

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592486

研究課題名(和文) 神経幹細胞による虚血性内耳障害抑制効果の機序解明の研究

研究課題名(英文) Transplantation of neuronal stem cells prevented ischemia-induced hair cell degeneration by suppressing the production of NOx.

研究代表者

白馬 伸洋 (HAKUBA, NOBUHIRO)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70304623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は長期生存が可能な一過性内耳虚血モデルを確立して、虚血性内耳障害に対する新しい治療法の開発の面より、神経幹細胞の蝸牛内投与の有効性について研究を進めてきた。

今回の研究として、神経幹細胞が内耳虚血障害後に生じるNOxなどの障害増悪因子の発生を抑制するかについて検討した結果、虚血後に神経幹細胞を投与した群では有意に上昇が抑制されていた。以上の結果より、虚血後の神経幹細胞投与による虚血性内耳障害の抑制効果の機序として、神経幹細胞が内耳虚血障害後に生じる障害増悪因子の一つであるNOxの発生を抑制を介するすることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of neuronal stem cells (NSCs) is regarded to be a potential approach for promoting repair of damaged organs. Here, we investigated the influence of NSCs on progressive hair cell degeneration after transient cochlear ischemia in gerbils. Transient cochlear ischemia was produced by extracranial occlusion of the bilateral vertebral arteries just before their entry into the transverse foramen of the cervical vertebra. Intrascalar injection of NSC prevented ischemia-induced hair cell degeneration and ameliorated hearing impairment. We also showed that the NOx level in the organ of Corti was suppressed after cochlear ischemia by treatment with NSC. Thus, we propose HSC as a potential new therapeutic strategy for hearing loss by suppressing the production of NOx in the organ of Corti after ischemia.

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：内耳虚血 内毛細胞 神経幹細胞 一酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

突発性難聴は 40～50 歳代に好発し、急激に発症して高度の感音性難聴をきたす疾患であり、我が国では年間約 2 万 5000 人が罹患する。懸命の治療にもかかわらず本症の治療率は 70%前後に過ぎず、治療に反応せず難聴が増悪する難治例もみられ、それらの症例にも有効な治療法の開発が求められている。原因としては内耳虚血説が有力であるが、本症は生命予後が良好な疾患のため臨床検体による研究には限界があり、動物モデルを用いた病態究明や治療法の開発が求められている。我々は長期生存が可能な一過性内耳虚血モデルを確立して (Hakuba1997) 内耳虚血障害を組織学的、生理学的に検討し、内有毛細胞に神経脱落が生じること (古賀 1999)、その原因としてアポトーシスが関与していること (Taniguchi2002)、そのほか蝸牛求心神経内有毛細胞系におけるグルタミン酸の神経毒 (Hakuba2000) や NO (Morizane 2005) やフリーラジカルスカベンジャーの発生が関与 (Maetani 2003) している可能性を報告してきた。また虚血性内耳障害に対する新しい治療法の開発の面より、グルタミン酸受容体拮抗剤である DNQX (Hakuba2003)、アデノウイルスを用いて導入した神経栄養因子である GDNF (Hakuba2003)、また虚血前後の低体温 (Takeda2009) が内耳障害を抑制して有用であることを報告してきた。さらに神経幹細胞の蝸牛内投与では虚血障害 24 時間の後投与であっても、4 日後に生じる進行性の内有毛細胞障害を抑制効果についても報告を行った (Hakuba2005) が、内耳における神経幹細胞による虚血性細胞障害抑制効果の機序については不明である。

一方、脳神経科学の領域においては、外傷や脳血管性の神経細胞障害に対して、神経幹細胞が NOx やアポトーシス関連蛋白、フリーラジカルスカベンジャーの発生を抑制することにより、様々な神経細胞障害

