

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592488

研究課題名(和文) Side population法を用いて抽出した成体幹細胞のマウス耳胞内移植

研究課題名(英文) Otocystic inoculation of adult stem cells using side population method

研究代表者

蓑田 涼生 (Minoda, Ryosei)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：30284772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：根本治療は存在しない遺伝性難聴の治療法開発を最終目標として研究を行った。本研究においては、高い成体幹細胞活性を示す細胞群がSide population (SP) 法にて抽出した細胞のマウス胎生期内耳である耳胞の移植を行い、その正着、細胞分化について検討を行うことを目的とした。結果としてSP法による細胞分離は可能であり、マウス耳胞内への移植も可能であった。しかし、最終的に移植に必要な細胞数を得ることはできず、正着、細胞分化について評価は困難であった。

研究成果の概要(英文)：There are no fundamental treatments for genetic hearing loss. We set out this experiment to study feasibility of cell therapy in developing inner ear as a first step to develop such a fundamental treatment. Side population (SP) cells which were identified by their unique ability to efflux DNA binding dyes through an ATP-binding cassette transporter. It is reported that SP cells can be isolated from postnatal mouse cochlea and these cells can differentiate cell expressing markers of HCs and supporting cells. We isolated SP cells from postnatal mouse cochlea and implanted SP cells into the mouse otocysts. Nevertheless, it is not possible to evaluate engraftment of SP cell in the developing inner ears accurately because we could not obtain sufficient number of SP cells for injections into the otocysts.

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：遺伝性難聴 胎児 Side population

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は、すべての先天性疾患の中でも発生頻度の高い疾患の一つであり、その 50% 以上は遺伝子の関与によるものと推測されており、現在までに 100 以上もの難聴原因遺伝子が同定されている。これらの症例に対しては、現在は対症的に人工内耳埋め込み手術が行われているが、根本的な治療には、異常な表現型 (phenotype) が現れる前に 1) 内耳の遺伝子を操作する、2) 幹細胞移植により正常な機能を有する細胞を分化させる、という 2 つのアプローチ方法が考えられる。本研究は、2) 幹細胞を用いた治療法開発を目指した研究であり、前述の如く、ターゲットである内耳への治療介入は、異常な表現型が現れる前に行う必要があるため、内耳原基である耳胞をターゲットとする。

近年、さまざまな器官・組織に存在する固有の成体 (組織) 幹細胞が、それぞれの器官・組織の維持と再生を担っていることが明らかとなってきた。最近 Hoechst33342 染色を用いた Side population (SP) 法にて抽出した細胞群が、高い成体幹細胞活性を示すことが報告されており、2007 年 Savary E らによってマウス蝸牛より SP 法を用いて成体幹細胞が抽出可能であることが報告されている (STEM CELL, 2007)。

2. 研究の目的

内耳原基である耳胞は、遺伝性難聴の治療法開発のためのターゲットの一つとして極めて重要である。本研究においては、SP 法にてマウスより抽出した内耳成体幹細胞 (SP 細胞) を非 GFP マウス耳胞内へ微小ガラス管を通して投与し、その後の SP 細胞の生着、分化について検討を行う。

3. 研究の方法

2007 年 Savary E らの報告に従いマウス蝸牛より SP 法を用いて成体幹細胞が抽出を行う (STEM CELL, 2007)。SP 法にてマウスより抽出した内耳成体幹細胞 (SP 細胞) を非 GFP マウス耳胞内へ微小ガラス管を通して投与し、その後の SP 細胞の生着、分化について形態・機能的に評価を行う。

4. 研究成果

当初 SP 細胞の抽出は外部委託で行うことを計画していたが、抽出に必要なフローサイトメーターが学内で使用可能であることが分かったため、実験の効率化のためまず学内の器械を使用して SP 細胞の抽出を行うこととした。生後 3 日のマウス採取した蝸牛より SP 細胞の抽出が行った。SP 細胞の抽出は可能であったが、その細胞数は極めて少なく、このまま耳胞内に細胞移植を行うことは不可能と考え細胞培養を行ったが、抽出細胞数が少ないため、培養にても最終的に実験に必要な十分な数の SP 細胞を得ることはできなかった。その解決策として、SP 細胞に変え、培養技術の確立しているマウス由来の iPS 細胞を用いることにした。間もなく iPS 細胞を入手予定であり、引き続き SP 細胞で得られた知見をもとに研究を進めている。

