

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

特異的遺伝性難聴の病態解明と直接治療法開発に 関する研究

課題番号 H12-感覚器-006

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15（2003）年 3月

主任研究者 稲垣真澄

目 次

| | |
|---|----|
| I. 総合研究報告 | |
| 特異的遺伝性難聴の病態解明と直接治療法開発に関する研究----- | 1 |
| 稲垣真澄 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 遺伝性難聴 bv の進行性聴覚障害に対する神経幹細胞移植の効果----- | 7 |
| 稲垣真澄 | |
| 2. 遺伝性難聴 bv にみられる回転性行動異常の病態解明と治療に関する研究----- | 33 |
| 稲垣真澄 | |
| 3. 遺伝性難聴 bv の原因遺伝子クローニング----- | 45 |
| 難波栄二 | |
| 4. ムコ多糖症VII型聴覚病変に対する遺伝子治療----- | 57 |
| 奥山虎之 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- | 69 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | |

I. 総括研究報告

特異的遺伝性難聴の病態解明と直接治療法開発に関する研究

主任研究者

稲垣真澄

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

特異的遺伝性難聴の病態解明と直接治療法開発に関する研究

主任研究者 稲垣真澄
国立精神・神経センター 精神保健研究所
知的障害部 診断研究室長

研究要旨

選択的内有毛細胞障害を生じる遺伝性難聴モデルマウス Bronx waltzer mouse (bv)の診断法の確立と早期治療を開発する目的で研究を行った。すなわち、主任研究者は遺伝的に診断したホモ接合体に対してマウス胎仔線条体由来の神経幹細胞を新生仔早期に脳室内投与し、生後に進行する聴力障害に対する効果を検討した。bv 治療群 18 例 (36 耳)のうち ABR の 5 指標 (II 波潜時, 振幅, IV 波潜時, 振幅そして閾値) 全てに改善のみられた例は無かったが, 6 例 (6 耳) に 4 指標の軽快所見がみられた。対照マウスでも II 波と IV 波振幅が増大する傾向があった。

一方, DPOAE 閾値と最大 DP 値は細胞治療により変化しなかった。bv マウス脳内に GFP 蛋白が生後 3 カ月間存在すること及びラセン神経節内の緑色蛍光が陽性であった点から神経幹細胞の生着がみられること及び脳室内投与によっても聴覚系機能, とくに求心系伝達機能が補完される可能性が示された。

また, 主任研究者は回転性行動異常を示す bv マウスの中樞神経病態と治療についても研究を進めた。bv マウス脳内モノアミン値は回転群, 非回転群とも中脳ドパミン (DA) 値低下があるものの線条体では対照群と有意差がなく, DA 代謝率は線条体, 中脳ともに亢進する傾向があり, 回転群線条体では DOPAC/DA 比が高く, HVA/DA 比が低かった。線条体 DA 受容体結合能は D1 系の有意な機能低下が認められた。また, DA 受容体の直接的・間接的作動薬が bv の回転や多動行動を抑制する「逆説的效果」が観察された。以上より, 本マウスの行動障害には DA 伝達の障害が基盤にあると考えられた。

分担研究者の難波栄二は bv マウスの行動異常に関する分子病態を明らかにするため DA 関連遺伝子, MAO 関連遺伝子の線条体や中脳における発現をリアルタイム PCR によって検討した。行動異常マウスでは線条体 Snap25 遺伝子発現が 0.73 倍に, また中脳 dopamine-1A receptor の発現が 0.54 倍に減少していることを見出した。また, 近傍のマーカー遺伝子 (D5Mit209) を用いて遺伝子診断を行うことが可能になった。D5Mit209 は原因遺伝子から 0.39cM の距離と考えられるマーカーで, 異常のないアレルは 325bp の長さの PCR 産物を検出した。一方, bv 異常のアレルでは 34bp 長い, 359bp の長さのアレルであった。

分担研究者の奥山虎之は代謝異常に基づく難聴に対する遺伝子治療の可能性を明らかにするため, 成熟ホモ接合体 MPSVII マウスの鼓室内に GUSB 発現アデノウイルスベクターを投与し, ABR を経時的に測定することによって聴力の推移を観察した。6 例中 2 例で投与後 2 週目に 20-30dB の聴力閾値の改善を認めた。鼓室内遺伝子投与では伝音性障害に対する効果が主にもたらされると考えられた。今後も難聴の直接治療研究を進める必要があると思われる。

分担研究者 難波栄二 鳥取大学
遺伝子実験施設 助教授
分担研究者 奥山虎之 国立成育医
療センター 特殊診療部遺伝診療科
医長

A. 研究目的

先天性の感覚器障害の中で聴覚器障害は生後の言語獲得に重大な問題を生じてくることはよく知られている。言語獲得の障害は著しいコミュニケーション障害を引き起こし、個人的にも社会的にも多大な時間的損失、経済的損失をもたらす。そのため厚生行政上、新生児期からの聴覚スクリーニングが重要であり、かつ早期からの言語訓練法開発が必要である。従って厚生労働省によって新しくスタートしている「ALGO システム」による新生児聴力スクリーニングには大きな期待がかかっている。一方、早期に的確な診断が下され、その段階で根本的な治療法が開発されているならば従来のスクリーニングとリハビリテーション・システムよりも大きなコストダウンが見こめる事も充分予想される。

本研究では先天性難聴の純型モデルとして bv マウスをその実験系を組むことで早期診断法を確立し速やかな直接治療法を開発し、さらにヒト新生児での応用をはかり、ヒト難聴病態の診断・治療の新しいシステムを構築することを目的とするものである。今年度は最終年度であり、直接治療的アプローチを検証した。

すなわち方法論的に確立した聴性脳幹反応 (ABR) と耳音響放射 (OAE) 検査所見を指標として、bv マウス早期治療例の経時的聴力を測定した。また、代謝性

疾患による混合性難聴に対して鼓室内遺伝子治療も試みた。さらに回転性行動異常を示す bv マウスの病態把握のため中脳線条体系のモノアミン系遺伝子発現とドパミン (DA) 受容体の直接的・間接的作動薬による行動障害治療を行った。