に対して抑制効果があることが報告されている。

臨床を視野に入れた場合、疾患発症後に効果がある新しい治療法の開発を検討することは不可欠であることから、虚血性内耳障害に対する虚血後投与の神経幹細胞の内耳保護効果のメカニズムを明らかにすれば、突発性難聴の新しい治療法の開発に寄与することが考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は長期生存可能な一過性内耳虚血の動物モデルを作成し、虚血・再灌流による内耳障害メカニズムやその防御法について研究を進めてきた。その結果、内耳虚血により iNOS が誘導され、誘導された iNOS によって蝸牛外リンパ液中に障害の増悪因子である NOx が発生することや、虚血後 3 日目までに有毛細胞にアポトーシスが生じ脱落が起こることを解明してきた。

今回の研究として、神経幹細胞が内耳虚血障害後に生じる NOx などの障害増悪因子の発生を抑制するかについて検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究方法について以下に示す。

1) ドナーサイドのスナネズミ胎児の海馬・線条体より採取・培養した神経幹細胞を、レシピエントサイトのスナネズミの蝸牛内に正円窓を介して、特製のガラス毛細管を用いて注入を行う。虚血後の内耳障害が抑制されるかを、虚血後 7 日目の内外有毛細胞脱落率の算出及び聴性脳幹反応 (Auditory Brain Stem: ABR) の閾値変化の測定を行い、神経幹細胞非注入のコントロール群と比較検討する。

2) 虚血後の細胞障害メカニズムの 1 つと考えられている NOx の濃度について、神経幹細胞を蝸牛内に注入した場合にはどのように変化するかを検討する。前頸部切開で実験動物の骨髄を開放し、蝸牛を明視下に蝸牛基

底回転鼓室階に小孔を作成する。そこに透析膜付微小プローブを挿入して外リンパを回収し、経時的に鼓室階外リンパ中の NO<sub>x</sub> 濃度を微小透析法と窒素分析システムを用いて測定する。マイクロシリンジポンプオートインジェクターシステムを用い、透析液を参加窒素分析装置に送ることによりリンパ球中の NO<sub>2</sub>-、NO<sub>3</sub>-の濃度を 0.1 pmol の検出感度で in vivo で測定が可能となる。37 の常温群と比較して虚血後後の NO<sub>x</sub> の濃度上昇について虚血後に神経幹細胞を投与した群としていない群に分けて検討を行った。

#### 4 . 研究成果

1) 聴性脳幹反応 ( Auditory Brain Stem: ABR ) の閾値変化の測定では、虚血後に神経幹細胞を投与した群において、コントロール群と比較し、ABR の閾値上昇が有意に抑制されていた。また蛍光顕微鏡にて基底回転の有毛細胞数の脱落細胞数率を算出した結果、内・外有毛細胞の脱落細胞数率が神経幹細胞投与群において有意に抑制されていた。以上の結果より、虚血後に神経幹細胞を投与することによって生理学的にも組織学的にも虚血性内耳障害が抑制されることが明らかとなった。

2) 蝸牛鼓室階の NO<sub>x</sub> 濃度の測定では、蝸牛基底回転鼓室階の外リンパを回収して NO<sub>x</sub> 濃度を測定を行った結果、コントロール群では虚血後に上昇が認められたリンパ中の NO<sub>x</sub> 濃度は、虚血後に神経幹細胞を投与した群では有意に上昇が抑制されていた。以上の結果より、虚血後の神経幹細胞投与による虚血性内耳障害の抑制効果の機序として、神経幹細胞が内耳虚血障害後に生じる障害増悪因子の一つである NO<sub>x</sub> の発生を抑制を介するすることが明らかとなった。

#### 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 8 件 ) すべて査読有り

1. Hakuba N, Tabata Y, Hato N, Fujiwara T, Gyo K. Gelatin hydrogel with basic fibroblast growth factor for tympanic membrane regeneration. *Otol Neurotol*. 35(3):540-4. 2014.

2. Hakuba N, Hato N, Omotehara Y, Okada M, Gyo K. / Epithelial pearl formation following tympanic membrane regeneration therapy using an atelocollagen/silicone membrane and basic fibroblast growth factor: our experience. *Clin Otolaryng*. doi: 10.1111/coa.12164. 2013.

3. Okada M, Kawaguchi AT, Hakuba N, Hyodo J, Hato N, Gyo K. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia: An experimental study in the gerbil. *Neurosci Lett*. 2013 doi:pil: S0304-3940(13)00776-3. 2013.

