

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659794

研究課題名（和文）細胞移植による聴神経再生の可視化の試み

研究課題名（英文）Visualization of regenerated auditory nerves via cell transplantation

研究代表者

伊藤 壽一 (Ito Juichi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90176339

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞移植によって再生された聴神経と脳との神経回路形成についての評価方法の開発を目的とした実験を行った。結果、Biotinylated Dextran Amine という物質が内耳から聴神経を介した脳との神経回路を可視化する目的に有用であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop methods for visualization of neural connections between the regenerated auditory nerve and central auditory system. Present results indicate the efficacy of biotinylated dextran amine as a tracer to visualize between neural connections between the inner ear and central auditory system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：耳科学

キーワード：神経トレーサー ラセン神経節 蝸牛神経核 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

高度感音難聴に対する治療は、耳鼻咽喉科領域では最も重要なテーマであり、かつ治療が困難な分野である。補聴器も使用できないほどの高度難聴者はわが国には数十万人いると推測される。それらの高度感音難聴者に対し、人工内耳が 1970 年代後半から実用化が可能となり、多くの難聴者の福音となっている。現時点での唯一の高度難聴者に対しての治療法である人工内耳は、蝸牛神経（ラセン神経節細胞）を直接電気刺激して音感を得させるために、ラセン神経節細胞の機能低下はすなわち人工内耳挿入後の聴覚再獲得の障害をもたらす。つまり、ラセン神経節細胞の再生は、人工内耳無効の聴覚障害の回復に必要である。

多能性幹細胞を移植細胞のソースとし、神経前駆細胞への分化誘導を行った後に蝸牛

に移植し、ラセン神経節細胞を再生する試みが広く行われている。移植細胞を green fluorescein protein などで標識することにより、移植細胞の蝸牛、内耳道、脳幹での局在が示されているが、神経線維の標識は弱く、移植細胞と脳幹の蝸牛神経核との間の神経回路形成を証明する所見は未だ得られていない。一方で、脊髄損傷モデルに対する神経幹細胞移植による機能再生の裏付けが、トレーサーを用いた組織学的解析でなされている (Abematsu et al., 2010)。

2. 研究の目的

これまでの細胞移植によるラセン神経節細胞の移植実験からは、移植後の細胞生存、神経分化の知見は得られてきたものの、移植細胞と中枢の蝸牛神経核との神経回路形成の

形態学的証拠は未だ示されてはいない。細胞移植によるラセン神経節細胞の再生医療実現には、電気生理学的再生のみならず、移植細胞と中枢の蝸牛神経核との神経回路形成の形態学的証明、すなわち可視化が重要である。

本研究の目的は、神経トレーサーを用いることによって、細胞移植によるラセン神経節細胞の機能的再生の裏付けとなる形態学的所見を得ることにある。

第一段階として、正常動物を用い、蝸牛から脳幹の蝸牛神経核への投射を調べる目的に適した順行性および逆行性トレーサーの選定を行い、ラセン神経節変性モデル動物と正常動物との比較検討を行う。これらの手技が確立した段階で、神経前駆細胞を移植した蝸牛での移植細胞蝸牛神経核間での神経経路形成の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 神経トレーサーの選択

正常ハートレー系モルモットに順行性神経トレーサーとして、WGA-HRP および Biotinylated Dextran Amine (BDA) を蝸牛基底回転蝸牛軸に経鼓室階で注入し、3日後に蝸牛および脳幹組織採取し、凍結切片を作製し、それぞれのトレーサーの局在を検討し、以下の実験で用いるトレーサーの選択を行った。逆行性トレーサーとしては、Fast Blue (FB) もしくは Diamidino Yellow (DY) を用い、後頭開頭後、小脳部分切除を行い、脳幹へのトレーサー注入を行い、投与3日後の蝸牛組織解析を行い、トレーサー選択を行う。

(2) ラセン神経節変性モデルの確立

モルモット中耳にウバインを局所投与することにより、選択的にラセン神経節を変性させるモデルを作製した。ウバインの投与量、投与方法の条件を変え、局所投与7日後に、電気刺激調製脳幹反応計測を行い、組織学的に残存しているラセン神経節細胞数に関する解析を行い、本実験に用いる条件の決定を行った。

(3) ラセン神経節変性モデルトレーサー投与実験

上記(2)で開発したモデルを用い、順行性トレーサーの蝸牛投与後の蝸牛神経核における投射に関する組織学的解析を行い、正常動物との比較検討を行った。

(4) 機能再生と神経回路再生の関連性の検討

ラセン神経節変性モデル動物を用い、蝸牛基底回転鼓室階から蝸牛軸に神経前駆細胞を注入し、注入4週間後に電気刺激聴性脳幹反応計測を行い、細胞移植部位からトレーサーを注入し、脳幹の蝸牛神経核の組織学的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 神経トレーサーの選択

正常動物を用いた順行性トレーサー実験では、WGA-HRP および BDA について検討した。結果、双方ともに脳幹の蝸牛神経核で標識細胞が認められた。このため、下記の理由から以後の実験については、BDA を用いることとした。第一に、より鮮明に投射を組織学的に検出できる、すなわち、検出感度が高いという要因、第二に、再現性が高い、この2点の理由から BDA を用いることとした。また、BDA の投射は、蝸牛神経核と内有毛細胞の双方に認められた。すなわち、BDA は逆行性トレーサーとしても用いることが可能であることが示唆された。

逆行性トレーサー実験では、後頭開頭後、脳幹にトレーサーを注入する手技の確立を試みたが、安定したトレーサー投与を行うことが困難であり、蝸牛への投射を確認することはできなかった。