B. 研究方法

bv マウスの難聴病態を OAE と ABR によって明らかにし、治療的アプローチとして、B6 マウス胎仔線条体由来の神経幹細胞を bv の新生仔早期に脳室内投与し、生後に進行する聴力障害に対する効果を検討した。また、 β -グルクロニダーゼ (GUSB) の先天性な欠損を示すムコ多糖体症 VII 型モデルマウスに対して、経鼓膜的に GUSB 発現組換えアデノウイルスベクター (AxCAhGUS) 3×10^7 pfu を投与した。

行動異常のあるマウスとないコントロールのマウスの線条体、中脳を用いて Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, catechol-O-methyltransferase, dopamine-1A receptor, dopamine receptor D2, Snap25, tyrosine hydroxylase, dopamine transporter, monoamine oxidase-A (MAOA), B (MAOB) の各々について遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で定量した。また、マウスの染色体 5 番上のマーカーである D5Mit209 と D5Mit25, さらに D5Mit187 の解析を行った。

(倫理面への配慮: 対象マウスは処置や処分の配慮を注意深く行い、麻酔処置により疼痛を緩和し、苦痛を与えない

方法によって臓器を摘出した。)

C. 研究結果

1. bv マウスの幹細胞移植治療

1ヵ月時の bv における幹細胞移植治療の効果を比較したところ、ABR-IV 波閾値では治療群 (71.1 ± 12.2 dB SPL) が未治療群 (97.5 ± 16.3 dB SPL) に比べ有意に閾値が低下している結果が得られた。ABR-IV 波閾値が生後 3 ヶ月にわたり、15-20 dB SPL 以上改善が認められる軽快群は 6 耳 (16.7%) あった。また II, IV 波でそれぞれ 36 耳中 8 耳と 13 耳に潜時改善が認められた。bv の治療群と未治療群の間で、IV 波振幅に有意差 ($1.99 \pm 1.04 \mu\text{V}$, $0.98 \pm 0.60 \mu\text{V}$; $p < 0.001$) が認められ、対照においても同様であった (3.62 ± 2.29 , $1.50 \pm 0.79 \mu\text{V}$; $p < 0.001$)。

bv 治療群において以上の 5 パラメーター、すなわちクリック音での ABR II 波潜時、振幅、IV 波潜時、振幅そして閾値の全てが軽快した例は無かった。しかし、4 つ以上のパラメーターの軽快は 18 例中 6 例 (6 耳) あり、6 耳中 5 耳が右側に効果が目立った。この 6 例の反対耳の ABR は軽快ないし不変を示した。一方、4 パラメーター以上の悪化は上記と別の 3 例 (5 耳) にみられた。この 3 例中 2 例は両耳とも悪化所見を示した。このように、同一個体で相反する効果がみられる場合はなく、神経幹細胞投与により ABR 上は両耳とも同様の効果が得られた。

1ヵ月齢における bv 治療群、未治療群ともに DP 値 (各々 0.2 ± 5.5 dB SPL, 3.0 ± 6.9 dB SPL) は対照 (治療群; 21.8 ± 3.9 dB SPL, 未治療群;

20.4 ± 8.6 dB SPL) に比べて有意に ($p < 0.001$) 低かった。bv および対照群ともに治療による差は認められなかった。

GFP-TG マウス由来の神経幹細胞を投与した場合生後 3 ヶ月においても頭頂葉皮質と中脳に比較的多く存在していた。また、生後 1 ヶ月時点での蝸牛内ラセン神経節の組織学的検討では対照と比べてニューロン数がやや減っているものの自家蛍光が得られる細胞が存在した。

2. ムコ多糖症 VII 型マウスの鼓室内遺伝子治療

治療を行った 6 例の治療前の聴力評価では 2 例が両側 15 kHz および 8 kHz 音に対して 80-90 dB 程度の閾値であったのに対し、他の 4 例においては一部 90 dB の音圧を与えても ABR 波形が認められないほどの聴力閾値であった。6 例中 2 例の治療耳は AxCAhGUS 投与後 2 週目の段階で対照耳に比較して 20-30 dB の聴力閾値改善を認めた。治療効果は 1 週目より徐々に出現し、2 週目で最大となった。しかしその効果は持続せず徐々に悪化し、治療後 5 週目に聴力閾値はほぼ元に戻った。

病理学的検討により、治療側の中耳は非治療側と比べて壁不整が少なく、細胞脱落が目立たなかった。また、中耳腔内の分泌物も治療側の方が少なかった。

3. 行動異常の分子病態の解析

Aromatic L amino acid 遺伝子, MAOA 遺伝子, MAOB 遺伝子の解析

では融解曲線が2峰性となり、特異的な産物の定量が行えなかった。行動異常(hyper)マウスと行動異常のないマウス(normal)の遺伝子発現量を比較した結果、前者では線条体においてSnap25の発現が0.73倍に減少していた。また中脳においては、行動異常マウスにおいてdopamine 1A receptorの発現が0.54倍に減少していた。

4. bvの遺伝子診断

D5Mit209の解析では2種類のサイズの産物を確認した。これらの産物のシーケンスを確認してみると繰り返し配列の長さに違いがあり、325bpと359bpであることが確認できた。このサイズと難聴の有無を検討してみると、難聴のマウス(bv/bv)では359bpのサイズのアレルのみを持つことが明らかになった。

5. 回転性行動異常マウスの中脳神経系病態及び治療

線条体DA値はbv回転群も非回転群も対照と比べて有意な上昇・低下はなかった。DA代謝に関しては対照群と比較するとDOPAC/DA比が高いこと、逆にHVA/DA比が低下している所見を示した。全体としての代謝率(HVA+DOPAC/DA)は上昇していた。一方、中脳DA値はbvマウスでは回転、非回転ともに低下しており、代謝率に関しては線条体と同様の結果を示した。

線条体のDA受容体機能をトリチウムでラベルされたリガンドを用いて、解離定数と最大結合能を計測したところ回転群では明らかにD1受容体機能低下があり、

受容体数は増加していた。D2受容体機能・受容体数についてはD1と同様の傾向がみられたが、統計学的な有意差はみられなかった。

D2受容体作動薬であるApomorphineとQuinpiroleをそれぞれ少量ずつ回転群と対照群に投与した結果、回転群ではいずれの薬物も回転に対して著明な抑制があり、行動量低下がみられた。さらに中枢神経刺激薬であるMethamphetamineとdopamine transporter inhibitor(GBR-12909)を投与したときの行動変化については、回転群でおよそ二分の一に行動量が減り、前者では3時間程度抑制効果が持続した。一方、対照群やbv非回転群では行動量が一過性に増大し、回転群と非回転群では全く逆の反応を示した。とくに非回転群はMethamphetamine投与により著しい行動増加を示した。また、Methylphenidateに対する反応性に関しては一貫した抑制とはいえなかった。しかし、対照群や非回転群ではMethylphenidate投与後約1時間続く行動量上昇がすべてのマウスに共通してみられた。

