

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861356

研究課題名(和文) Muse細胞を用いた内耳の再生

研究課題名(英文) cochlea regeneration by Muse cell

研究代表者

小泉 優 (KOIZUMI, Yutaka)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：80723585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではMuse細胞を用いた内耳有毛細胞の再生が目的である。Muse細胞はGFP導入hMSCよりFACSを用いて単離した。新生児マウスの蝸牛組織を摘出し、ゲンタマイシン 35 μMで48時間処理することで有毛細胞を傷害、その後Muse細胞との共培養を行った。Muse細胞は1-2週間程度の期間で神経マーカーTuj1に陽性となっていることが確認できた。一方、有毛細胞マーカーMyo7aは陽性とならなかった。近年、内耳障害における聴神経の易障害性が注目されている。今後は有毛細胞ではなく神経再生の可能性に関してさらに解析を進めることで、Muse細胞の内耳障害に対しての有用性が示される可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Regeneration of inner ear hair cells by Muse cells is the goal in this study.

Muse cells were isolated from GFP-transfected hMSC using FACS. The cochlear explant from the newborn mouse was dissected and the hair cells were injured by treatment with gentamicin 35 μM for 48 hours. Then co-culture of injured cochlea and Muse cells was performed. Muse cells were positive for the neural marker Tuj1 in a period of about 1-2 weeks. On the other hand, the hair cell marker Myo7a did not become positive. Easy failure of the auditory nerve in the inner ear disorders has been attracting attention in recent years. From the result of this study, more detailed analysis on the possibility of nerve regeneration rather than hair cells will demonstrate the effectiveness of Muse cells in inner ear disorders.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：再生医学 Muse細胞 内耳 蝸牛器官培養

## 1. 研究開始当初の背景

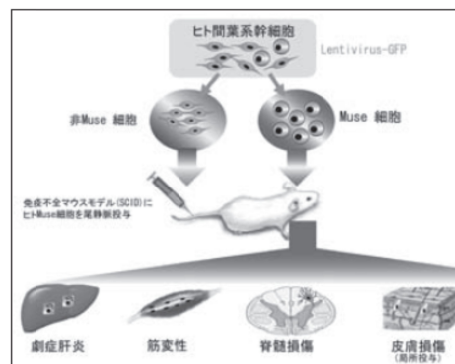
内耳障害の一つとして感音難聴がある。多くは不可逆的であり、現在のところ根本的な治療は確立されていない。主に補聴器や人工内耳で聴力を補償しているが、補聴器は高度難聴では調整が困難となることもある。一方、人工内耳は異物を体内に挿入するため、感染などの合併症や、機械が故障した際は再埋め込みが必要になるなどの問題点もある。双方ともデバイスの改良、発展に伴い小型化してきているが、装着しなければ使用できないという煩雑さもある。

聴覚経路は、外耳道、鼓膜、中耳伝音系、内耳の蝸牛、中枢神経系よりなる。蝸牛内には内有毛細胞、外有毛細胞が存在しており、聴覚障害のうち内耳障害に起因するものは、主に有毛細胞の障害が原因であると考えられている。このため、内耳障害の治療戦略としては、内・外有毛細胞の機能回復が目的となる。またその上位のラセン神経節細胞に障害がある場合は、ラセン神経節細胞を再生することで人工内耳の適応が拡大できる可能性もある。

有毛細胞の障害が初期の段階で、まだ障害が可逆的であると思われる場合は、臨床的にはステロイド投与による治療が行われることが多い。障害が不可逆的な段階になった場合は、前述のとおり補聴器や人工内耳が選択されている。基礎研究では、ノッチ情報伝達系の抑制による支持細胞から有毛細胞への分化転換の報告 (Izumikawa M, et al. Nat Med. 2005) や、ES 細胞、iPS 細胞からの神経細胞誘導、有毛細胞類似の細胞の誘導 (Oshima K, et al. Cell. 2010) などの報告がなされており、今後の発展が期待されている。しかしながら、ノッチ情報伝達系阻害薬は、細胞毒性の問題や、ヒトでも動物実験同様の効果が期待できるか不明な点がある。また、ES 細胞や iPS 細胞は腫瘍化のリスクが臨床応用への大きな障害となっている。

間葉系幹細胞 (MSC) は骨髄、脂肪など比較的手ししやすい組織から得ることができ、さまざまな疾患で移植治療に用いられている。近年、多能性を有するが腫瘍性を持たない、Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞と呼ばれる多能性幹細胞が MSC の中から発見された (Kuroda Y, et al. PNAS. 2010)。