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 10 件)

1. 蓑田涼生. 遺伝性難聴の治療法開発を目指した基礎研究. 熊本医学会ニューズレター. 11:8-12;2013 査読無し
2. 三輪徹、蓑田涼生、山田卓生、伊勢桃子、湯本英二. 胎生期内耳 (耳胞) への遺伝子導入による遺伝性難聴の治療. 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス. 27:30-32;2013 査読有
3. Minoda R, Takahashi H, Miyamaru S, Masuda M, Miwa T, Sanuki T, Hirai T, Yumoto E, A postmeningitic cochlear implant patient who was postoperatively diagnosed as having X-linked agammaglobulinemia, *AURIS NASUS LARYNX*, 39(6)638-640;2012 査読有
4. Toya Y, Kumai Y, Minoda R, Yumoto E, Modulation of nerve fibers in the rat thyroarytenoid muscle following recurrent laryngeal nerve injury, *Acta Otolaryngol*, 132(3)305-313;2012 査読有
5. 三輪徹、蓑田涼生. 当科における人工内耳埋め込み術後のめまいの検討. *Equilibrium Research*. 71(1)16-22;2012 査読有
6. Minoda R., Ise M, Murakami D, Kumai Y, Yumoto E, Surgical removal of diffuse-type neurofibroma involving the auditory external in a patient with neurofibromatosis type 1, *The Journal of International Advanced Otolology*, 8(3)497-502;2012 査読有
7. 三輪徹、蓑田涼生、増田聖子、湯本英二. 発症時に中耳炎を有していた末梢性顔面神経麻痺の 4 症例. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 83(11)875-881;2011. 査読有
8. 山田卓生、蓑田涼生、三輪徹、増田聖子、兒玉成博、鮫島靖浩、湯本英二. 当科における人工内耳埋込術の術後合併症に関する検討. *耳鼻と臨床*. 57(6)283-289;2011 査読有

9. 蓑田涼生. 特集 耳鼻咽喉科感染症の完全マスター 11) マイコプラズマ. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科. 83(5)123-128;2011 査読有

10. Minoda R, Miwa T, Sanuki T, Yumoto E, An Unusual Cause of Bullous Myringitis with Acute Otitis Media,

Otolaryngology-head and neck surgery. 145(5)874-875;2011 査読有

[学会発表](計41件)

1. Minoda R, Miwa T, Ise M, Yamada T, Takeda H, Yumoto E, CONNEXIN DELETION ASSOCIATED HEARING LOSS IS TREATABLE, ARO 37th Annual Midwinter Meeting, 2014.2.22-26, 米国

2. Murakami D, Samejima Y, Minoda R, Yumoto E, Novel Surgical Method of Laryngeal Closure to Prevent Intractable Aspiration in Pediatric Patients, The 12th

Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2013.12.5-12.7, 2013.12.5-12.7, 台湾

3. 山田卓生, 蓑田涼生, 伊勢桃子, 湯本英二, T I S 2 1 遺伝子改変マウスを用いた蝸牛ラセン神経節細胞の発生・分化のメカニズムの解析, 第23回日本耳科学会総会・学術講演会, 2013.11.24-11.26, 宮崎

4. 竹田大樹, 蓑田涼生, 山田卓生, 伊勢桃子, 湯本英二, Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides(CPPs)を用いた蝸牛への蛋白質導入, 第23回日本耳科学会総会・学術講演会, 2013.11.24-11.26, 宮崎