D. 考察

遺伝性難聴マウスには多くの病型が知られているが、純粋に聴覚求心系に限局したものは少ない。内耳蝸牛の内毛細胞に病変が局在するBronx waltzer(bv)マウスは遺伝性難聴の病態解明研究に適切なモデルと思われる。しかしながら、bvは内耳感覚細胞に加え、ラセン神経節ニューロンの変性や消失も進行

性に同時に生じているため、治療的アプローチとしては両者に対し効果を期待できる方法がより望ましいとも考えられる。今回の研究では、蝸牛の内耳細胞変性が生じている時期、すなわち生後 1 週間以内という早期の治療を試みた。

その結果、神経幹細胞移植により ABRIV 波の有意な閾値改善が認められた。II 波潜時や振幅についても同様に改善を認めた。対照に関しても、閾値や振幅で同様の改善効果が認められた。一方、DPOAE に関しては、bv 群、対照群ともに神経幹細胞移植による閾値や最大 DP 値の変化は認められず、効果はない～乏しいものと思われた。OAE は内耳特に外有毛細胞の機能を他覚的に反映するものである。これらの結果より、神経幹細胞の bv 脳室内移植による効果は主に内耳の求心系機能に対するものであり、外有毛細胞機能障害や伝音性難聴に対する治療効果は認められないと考えられた。

また、ムコ多糖症 VII 型モデルマウスの鼓室内に GUSB 発現組換えアデノウイルスベクターを投与したところ、6 例中 2 例に聴力の一時的改善が認められた。この機序としては、中耳腔粘膜に GUSB が発現しある程度の治療効果が引き起こされたことが推測される。特に、ABR で I 波潜時の短縮を認めたことは中耳における伝音性障害が改善されたことを示唆する。また中耳壁の不整も非治療側に目立った。一方、鼓膜を穿刺したことにより中耳滲出液が減少し、聴力が改善しただけなのかもしれない。この場合は治療後 1 週目に最も聴力が改善すると

推測される。ところが今回の結果では、治療後 2 週目に ABR 上最大の聴力改善を認め、さらにその効果は 4 週目まで持続した。よって、これらの所見は単なる穿刺効果である可能性は低い。

鼓室内遺伝子投与は手技的に容易で侵襲が少なく、この点では臨床的にヒトへの応用は十分可能である。今後、本治療法による聴力改善効果の作用機序を検討し、さらにより有効性の高い遺伝子治療を探索していく必要がある。

一方、bv の中には行動異常を呈する群と呈さない群が存在する。その行動異常は極めて迅速な回転行動で、それらのマウスで dopamine 1A receptor 遺伝子発現に異常がある可能性が示された。また、神経細胞のシナプ스에서重要な役割を果たしていると考えられている Snap25 遺伝子発現も若干の差があり、注目される。機能的にも線条体 D1 受容体は低下しており、今後、さらに詳細なドパミン代謝遺伝子の解析を進め、セロトニン関連遺伝子などの解析も行う必要があると思われる。

また、DA 作動薬に対する反応性は行動量低下が回転群と対照群ともにみられた点から、節前に存在する DA 自己受容体機能に差はないものと思われた。しかしながら、Apomorphine 投与後の線条体 DA 値変化が対照群と異なり回転群では増加するパターンを示した。このことから bv での行動抑制の機序は対照マウスと異なっており、DA の増加反応が回転行動減少と関わっていることが示唆された。一方、回転群 bv の線条体は DA 系受容体とくに D1 受容体機能が低下し、受容

体数が増えていることが示された。そして、直接的な DA 作動薬に加えて Methamphetamine などの間接的 DA 作動薬も回転行動抑制に有効であった。

以上より、bv マウス回転群においては線条体レベルでの DA 放出障害と post synaptic の受容体とくに D1 系受容体の機能障害が同時に生じており、DA 伝達の障害が基盤にあると考えられた。そして、DA 系の賦活が多動の改善にとって基本的に重要であったと思われる。これらの事実は本マウスがヒトの多動病態の一部を反映していることを示していると考えられる。もっとも小児 AD/HD の臨床場面で比較的使用される Methylphenidate への反応性が乏しかった点は AD/HD との類似性を示す反面、「多動」の病態の異なった側面を示唆しているのかもしれない。

E. 結論

特異的遺伝性難聴マウス bv の診断には OAE と ABR が有用であることが判明した。そして、神経幹細胞治療や鼓室内遺伝子治療の効果判定にそれらの生理学的指標を活用できると思われた。bv の回転行動には脳内ドパミン系障害が関わる可能性が生化学的・分子生物学的に示され、ヒト多動性行動異常との類似性が示された。難聴病態とともに中枢神経系遺伝子発現を含めて多面的なアプローチによる病態解明そして治療法開発を今後一層進めていく必要があると思われる。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表 学会発表

1. 稲垣真澄, 昆かおり, 白根聖子, 加我牧子, 伊藤雅之: 常染色体劣性遺伝性難聴マウス bronx waltzer(bv) にみられる hyperactivity disorder 第 44 回日本小児神経学会総会 平成 14 年 6 月 27-29 日 仙台
2. 小林奈麻子, 稲垣真澄, 船田正彦, 太田玲子, 大杉圭子: bronx waltzer mouse の多動性行動異常の病態: 行動的・生化学的検討 第 32 回日本神経精神薬理学会 平成 14 年 10 月 17-18 日 前橋

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Ⅱ. 分担研究報告

1. 遺伝性難聴 bv の進行性聴覚障害に対する神経幹細胞移植の 効果

稲垣真澄

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

遺伝性難聴マウス bv の進行性聴覚障害に対する神経幹細胞移植の効果：
生理学的及び生化学的検討

分担研究者 稲垣真澄
国立精神・神経センター 精神保健研究所
知的障害部 診断研究室長

研究要旨

マウス胎仔線条体由来の神経幹細胞を常染色体劣性遺伝性難聴 bv に脳室内投与し、生後に進行する聴力障害を阻止する可能性について生理学的及び生化学的に検討した。聴性脳幹反応 (ABR) の II 波潜時、振幅、IV 波潜時、振幅そして閾値ならびに歪成分耳音響放射 (DPOAE) 閾値、最大 DP 値を各々経時的に測定したところ bv 治療群 18 例 (36 耳) のうち ABR の 5 指標全てに改善がみられた耳は無かったが、6 例 (6 耳) に 4 指標の軽快所見がみられた。対照マウスでも II 波と IV 波振幅が増大する傾向があった。一方、DPOAE 閾値と最大 DP 値は細胞治療により変化しなかった。GFP トランスジェニックマウス由来の神経幹細胞投与を受けた bv マウス脳内に GFP 蛋白が生後 3 ヶ月間存在すること及びラセン神経節内の緑色蛍光が陽性であった点から脳室内投与により生後しばらくの間は同細胞の生着がみられることと聴覚系機能、とくに求心系伝達機能を補完する可能性が示された。遺伝性の進行性聴力障害の治療に向けて今後は、bv 内耳蝸牛における外来性神経幹細胞の分化を促進するあるいは内在性幹細胞誘導をもたらす効率の良い手段をさらに確立していく必要があると思われる。

A. 研究目的

Bronx waltzer mouse (bv) は遺伝性難聴マウスであり、原因遺伝子はマウス 5 番染色体に存在しているが未だクローニングされていない。bv 難聴の特徴は内耳蝸牛のコルチ器に存在する聴感覚および平衡感覚の受容器細胞である有毛細胞、特に蝸牛の内毛細胞が生後早期に変性、消失することであり、ヒト先天性難聴の純系モデルと考えられる。これらの内毛細胞は生後 3 日間に約 40% が変性脱落し、約 20% は未熟な形態を示しており、ほとんどシナプス形成がなされないとされる。一方、外毛細胞につい

ては生後 1~2 ヶ月時点ではほぼ正常形態であるが、8 ヶ月齢では形態異常を示すとされる。これまでの我々の検討により、新生児早期では正常のラセン神経節ニューロン密度は生後 6 日間に明らかに減少し、4 ヶ月齢ではほとんど残らないという進行性変化が明らかになっている。従って、治療的観点からは bv の内毛細胞及びラセン神経節ニューロンの変性や消失の抑制、あるいはこれらの細胞の機能を補完することが難聴の改善につながる可能性があると考えられる。

一方、神経幹細胞 (neural stem cell) は「自己複製能」すなわち増殖して別の

神経幹細胞を新たに作り出す能力と「多分化能」すなわち神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを産み出す能力を兼ね備えた未分化な細胞であることが知られる。従来、損傷を受けた中枢神経系においてはニューロンが新生されないため、機能再生は不可能とされてきた。これは成体ニューロン自体に分裂能がなく、ニューロンを新生する幹細胞あるいは前駆細胞が存在しないと考えられていたためである。しかしながら近年、ヒトを含む哺乳動物の成体の脳内にも神経幹細胞が存在することが報告されており、分離技術も開発されている。このため、中枢神経系といった本来再生能力の低い器官においても、分離した幹細胞を用いて組織学的に再生しようとする研究が著しく進歩している。

そこで本研究では、比較的入手が容易であり分離同定法の確立されたマウス胎仔線条体由来の神経幹細胞を用いてbvにみられる聴力障害を阻止しうるか否かを生理学的に明らかにし、各パラメーターの特徴的変化がいかなるものかを明らかにするため研究を行った。さらに、移植後の神経幹細胞の所在を同定するため、全ての細胞にGFPを発現するトランスジェニックマウス(GFP-TG)由来の神経幹細胞投与による脳及び蝸牛内局在を検討した。

B. 研究方法

1. 使用動物

Bronx waltzer mouse (bv) は我々の研究部にて繁殖させたものを実験に使用した。また対照群は埼玉実験動物供給所より ddY 母仔を購入した。各マウスの遺伝的診断は、bv マーカー遺伝子領

域でのPCRにて確認した。各マウスは室温 23°C の 12 時間サイクルの明暗条件(明:8:00-20:00 暗:20:00-8:00)で飼育し、餌と水は自由摂取とした。

bv 治療群(18 例, 36 耳)は投与後 1, 2, 3 ヶ月時点において以下の生理学的検査を行い、経時変化について検討した。また、bv 未治療群(20 例, 28 耳)および対照各群(各々 5 例, 9 耳; 6 例 8 耳)との比較は 1 ヶ月時点での各パラメーターの結果を対比した。

2. 神経幹細胞移植法

神経幹細胞の分離は、受精後 14 日目の B6 マウス胎児の線条体を摘出後、成長因子(EGF・bFGF)を加えた無血清培地で培養し、浮遊細胞塊となった神経幹細胞のみを選択的に *in vitro* で増殖させる Neurosphere 法(Reynolds BA et al. J. Neuroscience 1992; 12: 4565-74.)を用いた。これらの幹細胞を遠沈して回収し、10-15 μ l の培養液に再び浮遊させた状態でガラスピペットにより経頭蓋的に各マウス脳室内へ投与した。治療はいずれも生後 3~4 日に行った。

3. ABR(聴性脳幹反応)測定

1) クリック音での片側刺激による ABR(聴性脳幹反応)

ABR(聴性脳幹反応)の測定には、MEB-9104(日本光電)を用いた。ペントバルビタール 5mg / kg body wt. の腹腔内投与による麻酔後、体動抑制が確認された状態でクリック音にて片耳刺激を行い、反対耳には -30dB のマスキングを行った。前頭部に接地電極を置き、頭頂部、耳朶後方にそれぞれ陽性電極、陰性電極を置いて、いずれの針電極も皮下に固定した。検査は 135dB SPL より開始し、加算回数 500 回で各波の再現

性を確認した。なお、音圧をステップダウンしIV波閾値も求めた。また、I, II, IV波頂点を視察的に同定し、頂点潜時(msec)および peak to peak 法での振幅(μV)を求めた。

2) トーンバースト音での両側刺激による ABR(聴性脳幹反応)

呈示音は刺激装置 Sound Stimulator DPS-525 (DIA MEDICAL SYSTEM Co.)による Tone Burst(TB)音をマウスの耳前 20cm に置いたスピーカ(スーパートゥーター; PT-R9 パイオニア)より出力し両耳刺激とした。刺激音は plateau 時間 1ms, Rise/Fall 時間 1ms からなり、刺激間隔 200ms にて与えた。周波数は 8, 16, 24, 32kHz の 4 種類を各々 100dB SPL からIV波閾値に達するまで順次音圧を低下して行った。記録電極や加算条件はクリック音と同じ方法にて計測した。

4. DPOAE(歪成分耳音響放射)測定

DPOAE(歪成分耳音響放射)の測定には ILO92 (Otodynamics Co. Ltd. 英国)を用いた。ペントバルビタール 5mg / kg body wt の腹腔内投与による麻酔後、体動抑制が確認された状態で検査した。刺激兼検出プローブをマウス外耳孔に挿入し、 f_2 周波数=8000Hz, f_2/f_1 周波数比=1.2 の条件で DP growth 法を行った。音圧を 80 から 45dB SPL へステップダウンさせてノイズ以上の DP 値が得られる刺激音圧すなわち閾値と最高 DP 値を求めた。

5. 神経幹細胞の局在の検討

GFPトランスジェニックとなった B6 マウス胎仔由来の神経幹細胞を投与された治療群については生後 1, 2, 3 ヶ月時点

で経心臓的に灌流を行い、脳内 GFP 蛋白のウェスタンブロットおよび蝸牛における蛍光の有無を検討した。

6. 統計学的検討

統計学的検討には Stat View for Windows ver 4.5(ヒューリンクス)を用い、特に記載のある場合を除いてすべて ANOVA にて有意差検定を行った。

7. 倫理面への配慮

対象マウスの処置や処分の配慮を注意深く行い、麻酔処置により疼痛を緩和し苦痛を与えない方法をもって検査を行い、組織を摘出した。

C. 研究結果

1. クリック音刺激による ABR(聴性脳幹反応)各パラメーター変化

1) IV波閾値

1ヵ月時の bv における幹細胞移植治療の効果を比較したところ、ABR-IV波閾値では治療群($71.1 \pm 12.2 \text{ dB SPL}$)が未治療群($97.5 \pm 16.3 \text{ dB SPL}$)に比べ有意に閾値が低下している結果が得られた(図 1)。また、bv 未治療群では ABR が検出できない、すなわち超高度難聴である例が全体の 10.3 %に存在していたが、治療群では非検出例は 1 例も認められなかった。一方、対照治療群($45.2 \pm 5.5 \text{ dB SPL}$)と未治療群($58.8 \pm 14.6 \text{ dB SPL}$)間でも有意な閾値改善効果が認められた。bv 治療群と対照各群を比較したところ、bv では有意な閾値上昇を示した。

bv 治療群の 1, 2, 3 ヶ月齢における ABR-IV 波閾値は各々 71.1 ± 12.2 , 69.3 ± 11.5 , $73.2 \pm 8.3 \text{ dB SPL}$ であり、ほぼ一定であった(図 2)。しかし個体毎には経時的变化が認められた。そこで、bv 治

療群の3ヵ月間のABR-IV波閾値の経時変化を次の3群, すなわち軽快群(15-20dB SPL 以上改善が認められる), 不変群(変化が15dB 以下)と悪化群(閾値が20dB 以上上昇している)に分類したところ, 軽快群が6耳(16.7%), 不変群が23耳(63.9%), 悪化群が7耳(19.4%)であった。すなわち, 治療群の約8割において閾値の維持や改善効果が認められた(図3)。軽快耳におけるクリック音刺激によるABR波形の変化を図4に示す。

2)各波潜時

最大音圧(135dB)刺激時のABR各波潜時ではbvは治療群, 未治療群ともに対照に比較し潜時が遅い傾向が認められ, 特にIV波では有意に($p<0.05$)遅延していた(図5)。しかしbv, 対照ともに神経幹細胞移植による潜時変化は認められなかった。

bv治療群では最大音圧時ABR-各波平均潜時にはほとんど変化がみられなかった(図6)が, IV波閾値と同様に個体によっては潜時の経時的変化が認められた。そこで, ABRのII波, IV波潜時に関して次の3群, すなわち軽快群(潜時の短縮あり), 不変群(変化が認められない), 悪化群(潜時延長あり)に分類した。その結果, II, IV波でそれぞれ36耳中8耳と13耳に潜時改善が認められた(図7)。軽快群のII波潜時は, 音圧135dBにおいては変化がほとんどなかったが, 音圧を下げるとともに改善効果が明瞭であった。一方, IV波潜時はむしろ高音圧での改善効果が有意にみられ, 低音圧では改善は認められるもののその差は有意とはいえなかった(図8)。

3)各波振幅

生後1ヵ月時の135dB SPL刺激音に対するI波振幅はbv治療群と未治療群の間に有意な増大($1.28\pm 0.79\mu\text{V}$, $0.70\pm 0.44\mu\text{V}$; $p<0.05$)が認められた(図9)。対照においても同様に振幅の有意差(3.39 ± 1.99 , $2.21\pm 1.24\mu\text{V}$; $p<0.05$)が得られた。II波振幅は対照群では, 治療による有意な振幅増大(6.27 ± 4.18 , $3.91\pm 2.47\mu\text{V}$; $p<0.05$)が認められた。また, I, II波はともにbvが対照に比較して有意に振幅が小さく, bv未治療群<bv治療群<対照未治療群<対照治療群の順で振幅が増大していた。

一方, bvの治療群と未治療群の間で, IV波振幅に有意差($1.99\pm 1.04\mu\text{V}$, $0.98\pm 0.60\mu\text{V}$; $p<0.001$)が認められた。対照においても同様であった(3.62 ± 2.29 , $1.50\pm 0.79\mu\text{V}$; $p<0.001$)。また, 対照治療群が他の3群に比較して有意な振幅増大を示し, bv治療群は対照未治療群に比較してIV波振幅がやや高かった。

bv治療群(36耳)の生後3ヵ月間におけるABRのII波, IV波振幅に関して, 次の3群, すなわち軽快群(振幅が25%以上増幅), 不変群(振幅変化が25%未満), 悪化群(振幅が25%以上減少)に分類した。結果, II, IV波でそれぞれ36耳中18耳, 8耳で改善が認められた(図10)。特にII波では50%で振幅改善が認められ, 約5倍に振幅が増大した例も存在していた。