動物実験では劇症肝炎、筋変性、脊髄損傷、皮膚損傷などのさまざまなモデルで移植実験が行われ、損傷部位に生着すること、組織に応じた細胞に分化することが確認されている (Kuroda Y, et al. Arch Immunol Ther Exp. 2011.)。さらに、MSC はすでにヒトに移植されており、腫瘍化のリスクが低いことが示されている。MSC に由来する Muse 細胞も同じく腫瘍化のリスクが低いと予想される。



間葉系幹細胞の組織修復寄与  
(出澤ら．脳神経外科速報．2012 より引用)  
障害モデルマウスにおいて、Muse 細胞は損傷部位に生着し、機能的な細胞に分化する。

## 2. 研究の目的

本研究では、Muse 細胞を用いて、有毛細胞障害モデル動物の有毛細胞を再生させることが目的である。内耳機能の再生は、聴覚障害に対する治療の中で現在最も注目されている分野の一つであるといっても過言ではない。Muse 細胞を用いた内耳再生は安全性も十分高いと予想され、動物実験で得られた知見をもとに、ヒトへの臨床応用できれば革新的な治療方法となることが期待される。

## 3. 研究の方法

長期的な研究デザインとして以下の計画を立てた。

ヒト MSC より Muse 細胞を単離し、*in vitro* 環境で有毛細胞への分化が可能かどうか、有毛細胞やラセン神経のマーカーの発現を解析する。

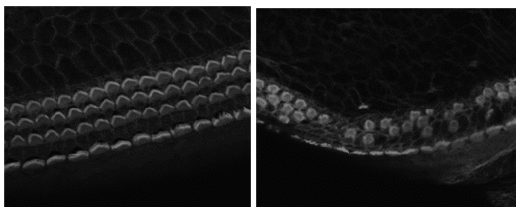
実験材料としてマウスを使用し、蝸牛内への細胞移植手術の方法を確立する。*in vivo* で Muse 細胞を聴覚障害モデル動物の蝸牛内へ移植し、有毛細胞やラセン神経のマーカーの発現を解析するとともに、ABR を用いて聴覚機能の解析を行う。

実際に本研究期間内で実行できたのはに関する検討であった。

移植された Muse 細胞は、自発的に障害部位に遊走し組織特異的細胞に分化する特性があると推測されている。*in vitro* 環境においても、Muse 細胞が分化するためには、障害されている組織の細胞が必要であると考え、蝸牛器官培養の系を用い、障害されたマウス蝸牛組織と Muse 細胞の共培養を行い、Muse 細胞の有毛細胞への分化能の有無について検討した。

実験材料として C57BL/6 マウスを用いた。蝸牛は生後 2 - 3 日の新生児マウスより、実

態顕微鏡下で採取した。障害モデル作製のため採取した蝸牛組織はゲンタマイシン 35  $\mu$ M で 48 時間処理した。これにより約半数の外有毛細胞が消失した (下図右)。

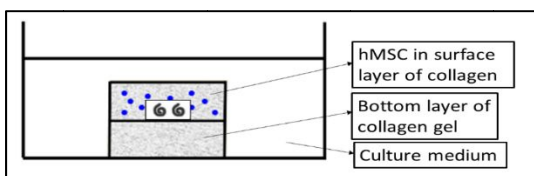


ヒト Muse 細胞は、リポフェクションにより GFP を導入した MSC から、FACS を用いて SSEA-3 陽性細胞として単離した。

障害されたマウス由来蝸牛組織と、GFP 標識されたヒト Muse 細胞を共培養した。

Muse 細胞が分化するためには、ある程度の時間が必要であると推測されたため、観察期間は共培養開始後、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間とした。

培養にはコラーゲンをういた 3 次元培養法を用いた。コラーゲンは新田ゼラチン株式会社の Cellmatrix Type I-A を使用した。まず、コラーゲンゲル 20  $\mu$ l で下層を作成。37  $^{\circ}$ C で加温しゲル化させた。その上に蝸牛組織を置き、さらにその上から Muse 細胞を含んだコラーゲンゲル 20  $\mu$ l を重層しゲル化させた。

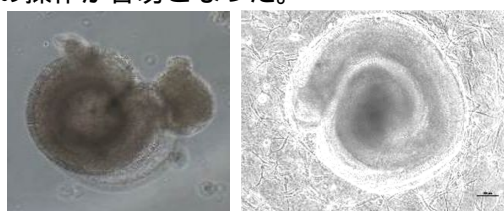


培養に用いた培養液の組成は以下の通りである。DMEM/F12、10 % FBS、25 mM HEPES、100 U/l penicillin G、N-2 Supplement、B-27 Supplement。培養液の交換は 2 - 3 日に 1 回のペースで行った。