5. 熊井良彦, 蓑田涼生, 湯本英二, 緊張部型真珠腫症例の検討, 第23回日本耳科学会総会・学術講演会, 2013.11.24-11.26, 宮崎

6. 伊勢桃子, 蓑田涼生, 湯本英二, 耳管解放症患者の持つ精神特性, 第23回日本耳科学会総会・学術講演会, 2013.11.24-11.26, 宮崎

7. 蓑田涼生, ヒト遺伝性難聴の治療は可能か?, 第23回日本耳科学会総会・学術講演会, 2013.11.24-11.26, 宮崎

8. Yamada T, Minoda R, Ise M, Yumoto E, TIS21 is involved in the development of spiral ganglion cells, 50th Inner Ear Biology Workshop 2013(IEB), 2013.9.10-13, ｽﾄｰﾘｰﾄﾞ

9. Minoda R, Miwa T, Yamada T, Ise M, Yumoto E, Is a connexin deletion associated hearing loss treatable?, 50th Inner Ear Biology Workshop 2013(IEB), 2013.9.10-13, ｽﾄｰﾘｰﾄﾞ (ｽﾍﾞｲﾝ)

10. 山田卓生, 蓑田涼生, 伊勢桃子, 三輪徹, 湯本英二, TIS21 遺伝子はマウス蝸牛ラセン神経節細胞の発生・分化に必要である, 第31回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会, 2013.8.24, 大阪

11. 蓑田涼生, 人工内耳の現状について, 熊本聾学校 教員基礎講座, 2013.8.23, 熊本

12. 伊勢桃子, 蓑田涼生, 鮫島靖浩, 湯本英二, 内耳道狭窄および蝸牛低形成児に対する人工内耳埋め込み術中に E A B R を用いた1症例, 第75回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会, 2013.7.11-12, 兵庫

13. 草場雄基, 伊勢桃子, 蓑田涼生, 湯本英二, 治療に難渋した頸部巨大リンパ管腫の1症例, 第75回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会, 2013.7.11-12, 兵庫

14. 山田卓生, 蓑田涼生, 伊勢桃子, 三輪徹, 湯本英二, T I S 遺伝子はマウス蝸牛ラセン神経節細胞の発生・分化に必要である, 第28回九州連合地方部会学術講演会, 2013.6.22-23, 長崎

15. 伊勢桃子, 蓑田涼生, 鮫島靖浩, 兒玉成博, 湯本英二, 内耳道狭窄および蝸牛低形成例に対して人工内耳埋め込み術を施行した一症例, 第28回九州連合地方部会学術講演会, 2013.6.22-23, 長崎

16. Masuda M, Minoda R, Sanuki T, Yumoto E, Hearing Impairment in Nasopharyngeal Carcinoma Patients, 20th World Congress of the International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies(IFOS), 2013.6.1-5, 韓国

