也 (YAMASOBA TATSUYA)
東京大学・医学部・教授
研究者番号：60251302
(H22：連携研究者)

坂本 幸士 (SAKAMOTO TAKASHI)
東京大学・医学部・講師
研究者番号：50323548
(H20：連携研究者)

檜尾 明憲 (KASHIO AKINORI)
東京大学・医学部・助教
研究者番号：20451809
(H20・22：連携研究者)

(3) 連携研究者 なし