以上の結果から、順行性トレーサーを用いた解析を中心に行うこととした。

(2) ラセン神経節変性モデルの確立

Na-K-ATPase 阻害薬であるウバインを蝸牛に局所投与し、ラセン神経節変性モデルを作製した。投与量に関しては、1, 5, 10mM の3濃度を用い、投与方法として、正円窓膜上投与、正円窓内注入の2種類を用いた。中耳骨包を開放後、正円窓膜上にウバイン滴下、あるいは、正円窓からウバイン注入とした。結果、正円窓内に5mM, 5 μ l を微細ガラス管で注入する方法が最も理想的な障害を誘導することが分かった。投与7日後の電気刺激聴性脳幹反応測定では、ウバインを投与した20匹中10匹の電気刺激聴性脳幹反応閾値は600 μ A以上の閾値上昇が認められた。組織学的には、蝸牛基底回転ローゼンタール管内のラセン神経節細胞の高度変性が全例で確認された。以上の結果から、ウバイン5mM, 5 μ l を正円窓内に注入するモデルを以後の実験で用いることとした。

(3) ラセン神経節変性モデルトレーサー投与実験

ウバイン投与後高度の電気刺激閾値上昇(600 μ A以上)を認めた動物の蝸牛にBDA投

与を行い、脳幹の組織学的解析を行った。結果、正常動物に投与した場合と比較して、蝸牛神経核における著明な標識細胞の減少が認められた。したがって、ラセン神経節機能障害と順行性トレーサーによる蝸牛神経核における神経細胞標識は、ある程度相関すると考えられた。

(4) 機能再生と神経回路再生の関連性の検討

第一に、ウワバイ投与によるラセン神経節変性モデルへの細胞移植実験を行った。当初モルモット骨髄間葉系細胞由来神経前駆細胞を移植細胞として用いる予定であったが、分化誘導効率に問題が生じたため、安定した培養、分化誘導が可能であったヒトiPS細胞由来神経前駆細胞を移植細胞として用いた。細胞移植は、モルモット中耳骨包開放後、蝸牛基底回転鼓室階を開窓し、蝸牛軸に細胞を注入する方法を用いた。蝸牛開窓部および中耳開放部分は、筋肉弁を用いて閉鎖した。ウワバイ投与により電気刺激聴性脳幹反応が無反応となった動物のみ4匹を使用した。移植4週間後に再び中耳骨包を開放し、蝸牛閉鎖に用いた材料の摘除を行い、電気刺激聴性脳幹反応計測を行い、その後トレーサーを蝸牛軸内に注入し、さらに3日後に組織採取する方法を用いた。結果、電気刺激聴性脳幹反応では、明らかな閾値改善は認められなかったが、4匹中1匹で移植細胞の蝸牛内での生着が確認された。蝸牛基底回転には肉芽組織が生じ、蝸牛軸を同定することがきわめて困難であった。蝸牛軸と想定される部位にトレーサーの注入を行ったが、トレーサーによる蝸牛神経核の神経細胞の標識は認められず、蝸牛組織内にもトレーサーの標識を認めることができなかった。

この原因として、移植による機能改善が認められなかったためにトレーサーが投射されなかったという点が考えられるが、移植後の蝸牛では適切なトレーサー注入が施行できなかったためとも推察された。今後、蝸牛内の炎症の厳密な制御がトレーサー実験には求められることが示唆された。

(5) まとめ

本研究の成果から、順行性トレーサーとしてBDAが有用であることが示された。細胞移植による細胞体自体の再生だけではなく、神経線維の再生の評価などにBDAを用いることにより、機能的な再生の裏付けとなる組織学的解析が可能であることが示された。この結果は、今後のラセン神経節細胞、神経線維の再生実験に応用可能な成果といえる。一方、今回の実験では、細胞治療による機能再生の

裏付けを組織学的に得るという目的は達成されなかった。この点に関しては、今後再現性の高い、細胞移植による機能再生モデルの構築が不可欠であると考えられた。

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)

(1) Nishimura K, Nakagawa T, Sakamoto T, Ito J. Fates of murine pluripotent stem cell-derived neural progenitors following transplantation into mouse cochleae. *Cell Transplant* 21:763-771, 2012.

(2) Sekiya T, Viberg A, Kojima K, Sakamoto T, Nakagawa T, Ito J, Canlon B. Trauma specific insults to the cochlear nucleus in the rat. *J Neurosci Res* 90(10):1924-31, 2012.

(3) 中川隆之 内耳再生へのストラテジー 内耳障害の病態に応じた治療法の開発戦略 日薬理誌 141:1-4, 2013.

[学会発表] (計1件)

中川隆之 内耳再生医療開発と未来の難聴治療 第68回山形県耳鼻咽喉科疾患研究会 山形 2013年3月24日

[図書] (計2件)

(1) 坂本達則, 中川隆之, 伊藤壽一 第2章 徐放技術の医療応用 3. 再生治療 10) 聴神経 ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS) 田畑泰彦編 p183-186 メディカルドゥ (大阪) 2013.

(2) 中川隆之 内耳の幹細胞再生医療叢書 第4巻 上皮、感覚器 西田幸二、高橋雅代 編集 pp125-133, 朝倉書店、東京 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 壽一 (ITO JUICHI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90176339

(2) 研究分担者

中川 隆之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：50335270

田浦 晶子 (TAURA AKIKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：70515345

山本 典生 (YAMAMOTO NORIO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：70378644

坂本 達則 (SAKAMOTO TATSUNORI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：60425626

北尻 真一郎 (KITAJIRI SHIN-ICHIRO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：00532970