各耳ごとに対応のあるt検定にて検討したところ, I波とIV波は平均すると1, 2ヵ月齢に対し, 3ヵ月齢で振幅が有意に減少した(図11)。逆に, II波振幅は1ヵ月齢($2.38\pm 1.12\mu\text{V}$)に対し, 2, 3ヵ月齢(2.84 ± 1.19 , $2.73\pm 1.22\mu\text{V}$)では増大した($p<0.05$)。

bv治療群において以上の5パラメーター, すなわちクリック音でのABR II波

潜時, 振幅, IV波潜時, 振幅そして閾値の全てが軽快した耳は無かった. しかし, 4 つ以上のパラメーターの軽快は 18 例中 6 例(6 耳)あり, 6 耳中 5 耳が右側に効果が目立った. この 6 例の反対耳の ABR は軽快ないし不変を示した. 一方, 4 パラメーター以上の悪化は上記とは別の 3 例(5 耳)にみられた. この 3 例中 2 例は両耳とも悪化所見を示した. このように, 同一個体で相反する効果がみられる場合はなく, 神経幹細胞投与により ABR 上は両耳とも同様の効果が得られた.

2. トーンバースト(TB)音刺激による ABR 変化

TB 音両耳刺激による各周波数での ABR IV波閾値(平均±標準偏差)の結果を図 12 に示す. bv 治療群は, 未治療群に比較し, いずれの周波数での音刺激に対しても, 明らかな IV波閾値の改善が認められたが, 対照値には及ばなかった. 各刺激周波数での IV波閾値を比較すると, 治療群, 未治療群, 対照群ともに 16kHz での閾値が最も低い結果が得られた.

3. DPOAE (歪成分耳音響放射) の変化

1) DPOAE 閾値

bv 治療群において DPOAE の測定をしたところ, すべての刺激音圧に対して検出できない, すなわち非検出耳の割合は 22.2% (1 ヶ月時) から 17.5% (3 ヶ月時) に減少する傾向を示した(図 13). bv 未治療群でも同様に, DPOAE 非検出耳が 1 ヶ月時に 11.1%, 3 ヶ月時に 21.4% とほぼ同程度存在していたが, 対照群においてはすべての耳で検出できた.

DPOAE が検出された bv および対照

各群の 1 ヶ月齢における DPOAE 閾値を比較した結果を図 14 に示す. bv 治療群 (36 耳; 74.5 ± 6.1 dB SPL) と未治療群 (68 耳; 71.4 ± 12.4 dB SPL) は閾値が対照治療群 (10 耳; 52.5 ± 6.1 dB SPL), 未治療群 (10 耳; 53.0 ± 13.4 dB SPL) に対して有意に ($p < 0.0001$) 増大していた. bv, 対照群ともに治療の有無による差は認められなかった.

2) 最大 DP 値の変化

1 ヶ月齢における bv 治療群, 未治療群ともに DP 値 (各々 0.2 ± 5.5 dB SPL, 3.0 ± 6.9 dB SPL) は対照 (治療群; 21.8 ± 3.9 dB SPL, 未治療群; 20.4 ± 8.6 dB SPL) に比べて有意に ($p < 0.001$) 低かった. bv および対照群ともに治療による差は認められなかった(図 15).

bv 治療群における最大 DP 値は 1 ヶ月時 (0.21 ± 5.49 dB SPL), 2 ヶ月時 (0.40 ± 5.34 dB SPL), 3 ヶ月時 (1.21 ± 8.31 dB SPL) と明らかな変化はなかった(図 16). また, 各群における最大 DP 値の月齢 (1-3 ヶ月齢) による分布にも治療による違いはなかった(図 17).

4. GFP のウェスタンブロット及び蛍光像

GFP は GFP-TG マウスでは橋, 中脳, 頭頂葉皮質, 前頭葉皮質に均等に発現していた. 一方, 生後 3 ヶ月 bv では頭頂葉皮質と中脳に比較的多く存在していた(図 18a). また, 生後 1 ヶ月時点での蝸牛内ラセン神経節の組織学的検討では対照と比べてニューロン数がやや減っているものの自家蛍光が得られる細胞が存在した(図 18b).

D. 考察

鳥類において内耳感覚細胞の再生が

おきることが示されて以来、ほ乳類でも蝸牛に直接幹細胞を移植することで内耳感覚細胞の再生を試みる研究が盛んになっている。bv は内耳感覚細胞に加え、ラセン神経節ニューロンの変性や消失も進行性に同時に生じているため、治療的アプローチとしては両者に対し効果を期待できる方法がより望ましいとも考えられる。今回の研究では、蝸牛の内耳細胞変性が生じている時期、すなわち生後1週間以内という早期の治療を試みた。bv はとくに新生仔期の体格が小さく、他のマウス同様まだ外耳道も閉鎖している。従って蝸牛内への直接投与はためらわれた。そこで我々は、脳室内に神経幹細胞を移植することによってbvの有する聴覚異常障害にどのような影響を与えるかについて聴性脳幹反応(ABR)および歪成分耳音響放射(DPOAE)を経時的に検討した。

その結果、神経幹細胞移植によりABRIV波の有意な閾値改善が認められた。II波潜時や振幅についても同様に改善を認めた。対照に関しても、閾値や振幅で同様の改善効果が認められた。一方、DPOAEに関しては、bv群、対照群ともに神経幹細胞移植による閾値や最大DP値の変化は認められず、効果はない～乏しいものと思われた。OAEは内耳特に外有毛細胞の機能を他覚的に反映するものである。これらの結果より、神経幹細胞のbv脳室内移植による効果は主に内耳の求心系機能に対するものであり、外有毛細胞機能障害や伝音性難聴に対する治療効果は認められないと考えられた。