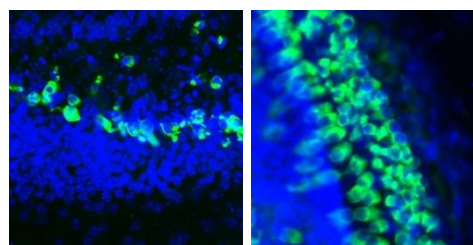
解析は主に免疫組織化学により行った。コラーゲンゲル内で共培養したサンプルを、ゲルのまま 4% PFA/PBS で 1 時間、室温で固定。PBS 洗浄後、0.3% triton X、0.8% ブロッキングエース、5% BSA/PBS で 2 時間、室温で透過処理およびブロッキングを行った。1 次抗体は 0.3% triton X、0.2% ブロッキングエース、1% BSA/PBS で希釈し、4 で一晩反応させた。有毛細胞マーカーとして Myo7a (1:1000, rabbit IgG)、ラセン神経マーカーとして Tuj1 (1:1000, mouse IgG) を使用した。PBS 洗浄し、2 次抗体を 0.2% triton X で希釈し、室温で 2 時間反応させた。2 次抗体として Alexa 568 anti-rabbit IgG、Alexa 680 anti-mouse IgG を使用した。その後 PBS 洗浄を多めに行った後に包埋した。蛍光観察による解析には共焦点レーザー顕微鏡 (A1: 株式会社ニコン) を使用した。

#### 4. 研究成果

当初は poly-HEMA コーティングによる浮遊培養で実験を行っていたが、薬剤処理をしていない蝸牛組織においても有毛細胞はほとんど消失してしまい、Muse 細胞も凝集してしまうという問題が生じた。このため、組織保護および 3 次元構造の保持の目的で、コラーゲンゲルに包埋した上で培養を行う方法を考案した。このシステムにより、長期間の組織培養による組織の劣化が抑えられ、Muse 細胞の凝集も見られなくなった。さらに、組織が固定されることにより培養液の交換や、その後の免疫染色などの操作が容易となった。



蝸牛組織と Muse 細胞の共培養  
右：浮遊培養では蝸牛の周囲で凝集した Muse 細胞を認めた。  
左：3 次元培養では凝集は認めなかった。



4 週間培養後の蝸牛組織 (非薬剤処理)  
左：浮遊培養 右：3 次元培養  
緑：有毛細胞、青：核染色

このシステムを用いてゲンタマイシン処理した蝸牛組織と Muse 細胞の共培養を行い、Muse 細胞の変化の有無について免疫組織化学で確認した。共培養 1 週間、2 週間のサンプルでは、一部の Muse 細胞で神経マーカーである Tuj1 の抗原抗体反応が陽性となっていることが確認できた。しかしながら、すべての期間において有毛細胞マーカーである Myo7a は陽性とならなかった。

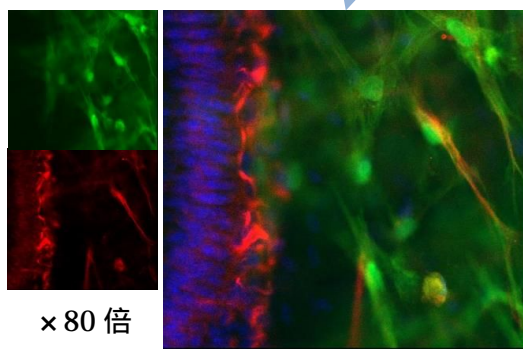
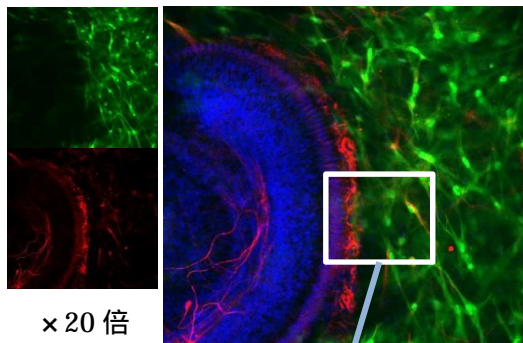
今回の培養条件において、Muse 細胞は薬剤などによる誘導がなくとも神経へ分化する可能性は示されたが、本研究の主目的であった有毛細胞への分化のためには、誘導因子の添加などさらなる培養条件の検討が必要と考えられた。

近年、内耳障害におけるラセン神経の易障害性が注目されている。今回の検討により、Muse 細胞は障害された蝸牛組織において、自発的 (薬剤による誘導などは必要とせず)



に神経へ分化する可能性が示された。今後の展望としては Muse 細胞による神経再生の可能性に関して、他の神経マーカーやシナプスマーカーなども用いてさらに解析を進めることで、Muse 細胞の内耳障害に対する有用性が示される可能性が考えられた。

DAPI / GFP / Tuj1



1 週間共培養後の蝸牛組織と Muse 細胞  
 緑：Muse 細胞、青：核染色、赤：Tuj1

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

小泉 優 (KOIZUMI Yutaka)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：80723585

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )