

20020669

別添2

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

虚血性細胞障害防御メカニズムに基づいた難聴の治療に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 暁 清文

平成15(2003)年 3月

目次

I. 総括研究報告

虚血性細胞障害防御メカニズムに基づいた難聴の治療に関する研究 ————— 1  
    暁 清文

II. 分担研究報告

虚血性難聴に対する神経幹細胞を用いた再生治療の基礎的研究 ————— 3  
    白馬伸洋

神経幹細胞の作成および虚血性難聴治療に関する研究 ————— 5  
    秦 龍二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 8

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 9

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
総括研究報告書

虚血性細胞障害防御メカニズムに基づいた難聴の治療に関する研究

主任研究者 暁 清文 愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室教授

研究要旨

高齢化社会を迎え感音性難聴に対する社会的関心が高まっているが、現存する治療手段には限界があり、難聴者の要望に十分に対応できているとは言い難い状況にある。感音性難聴の原因は遺伝子、ウイルス、代謝異常など様々であるが、我々は内耳虚血が難聴発症の最も重要な背景因子であると推察している。本研究は近年急速に進展した脳虚血に対する新しい知見をもとに、一過性内耳虚血の動物モデルを用いて虚血性内耳障害の病態を反映した新しい治療法を開発することを目的としている。本年度は、フリーラジカル捕捉剤であるエドラボンの虚血性内耳障害に対する効果を検討した。その結果、一過性内耳虚血後のエドラボン静脈内投与により、内耳虚血後の聴力域値上昇が抑制され、組織学的にもコルチ器における有毛細胞脱落数の減少が認められた。以上のことより、エドラボンは虚血性内耳障害の治療薬として有望であることが示された。

分担研究者氏名 白馬伸洋  
所属機関 愛媛大学医学部  
職名 助手

モデルを確立し、フリーラジカルスカベンジャーの一つであるエドラボンによる細胞死防御効果を検討することによって、虚血による内耳障害に対して最も効果的な治療法を探求することを目的とした。

分担研究者氏名 秦 龍二  
所属機関 愛媛大学医学部  
職名 助教授

B. 研究方法

A. 研究目的

突発性難聴は急激に発症して高度の感音性難聴をきたす原因不明の疾患であり、40～50歳代に好発し、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癒率は70%前後に過ぎず、治療に反応せず難聴が増悪する例もみられることから、これらの症例にも有効な新しい治療法の開発が求められている。本症の原因としては内耳虚血説が有力であることから、近年解明されつつある虚血性細胞死の防御メカニズムに基づいた治療法が有効と考えられる。本研究ではスナネズミを用いて一過性内耳虚血の動物

スナネズミは後交通動脈が先天的に欠損しているため、両側の椎骨動脈をクランプすることにより一過性内耳虚血を惹起することができる。今回の研究では、スナネズミに内耳虚血を負荷し、その1時間後にエドラボンを大腿静脈より投与して内耳障害を防御する効果があるか否かを検討した。実際には、スナネズミの両側椎骨動脈の血流を15分間遮断した後、再開通させ、その1時間後にエドラボンの大腿静脈内投与を行った。コントロール群には同様の手技で、生理食塩水（生食）を大腿静脈内に投与した。虚血後の聴力域値の変化はABRを測定することにより評価した。反応電位は信号

処理装置を用いて300回の加算平均を行い域値の変化を求めた。さらに組織学的変化を観察する目的で、虚血1、4、7日後に耳胞を取り出して前庭窓および蝸牛窓を開窓し4%パラホルムアルデヒドにて局所灌流固定を行った。標本はRhodamine-phalloidinおよびHoechst3342にて二重染色し、有毛細胞のF-actinと核を蛍光顕微鏡にて観察し、脱落した有毛細胞割合を算出した。

### C. 研究結果

虚血後に生食を投与した群では、1、4、8日後のABR域値は約20dB上昇したが、エドラボンを投与した群では有意なABRの域値上昇は認められなかった。組織学的にも生食投与群では内耳有毛細胞を中心にコルチ器の感覚細胞に変性・消失がみられたが、エドラボン投与群では脱落細胞数は極めて少なく障害防御効果が認められた。このように虚血後早期にエドラボンを投与すれば内耳障害は防御できることから、エドラボンは突発性難聴の有望な治療薬になりうることが示唆された。

### D. 考察

以上の結果より、虚血性内耳障害に対してエドラボンが保護効果を持つことが証明された。エドラボンは本邦において開発された脳梗塞治療薬であり、すでに医薬品としての承認をうけ臨床現場で使用されているが、虚血性内耳障害に対して有用性を証明した研究はない。実際に突発性難聴の治療薬として適応が拡大されれば、有効な治療法が現存しない突発性難聴に対し、新たな治療法が確立すると考えられる。今後はエドラボンの投与量や、虚血後投与までの経過時間などを詳細に検討することにより、虚血性内耳障害に対して最も効果的な投与方法を検討する予定である。

### E. 結論

今回の研究によりエドラボンを内耳虚血1時間後に静脈内投与したところ、有毛細胞の

脱落を抑制し難聴を防御する効果のあることが確認された。近年、脳血流障害による神経細胞障害にはフリーラジカルが増悪因子として関与することが明らかとなり、我々の一過性内耳虚血モデルにおいても、同様のメカニズムで内耳障害が起こると推察される。エドラボンはこのメカニズムを抑止することにより内耳障害を防御すると考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Maetani T, Hakuba N, Gyo K : Free radical scavenger prevents ototoxicity after transient ischemia of the cochlea in gerbils. Acta Otorhinolaryngol Belg 56:302,2002
- 2) Watanabe F, Hakuba N, Gyo K : Hypothermia prevents hearing loss and progressive hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils. Neuroscience 102(3):639-645,2001
- 3) Hyodo J, Hakuba N, Gyo K : The effect of hypothermia in the acute transient cochlear ischemia in gerbils. Neuro Report 12:1983-1987,2001

#### 2. 学会発表

- 1) Inner Ear Biology 2002
- 2) 第47回日本聴覚医学会

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

「突発性難聴におけるラジカットの効果」発明特許を取得。

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

虚血性難聴に対する神経幹細胞を用いた再生治療の基礎的研究

分担研究者 白馬伸洋 愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室助手

研究要旨

実験動物に一過性内耳虚血を負荷すると、内耳有毛細胞にアポトーシスが生じ最終的には変性・消失することが知られている。本研究では、脱落した有毛細胞を再生させる目的で、外リンパ腔に注入した神経幹細胞が有毛細胞に置き換わりうるか否かを検討した。妊娠17日目のスナネズミより胎児を摘出し、海馬および線条体の神経細胞を採取して培養・増殖させた。ついで15分間の内耳虚血負荷を行ったスナネズミの外リンパ腔に神経幹細胞を注入した。その結果、虚血1日後に神経幹細胞を注入すると、脱落した有毛細胞の部位に神経幹細胞が置き換わるように侵入することが確かめられた。この結果から、神経幹細胞による「細胞治療」は有毛細胞が脱落した虚血性難聴の治療に応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、感音性難聴に対する治療手段は限られており、突発性難聴やメニエール病などを除けば、その治療成績は極めて不良である。これはヒトの有毛細胞は一旦障害されて消失すると、鳥類のように自己再生しないからである。そこで本研究では、スナネズミに一過性内耳虚血を惹起し、内耳障害が確立された段階で外リンパ腔に神経幹細胞を注入し、これが内耳で生着して有毛細胞の代わりとなるか否かを検討した。

B. 研究方法

スナネズミ胎児よりの神経幹細胞の採取・培養は分担研究者の秦が行った。妊娠17日目のスナネズミより胎児を摘出し、脳組織より海馬および線条体の脳神経細胞を採取の上、3日間培養・増殖させた。成熟スナネズミに15分間の内耳虚血を負荷し、その翌日に培養した神経幹細胞を内径200 $\mu$ mのガラス管内に吸入し、正円窓経由で外リンパ腔に注入を行った。神経幹細胞の同定にはネスチン抗体を用い、DAB染色後、光学顕微鏡にて観察を

行った。

C. 研究結果

蝸牛内への神経幹細胞注入の4日後に標本を観察したところ、虚血により脱落した有毛細胞の空隙に、DAB染色にてネスチン陽性である幼弱な神経幹細胞が多数認められた。すなわち神経幹細胞が有毛細胞脱落部位に移行したことが確認された。

D. 考察

虚血により有毛細胞が脱落するとその部位に空隙ができるが、今回の研究により蝸牛に注入した神経幹細胞はこの空隙に移行することが確認された。ヒトの有毛細胞には自己再生能力はなく、一旦障害されるとアポトーシスが生じ消滅してしまう。神経幹細胞は自己複製能と多分化能を有することから、内耳において有毛細胞の再生を強力に促す効果があると考えられる。このような「細胞治療」は単に突発性難聴だけでなく、音響外傷性難聴や老人性難聴など内耳の感覚細胞変性を伴うさまざまな難聴に対しても有効な治療法とし

て期待できる。今後は内耳に生着した神経幹細胞が、有毛細胞としての機能を示すように分化するかという本質的な課題に取り組む予定である。本研究が結実すれば、あらゆる感音性難聴に対しても有望な治療法になりうるわけで、その社会的意義は極めて大きい。