神経幹細胞の脳室内移植による治療効果として次のような機序が考えられるであろう。一つは神経幹細胞に由来する液性因子、特に神経栄養因子によるも

のである。たとえばGFP-TGマウス由来の神経幹細胞を用いて成雌C57/BL6マウス内耳に直接投与した研究(Iguchi F et al. *NeuroReport* 2003; 14: 77-80.)によれば、幹細胞は1ヵ月後に内耳に生着しており、主にグリア細胞に分化しGDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor)の存在がコルチ器周辺で確認されている。これらと同様にbvに投与された神経幹細胞が蝸牛周辺に遊走して液性因子を分泌している可能性が考えられる。また、それらの神経栄養因子によりbvのラセン神経節ニューロンの保護作用がある程度なされているのかもしれない。bvの感覚細胞変性はBDNF, NT-3, NGFの単独あるいはカクテル投与により阻止できないが、一次ニューロンとのシナプス形成はNGFによって促進されることが培養実験で報告されている(Sobkowicz HM et al. *Int J Dev Neurosci* 2002; 20: 537-554.)。従って、今回bvだけでなく対照例にもみられたABRの潜時短縮や振幅増加は移植神経幹細胞が蝸牛内外において生着し、脳幹の聴覚経路すなわち蝸牛神経核から下丘といった二次ニューロン以降の求心性伝達機能に間接的な効果を及ぼしていることも想定される。

次に考えられる効果は神経幹細胞が脳室脈絡叢経由で血流により遊走し、最終的にはラセン神経節にたどり着き、聴覚系ニューロン等に分化するという機序である。一般に、移植神経幹細胞の生着は適切な時期に投与されるという「時間的因子」と生着のため適切な場所が存在するという「空間的因子」の二つが重要とされる(Coumans JV et al. *J Neurosci* 2001; 21: 9334-9344.)。bvは生直後から内耳系の変性が進み、ラセン神経節のニューロン消失が起きる。従っ

て同領域は物理的に粗な環境, すなわち空洞化しているの移植幹細胞にとって生着に好ましい状態になっているとも考えられる. 実際, 蛍光顕微鏡で観察したところbvのラセン神経節内にはGFPと思われる蛍光発色が得られる細胞が認められた. そして移植後1ヵ月の段階では脳内にもGFPが蛋白質レベルで存在していた. これらの細胞が果たして分化したニューロンなのか, あるいはグリア細胞なのか, そしてその場合聴覚系の機能に関わっているのか否かについては現在不明であり, 今後の詳細な検討が必要と思われる. もっとも, 内耳変性を生じることのない対照マウスでもみられたABRの機能的改善は第一の要因すなわち液性因子の関与が強いと考えるべきであり, bvにおいても同様であるのかもしれない. ただし, 移植後3ヵ月にわたりII波の潜時や振幅が改善する例が33%存在することは, 少なくともラセン神経節から脳幹の蝸牛神経節レベルまでの機能については保持・増進していることを示唆し, 聴覚系に到達した神経幹細胞が様々な様式, たとえばグリア細胞に分化し, host由来の残存ニューロンに対して神経栄養因子を供給することでその変性を抑制しているといったやり方で効果を発揮している可能性は充分ある.

以上の結果より, bvの新生児早期における神経幹細胞移植により, 進行性感音性難聴の悪化阻止あるいは改善効果が生じることが示された. 今後, 難聴改善効果の維持, 向上をもたらす投与方法や適切な分化誘導法さらには内在性幹細胞の誘導も含めて安全性に配慮しながら一層検討を行う必要があると思われる.

E. 結論

神経幹細胞を常染色体劣性遺伝性難聴bvに脳室内投与することにより, 生後に進行する聴力障害を阻止するか否かについて検討した. その結果, 聴性脳幹反応(ABR)には一部改善がみられる例が存在した. 耳音響放射(OAE)には改善がないものの神経幹細胞の脳内及び蝸牛内生着を示唆する所見が生化学的に得られ, 聴覚系機能, とくに求心系伝達機能を補完する可能性が示された.

研究協力者

小林奈麻子, 白根聖子, 小穴信吾, 加我牧子, 伊藤雅之: 国立精神・神経センター

福原康之, 奥山虎之: 国立成育医療センター

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

学会発表

1. 稲垣真澄, 昆かおり, 白根聖子, 加我牧子, 伊藤雅之: 常染色体劣性遺伝性難聴マウス bronx waltzer(bv) にみられる hyperactivity disorder 第44回日本小児神経学会総会 平成14年6月27-29日 仙台
2. 小林奈麻子, 稲垣真澄, 舩田正彦, 太田玲子, 大杉圭子: bronx waltzer mouse の多動性行動異常の病態: 行動的・生化学的検討 第32回日本神経精神薬理学会 平成14年10月17-18日 前橋