4. Nota J, Takahashi H, Hakuba N, Hato N, Gyo K Treatment of neural anosmia by topical application of basic fibroblast growth factor-gelatin hydrogel in the nasal cavity: an experimental study in mice. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 139(4):396-400. 2013

5. Teraoka M, Hato N, Wakisaka H, Takahashi H, Komobuchi H, Sawai N, Okada M, Hakuba H, Gyo K. Myogenin gene expression in the facial muscle following compression or resection of the facial nerve. *Acta Otolaryngol*. 132(9):1013-7. 2012.

6. 表原慶典, 白馬伸洋, 暁清文一過性内耳虚血障害に対するアポトーシス抑制人工ペブ

チド AM-111 の防御効果. 頭頸部自律神経  
25 : 10-12, 2011.

7. Hato N, Nota J, Hakuba N, Gyo K,  
Yanagihara N. Facial nerve decompression  
surgery in patients with temporal bone  
trauma: analysis of 66 cases. J Trauma.  
71(6):1789-93. 2011.

8. Omotehara Y, Hakuba N, Hato N, Okada  
M, Gyo K. Protection against ischemic  
cochlear damage by intratympanic  
administration of AM-111. Otol Neurotol.  
32(9): 1422-7. 2011.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Hakuba N. : The regeneration of  
tympanic membrane using basic fibroblast  
growth factor combined with an  
atelocollagen. European Academy of  
Otorhinolaryngology. フランス、  
2013/4/27-30 (特別講演)

2. Hakuba N. : Regenerative therapy for  
closing tympanic membrane perforation  
using bFGF combined with atelocollagen .  
Global Otology Research Forum. トルコ、  
2013/11/13 (特別講演、日本耳科学会代表講  
演)

3. Hakuba N. : The transplantation of stem  
cells for treating the sensorineural hearing  
loss associated with transient ischemia of  
the cochlea. Politzer Society Meeting. トル  
コ、2013/11/14-17 (特別講演)

4. Hakuba N : The regenerative therapy for  
closing tympanic membrane perforations  
using bFGF combined with atelocollagen,  
The 14th Japan-Korea Joint Meeting of  
Otorhinolaryngology-Head and Neck  
Surgery, 長崎、2012/4/12-14 (シンポジウ  
ム)

5. Hakuba N, : The utility of cartilage with  
perichondrium & connective tissue for

tympanoplasty. International of  
Cholesteatoma and middle ear surgery, 長  
崎、2012/6/3-7 (一般講演)

6. Hakuba N. : A new method for closing  
tympanic membrane perforations using  
basic fibroblast growth factor combined  
with an atelocollagen. International of  
Cholesteatoma and middle ear surgery, 長  
崎、2012/6/3-7 (特別講演)

7. Hakuba N, Yoshida T, Gyo K ;  
Hematopoietic stem cells prevent hair cell  
death after transient cochlear ischemia.  
Inner Ear Biology, ポルトガル、  
2011/9/18-21 (一般講演)

8. 白馬伸洋. 聴器の再生研究の進歩. 日本  
学術会議臨床医学委員会感覚器分科会, 感覚  
器ロードマップ 感覚器障害の克服と支援  
を目指す 10 年間, 東京, 2011/8/9 (公開シン  
ポジウム)

〔図書〕(計 3 件)

1. 白馬伸洋. 有毛細胞の再生. 西田幸二、高  
橋政代編、再生医療業書 4, 朝倉書店,  
pp134-142, 2013.

2. 白馬伸洋. 特集 急性感音難聴の最新治  
療戦略 急性感音難聴における新規治療の  
可能性 人工酸素運搬体 JOHNS, 28(5) :  
807-810, 2012.

3. 白馬伸洋 .bFGF 徐放化ハイドロゲルを用  
いた鼓膜再生治療 . 田原泰彦監 , ものづくり  
技術からみる再生医療—細胞研究・創薬・治  
療—, 株式会社シーエムシー出版 , pp250-254,  
2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6 . 研究組織  
(1)研究代表者

白馬 伸洋 (Hakuba,Nobuhiro)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：70304623

- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
なし