#### E. 結論

蝸牛内に投与した神経幹細胞は脱落した有毛細胞の部位に移行した。今後、神経幹細胞の機能を長期にわたり観察するとともに、種々の神経栄養因子（GDNF、bFGF）を同時に投与し、神経幹細胞の生着や機能への影響を検討する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Taniguchi M, Hakuba N, Gyo K :  
Apoptotic hair cell death after transient cochlear ischemia.  
Neuroreport 20(13):2459-62,2002
- 2) Koga K, Hakuba N, Gyo K : Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti:an experimental study in gerbils.  
J Comp Neurol 456:105-111,2003
- 3) Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, Taniguchi M, Yang L, Tanaka J, Hata R, Gyo K :  
Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils.  
Gene Therapy 10:426-433,2003

##### 2. 学会発表

- 1) 第 24、25 回日本神経科学学会
- 2) 第 44 回日本神経化学学会
- 3) 第 11、12 回日本耳科学会
- 4) Inner Ear Biology 2002

#### 5) 第 47 回日本聴覚医学会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

神経幹細胞の作成および虚血性難聴治療に関する研究

分担研究者 秦 龍二 愛媛大学医学部生理学第一講座助教授

研究要旨

虚血性細胞障害による難聴の再生治療の可能性を検討するために、まずスナネズミの神経幹細胞の培養を行った。得られた細胞が神経幹細胞として機能しているかを免疫染色にて検討したところ、確かに多分化能を有しており、スナネズミの神経幹細胞であることが確認された。次いで、得られた神経幹細胞を内耳虚血負荷を加えたスナネズミ内耳に注入し、細胞が生着するかどうかを免疫染色法にて検討した。その結果、虚血を負荷した内耳の内毛細胞の幾つかは神経幹細胞のマーカであるネスチンが陽性となり、外部から投与した神経幹細胞が生着している可能性が示唆された。さらに虚血性難聴の治療薬として検討する予定の脳卒中治療薬 S2819 の HPLC 精製を行い 99.999% の高純度精製物を得ることが出来た。

A. 研究目的

前年度、我々は GDNF (Glialcelline-derived neurotrophic factor) を発現するアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療が虚血性難聴の治療として有用であることを報告した (発表論文 1)。今回、虚血性難聴の治療として再生治療が有効か否かの検討を開始した。すなわち虚血性細胞障害による難聴には内毛細胞の細胞死が関連することが示唆されており、細胞死に陥った内毛細胞の治療に神経幹細胞を用いた再生治療が有効か否かの予備実験を開始した。

- 1) 再生治療に用いる神経幹細胞の培養：神経幹細胞は線条体から採取する方法と海馬から採取する方法の両者を行い、免疫染色にてその多分化能を確認した。
- 2) 内耳虚血モデル動物への神経幹細胞の投与：虚血性内耳障害モデル動物の内耳に得られた神経幹細胞を直接投与し、神経幹細胞の生着の有無を検討した。
- 3) 脳卒中治療薬 S2819 の精製：虚血性難聴の治療薬として検討する予定の脳卒中治療薬 S2819 の精製を行った。

B. 研究方法

- 1) 再生治療に用いる神経幹細胞の培養：
  1. 材料としてスナネズミ胎児 (E17-E18) を用いる。
  2. 胎児を滅菌したキムタオル入りの 10cm ガラスシャーレにうつ伏せに置き、鼻先を上向きにして、頭を持ち上げる。
  3. 中脳・大脳を取り出し、medium (20ml) 入り 10cm dish (ガラス製) に入れる。
  4. 海馬と大脳皮質の連結部に切れ込みを入れ、海馬を分離する。
  5. 以下の組成の basic medium を作り、15ml tube に入れる。  
DMEM/F-12 (Gibco Cat#:11330-032)  
N2 supplement (x100)  
Antibiotics (x100)
  6. basic medium 中で海馬を分散する。
  7. bFGF (40  $\mu$ g/ml) を添加。(bFGF は primary culture の時 40  $\mu$ g/ml を入れ、それ以降は 20  $\mu$ g/ml を入れる。)
  8. CO<sub>2</sub> incubator で培養する。bFGF を隔日毎 (20  $\mu$ g/ml) に加える。
  9. 1 週間目に colony を形成しているもの

を選び出し、subculture する。

## 2) 内耳虚血モデル動物への神経幹細胞の投与:

成熟雄性スナネズミ (体重 60-80g) を対象に用いた。ハロセン麻酔下に両側椎骨動脈を、椎骨動脈が椎体の横突起から椎骨内に入り込む所で閉塞し 15 分間の虚血負荷を加えた後に、血流を再開した。その翌日、micro-infusion pump を用いて神経幹細胞 (1 万個) を 1 $\mu$ l/min で 5 分間かけて蝸牛内に注入した。注入後 3 日目に神経幹細胞の生着の有無を確認するため、蝸牛を取り出し、神経幹細胞のマーカーの 1 つと考えられている、ネスチンの発現の有無を免疫染色にて確認した。