17. 蓑田涼生、熊井良彦、湯本英二、初回手術時所見における小児真珠腫性中耳炎と成人真珠腫性中耳炎の違い、第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2013.5.15-18、札幌
18. 蓑田涼生、人工内耳について
耳の日の講演会、2013.3.23、熊本
19. 蓑田涼生、熊井良彦、湯本英二、小児中耳真珠腫を対象とした進展度分類、術式、聴力成績に関する検討、第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会、2013.11.24-11.26、宮崎
20. 蓑田涼生、遺伝性難聴の治療法開発を目指した基礎研究、第 65 回熊本県医師会医学大会、2013.3.18、熊本
21. Minoda R , Miwa T, Yamada T , Protein Transduction Utilizing Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides Into the Cochlea , Association for Research in Otolaryngology(ARO)36th ANNUAL MIDWINTER MEETING , 2013.2.16-20 , ホルチア (米国)
22. Miwa T , Minoda R , Yamada T , Treatment for Connexin30 Deletion Associated Hearing Loss Utilizing Otocyst Trans Uterine Gene Transfer in Mice , Association for Research in Otolaryngology(ARO)36th ANNUAL MIDWINTER MEETING , 2013.2.16-20 , ホルチア (米国)
23. Yamada T , Miwa T , Ise M , Minoda R , Yumoto E , Tis21 Is Involved in Development of Spiral Ganglion Cells , Association for Research in Otolaryngology(ARO)36th ANNUAL MIDWINTER MEETING , 2013.2.16-20 , ホルチア (米国)
24. 蓑田涼生、小児真珠腫性中耳炎の治療とその問題点、平成 24 年度日本耳鼻咽喉科学会熊本県地方部会冬期学術講演会、2012.11.24、熊本
25. Minoda R , Novel Treatment for Connexin 30 Deletion-Associated Hearing Loss: Otocyst Trans-Uterine Gene Transfer in Mice , 熊本内耳セミナー , 2012.11.16 , 熊本
26. 三輪徹、蓑田涼生、山田卓生、伊勢桃子、湯本英二、胎生期内耳(耳胞)への遺伝子導入による遺伝性難聴の治療開発、第 1 回内耳研究会、2012.10.12、京都
27. 熊井良彦、蓑田涼生、湯本英二、中耳真珠腫症例における CT 軟部陰影の変化の定性的評価、第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会、2012.10.4-6、愛知
28. 蓑田涼生、内耳疾患の病態、治療に関する基礎研究、第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会、2012.10.4-6、愛知
29. 三輪徹、蓑田涼生、山田卓生、伊勢桃子、湯本英二、胎生期内耳(耳胞)への遺伝子導入による遺伝性難聴の治療、第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会、2012.10.4-6、愛知
30. 伊勢桃子、蓑田涼生、湯本英二、耳管開放症患者の持つ精神特性について、第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会、2012.10.4-6、
31. 熊井良彦、蓑田涼生、湯本英二、中耳真珠腫症例における CT 軟部陰影の変化の定性的評価、第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会、2012.10.4-6、愛知
32. Miwa T , Minoda R , Yumoto E , Mouse otocyst trans-uterine gene transfer restores hearing in Connexin30 knockdown mice , 49th Inner Ear Biology Workshop 2012(IEB) , 2012.9.30-10.2 , チュービンゲン(ドイツ)
33. 三輪徹、蓑田涼生、湯本英二、胎生期内耳(耳胞)への遺伝子導入による遺伝性難聴の治療、第 30 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、2012.8.25、大阪
34. Minoda R , Unique Manifestation of Pediatric Cholesteatoma and A Comparison Study Between Pediatric and Adult Cholesteatoma , 9th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery , 2012.6.3-7 , 長崎
35. Miwa T , Minoda R , Yumoto E , Otocystic inoculation of Connexin30-targeted shRNA induces hearing impairment in mice , 9th

International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery , 2012.6.3-7 , 長崎
36.Miwa T , Minoda R , Tomizawa K , Yumoto E , Protein transduction into the otocyst utilizing poly-arginine , The14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery , 2012.4.12-14 , 京都
37.Minoda R , Miwa T , Ise M , Protein Transduction Into the Mouse Otocyst Using Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides , Association for Research in Otolaryngology(ARO) , 2012.2.25-29 , サテライト (米国)
38. 蓑田涼生、三輪徹、伊勢桃子、湯本英二、Tsukushi ノックアウトマウスの解析、第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会、2011.11.24-26、沖縄
39. 増田聖子、蓑田涼生、湯本英二、慢性 GVHD 患者に生じた閉塞性角化症様病変の 1 例、第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会、2011.11.24-26、沖縄
40. Minoda R , Miwa T , Yumoto E , Tsukushi Gene Expression in the Mouse Cochlea , 48th Inner Ear Biology Workshop 2011(IEB) , 2011.9.18-21 , リボン(ポルトガル)
41. 三輪徹、蓑田涼生、伊勢桃子、湯本英二、Connexin30 を標的とする shRNA 発現ベクターを用いた、胎生期内耳への遺伝子導入による難聴マウスの作製、第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会、2011.7.10、久留米

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓑田 涼生 (MINODA, RYOSEI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：30284772

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

熊井 良彦 (KUMAI, YOSHIKO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：00555774

伊勢 桃子 (ISE, MOMOKO)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：20573596