

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462560

研究課題名(和文) 神経幹細胞の全身投与による虚血性内耳障害抑制効果の研究

研究課題名(英文) Intravenous administration of neuronal stem cells alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia

研究代表者

白馬 伸洋 (Nobuhiro, Hakuba)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：70304623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000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、虚血性内耳障害に対する神経幹細胞の有効性について研究を進めてきた。今回の研究として、虚血後に下大静脈より神経幹細胞を投与した群では、有意に内毛細胞の脱落変性と聴力域値上昇が抑制されていた。さらに、神経幹細胞を全身投与した群では、内耳虚血障害後に生じる障害増悪因子であるNOxの発生も有意に抑制されていた。以上の結果より、虚血後の全身投与による神経幹細胞により虚血性内耳障害が抑制され、その機序として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ことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Intravenous administration of neuronal stem cells (NSCs) is regarded to be a potential approach for promoting repair of damaged organs. Here, we investigated the influence of intravenous administration of NSCs on progressive hair cell degeneration after transient cochlear ischemia in gerbils. Transient cochlear ischemia was produced by the extracranial occlusion of the bilateral vertebral arteries just before their entry into the transverse foramen of the cervical vertebra. Intravenous administration 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 the intravenous administration of NSCs 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

キーワード：内耳虚血 内毛細胞 神経幹細胞 再生治療 活性酸素 神経栄養因子

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の虚血後全身投与による虚血性細胞障害抑制効果とそ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

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、虚血後の神経幹細胞の全身投与により虚血性内耳障害の抑制効果とその機序を明らかにすれば、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日目までに内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、虚血後に下大静脈より神経幹細胞を全身投与した群では、有意に内有毛細胞の脱落変性と聴力域値上昇を抑制するかについて検討を行った。さらに、神経幹細胞の全身投与により、内耳虚血障害後に生じる障害増悪因子であるNOx発生の抑制効果についても検討を行った。

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、虚血24時間後のレシピエントサイトのスナネズミの下大静脈より全身投与を行う。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 NO_x 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_x 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 NO₂-、NO₃-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負荷後の NO_x の濃度上昇について虚血後に神経幹細胞を全身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全身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_x 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_x 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_x 濃度は、虚血後に神経幹細胞を全身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全身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_x 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 6 件) すべて査読有り

1. Hakuba N, Ikemune K, Okada M, Hato N. Use of ambulatory anesthesia with manually assisted ventilation for tympanic membrane regeneration therapy in children. *Am J Otolaryngol.* 36(2):153-7. 2015
2. Hakuba N, Hato N, Okada M, Mise K, Gyo K. Preoperative factors affecting tympanic membrane regeneration therapy using an atelocollagen and basic fibroblast growth factor. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 141(1):60-6. 2015.
3. Takagi T, Yoshida T, Okada M, Hata R, Hato N, Gyo K, Hakuba N. Intravenous administration of bone marrow mononuclear cells alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroreport.* 2014 May 16. [Epub ahead of print]
4. Takagi T, Gyo K, Hakuba N, Hyodo J, Hato N. / Clinical features, presenting symptoms, and surgical results of congenital cholesteatoma based on Potsic's staging system. *Acta Oto-Laryngol.* 134(5):462-7. 2014.
5. 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.
6. 白馬 伸洋 幹細胞を用いた聴覚感覚細胞の再生治療研究 帝京医学雑誌 38(4) : 99-108, 2015

[学会発表] (計 3 件)

1. Hakuba N. : The regeneration of tympanic membrane using basic fibroblast growth factor combined with an atelocollagen. CHOLE2016 (国際真珠腫学会 2016), 英国 (エジンバラ), 2016/6/5-8 (round table)

2. Hakuba N. : Tympanoplasty : Difficult case and complication. Politzer Society Meeting. 新潟、2015/7/1-3 (特別講演)

3. 白馬伸洋. 聴覚障害. 中級障がい者スポーツ指導員養成講習会, 愛媛, 2014/7/19 (特別講演)

〔図書〕(計 3 件)

1. 白馬伸洋. 耳小骨連鎖形成 型の工夫. イラスト手術手技のコツ 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 耳・鼻編, 東京医学書院 96-99, 2017.

2. 白馬伸洋 【こんなときの対応法がわかる 耳鼻咽喉科手術ガイド】 耳の手術 中耳根本手術(解説/特集)耳鼻咽喉科・頭頸部外科 中外医学社、87(5) : 31-35, 2015.

3. 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, 2014

〔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)

帝京大学附属溝口病院・医学部・教授

研究者番号 : 70304623

(2)研究分担者

岡田 昌浩 (Okada, Masahiro)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 20512130

(3)連携研究者

なし