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

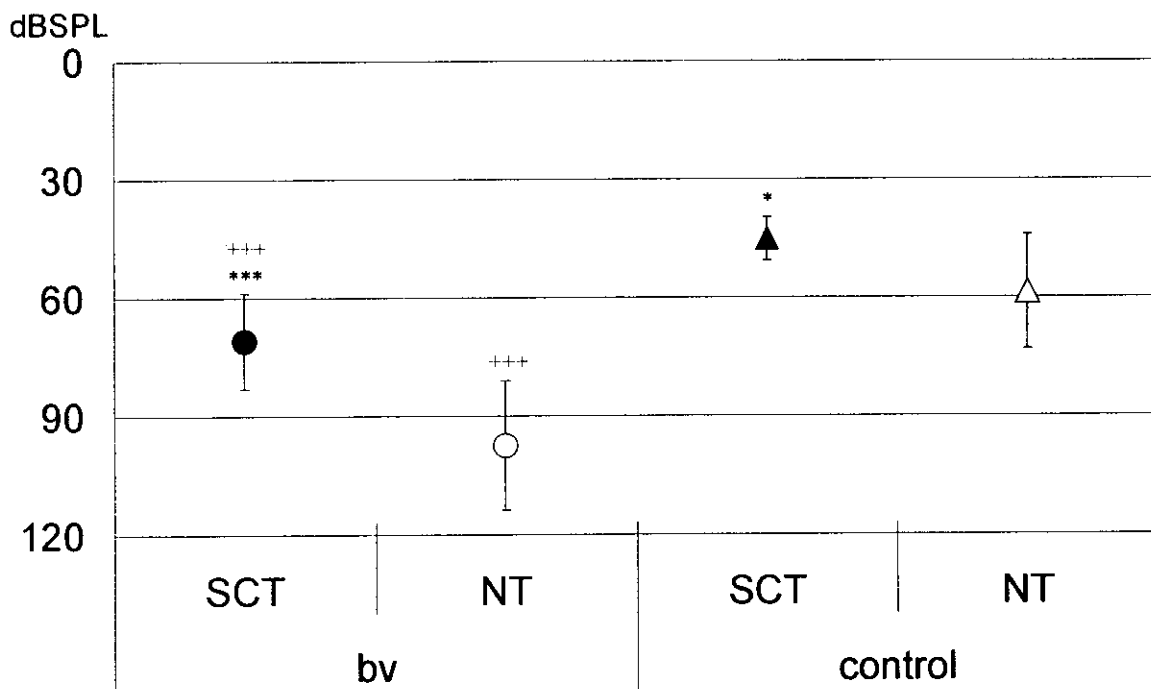


図1 各群における ABR-IV波閾値の比較

* : 治療群 vs. 未治療群 *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$

+ : bv vs. 対照群 +; $p < 0.05$, ++; $p < 0.01$, +++; $p < 0.001$

bv, 対照群ともに治療に伴う ABR-IV波閾値の改善が認められた。

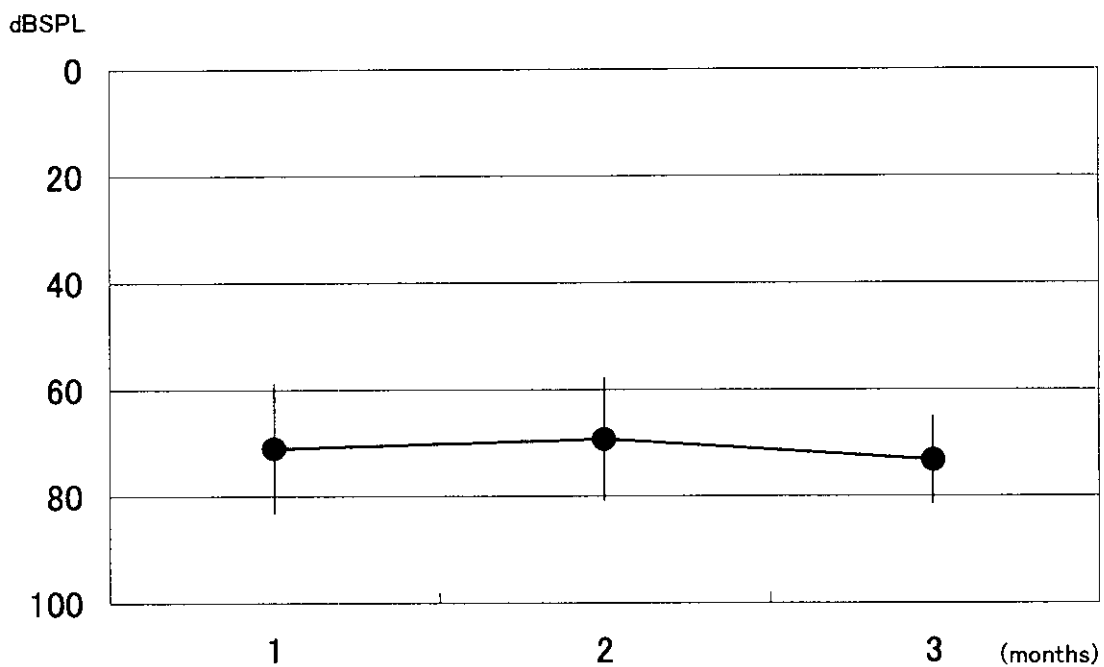


図2 bv 治療群における ABR-IV波閾値の変化
bv 治療群全例を平均したところ, ABR-IV波閾値に変化はなかった.

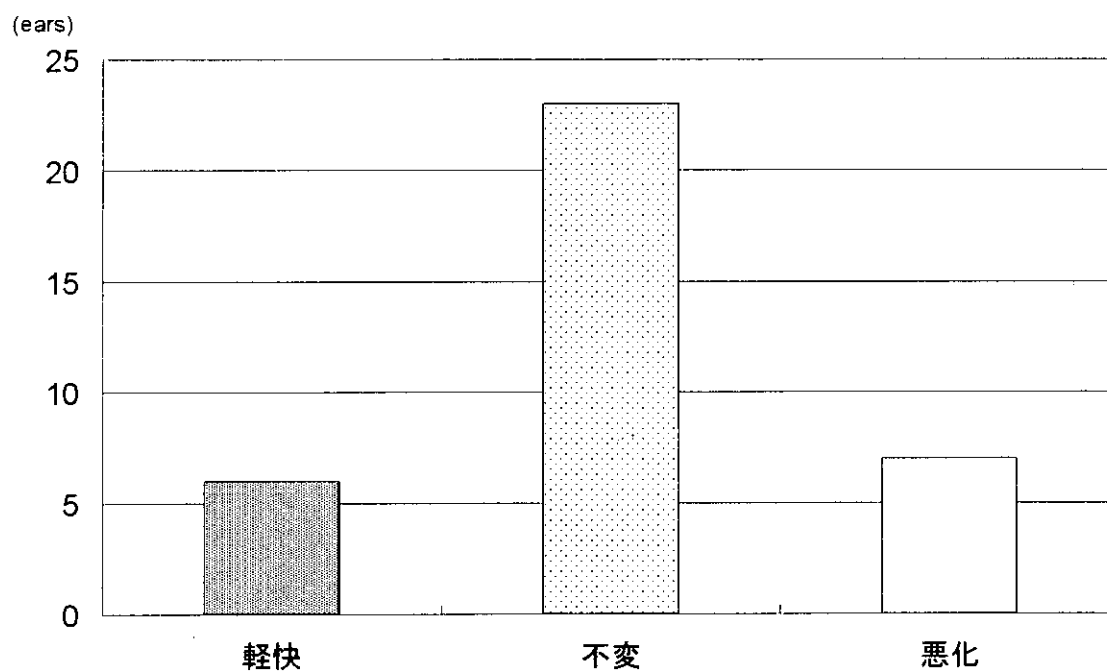


図3 bv 治療群 (bv-SCT) における ABR 閾値の経時変化
 約 8 割の耳に ABR-IV 波閾値の維持ないし改善が認められた。