## 3) 脳卒中治療薬 S2819 の精製:

韓国産 6 年根紅参を細切後、10 倍量の 70%メタノールで 80 $^{\circ}$ C、2 時間 2 回抽出し、減圧下で MeOH を留去後、凍結乾燥してエキス粉末を得る。このエキス粉末を水に溶解し、メタノールで活性化した ODS 樹脂に吸着させ、40%以下のメタノールで洗浄後、100%メタノールで溶出させることにより粗サポニン分画を得る。この粗サポニン分画を、オープンカラムによるシリカゲルカラムに展開溶媒としてクロロフォルム:メタノール:水=65:35:10 (上層) を用いることにより S2819 粗分画を得る。次に、この粗 S2819 分画を低圧分取用高速液体クロマトグラフ装置により、移動層を測定波長を 203nm として、C18 系樹脂を用いた逆相クロマトグラムを行い、より高純度の S2819 分画を得る。次に、この高純度の S2819 分画を高圧分取用高速液体クロマトグラフ装置により、測定波長を 203nm とし、NH<sub>2</sub> 系樹脂を用いて 82~85%アセトニトリルで精製を行い、さらに C18 系樹脂を用いて 60~70%メタノールで精製を行った。

## C. 研究結果

### 1) 再生治療に用いる神経幹細胞の多分化能の検討

培養した細胞が本当に神経幹細胞であるかどうかを調べるため bFGF を除いて神経幹細胞の分化を促進した。分化促進 3 日目での幹細胞の分化状態を免疫染色にて確認した。幹細胞の各コロニーはそれぞれ Tuj1 (Neuron, 緑)、GFAP (Astrocyte, 赤)、A2B5 (Oligodendrocyte, 青) 陽性細胞に分化を開始し、確かに神経幹細胞の培養に成功していることが明らかとなった。

### 2) 神経幹細胞の内耳虚血モデル動物への投与

抗ネスチン抗体を用いた免疫染色の結果、内有毛細胞層に特異的にネスチン陽性細胞が見い出され、虚血性細胞死に陥って脱落した内有毛細胞に置き換わって、神経幹細胞が入り込んでいると考えられた。

### 3) 脳卒中治療薬 S2819 の精製

HPLC による純度測定で我々の精製法により純度を 99.999% にまで上げることが可能となった。

## D. 考察

スナネズミの神経幹細胞の培養に成功し、これを用いた再生治療を行うことが可能となった。内耳虚血モデル動物への神経幹細胞の投与を行ったところ、神経幹細胞が虚血性細胞死に陥って脱落した内有毛細胞に置き換わった。まだ予備実験的な検討であるため、今後例数を重ねて検討しなければならないが、有望な結果と考えられ、更に電子顕微鏡での検討や電気生理的な検討を含めて進めて行く予定である。また虚血性難聴の治療薬としてその効果を検討する予定の脳卒中治療薬 S2819 の精製を行い、従来法より遙かに高純度の精製物を得ることができた。

## E. 結論

以上のように、神経幹細胞の作成、脳卒中



治療薬 S2819 の精製を精力的に進め着実な成果を上げている。更に神経幹細胞を用いて虚血性難聴の再生治療を目指した予備的な実験を行い、有望な結果を得ている。今後さらに検討を進め虚血性難聴の治療法確立をめざす。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, Taniguchi M, Yang L, Tanaka J, Hata R, Gyo K : Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther.* 10:426-433,2003
- 2) Masumura M, Hata R : Recent advances in adenovirus-mediated gene therapy for cerebral ischemia. *Current Gene Therapy* 3:43-48,2003

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taniguchi M, Hakuba N, Gyo K	Apoptotic hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils.	NeuroReport	13:18	2459-2462	2002
Koga K, Hakuba N, Gyo K	Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti : An experimental study in gerbils.	The Journal of Comparative Neurology	456	105-111	2003
Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, Taniguchi M, Yang L, Tanaka J, Hata R, Gyo K	Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils.	Gene Therapy	10	426-433	2003
白馬伸洋, 曉 清文	虚血性内耳障害に対す る遺伝子治療	Otol Jpa	12:3	155-159	2002
Masumura M, Hata R	Recent advances in adenovirus-mediated gene therapy for cerebral ischemia	Current Gene Therapy	3	43-48	2003

20020669

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P 8の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。