

厚生労働科学研究費補助金

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 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 暁 清文

平成 16 (2004) 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 暁 清文	———— 1
--	--------

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 白馬伸洋	———— 4
--------------------------------------	--------

骨髄幹細胞の作成および虚血性難聴治療に関する研究 秦 龍二	———— 7
----------------------------------	--------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	————10
---------------------	--------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	————11
-----------------	--------

虚血性細胞障害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、難聴者福祉に十分に対応できているとは言い難い状況にある。特に突発性難聴は、急激に発症して高度の難聴をきたす疾患であるが、懸命の治療にもかかわらず症状が増悪する難治例もみられ、これらの症例にも有効な治療法の開発が求められている。本研究では突発性難聴の原因として内耳虚血説に着眼し、一過性内耳虚血の動物モデルを用い、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、虚血性細胞障害の病態を反映した新しい治療法開発を進めた。

平成 15 年度は、AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗剤である DNQX について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 DNQX の蝸牛内投与により、内耳虚血後の聴力域値上昇が抑制され、組織学的にも進行性のコルチ器における内有毛細胞脱落数の減少が認められた。以上のことより、AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗剤は虚血性内耳障害の治療として優れた方法である可能性が示唆された。

また、現在までの動物モデルを用いた研究において虚血性内耳障害に対する低体温療法の効果について報告してきたが、今回、臨床研究として突発性難聴に対する内耳低温療法の有用性を検討するため、従来法（ステロイド静注療法）による治療と氷枕による頸部冷却を加えた比較を行い、低体温群の方が予後良好な聴力という臨床現場に応用できる有望な結果が得られた。

分担研究者 白馬伸洋
所属機関 愛媛大学医学部耳鼻咽喉科
職名 講師
分担研究者 桑 龍二
所属機関 愛媛大学医学部解剖学
職名 助教授

動物モデルを用いて AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗剤による細胞死防御効果の検討を行い、虚血による内耳障害に対する AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗剤の有用性の確認を目的とした。

また臨床研究として虚血による内耳障害が成因の一つと考えられる突発性難聴に対する内耳低温療法の有用性を検討するため、突発性難聴で入院され治療に同意が得られた患者を対象として、従来法（ステロイド静注療法）による治療と氷枕を用いて頸部の冷却を加えた比較を行い、突発性難聴に対する低体温療法の有用性についての確認を目的とした。

A. 研究目的

突発性難聴は 40～50 歳代に好発し、我が国では年間約 2 万 5000 人が罹患する急激に発症して高度の感音性難聴をきたす疾患である。本症の原因として遺伝子、ウイルス、代謝異常など様々報告されているが、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。本研究では、スナネズミを用いて一過性内耳虚血の動物モデルを確立し、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、虚血性内耳障害の病態を反映した突発性難聴に対する新たな治療法開発を目的としている。

今年度は、基礎研究として一過性内耳虚血の

B. 研究方法

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誘導することができる。今回、一過性内耳虚血を負荷したスナネズミに AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗剤である DNQX を蝸牛正円窓より投与して、内耳障害を

防御する効果があるか否かを検討した。詳細であるが、スナネズミの両側椎骨動脈の血流を15分間、遮断・再開通させる直前に、DNQXの蝸牛内投与を行った。コントロール群には同様の手技で、生食の投与を行った。虚血後の聴力域値変化はABRを測定する事によって行った。反応電位は信号処理装置を用い300回加算して求めた。組織変化については、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て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Hoechst 3342で二重染色し、有毛細胞のF-actinと核を蛍光顕微鏡にて観察し、脱落した有毛細胞の割合を算出することによって組織学的検討を行った。

低体温療法の臨床への応用として、突発性難聴の入院患者に対し従来の治療（ステロイド静注療法）時に氷枕を用いて頸部を冷却し、治療成績向上に影響を与えるかについて検討を行った。冷却時間については入院後に1日2回行う点滴治療の間2時間を限度に行い、聴力改善の評価については純音聴力検査を用いて治療前後と入院治療中の平均聴力レベル（4分法）の測定を行った。氷嚢による両耳の温度低下効果の確認については、正常人の片側の側頭部を治療に用いる方法と同様に氷嚢を用いて2時間冷却し、蝸牛温の直接測定は不可能であるため、鼓膜体温計を用いて経外耳道的な鼓膜温の測定を行った。またサーモグラフィを用いて、2時間の冷却中の側頭部の体表温度変化について観察を行った。

C. 研究結果

AMPA型グルタミン酸受容体拮抗剤の効果については、一過性内耳虚血前に蝸牛正円窓よりDNQXを投与した結果、ABR検査では虚血1、4、8日後のABR域値の有意な上昇は認められなかった。さらに組織学的にも有毛細胞における細胞脱落が減少することを明らかにし、内耳虚血障害前にAMPA型グルタミン酸受容体拮抗剤投与を行った場合、虚血性難聴の有望な治療手段になりうることを示唆された。

突発性難聴の入院患者に対する低体温療法の効果については、ステロイド剤を中心とした従来法群の治療後の平均聴力改善は28.4dBであった。一方、低体温群の治療後の平均聴力改善は37.1dBであった。統計学的有意さは認められなかったが、低体温を加えた低体温群の平均聴力

改善が、低体温療法を行わなかった従来法群と比較し、良好な改善傾向が認められた。

D. 考察

以上の結果より、虚血による内耳障害に対して、一過性内耳虚血前に蝸牛正円窓より投与したAMPA型グルタミン酸受容体拮抗剤が保護効果を持つことが証明された。今回、研究に用いたAMPA型グルタミン酸受容体拮抗剤は、すでに脳神経学領域において虚血性脳障害に対して抑制効果が確認されているが、内耳虚血障害に対してその有用性を証明した研究は国内外ともに行われていない。実際に内耳虚血が重要な発症因子であると推察される突発性難聴に対して、新たな治療法としての可能性が推察される。今後はAMPA型グルタミン酸受容体拮抗剤の投与量や、虚血後投与の有効性についても詳細に検討する予定である。

また低体温療法は、実際に脳梗塞の治療法として臨床応用が進み、わが国が世界に発信している数少ない虚血性脳障害の治療法の1つとして世界から注目されている。今回の研究では基礎的に耳科領域での低温療法の有効性を証明するとともに、突発性難聴を対象に臨床治験を行い効果が確認できた。突発性難聴の治療法としては全くの新しい試みである。低温療法の研究は当初動物実験のみを行う予定であったが、予想外に大きな効果が見られたため予備的ではあるが臨床研究まで行い予想通りの治療効果が得られた。この療法は、安全性も高く、非常に簡便な「氷枕を頸部に当てる」だけで実施可能であり、突発性難聴の新しい治療法になりうることを示された。

E. 結論

今回の研究ではAMPA型グルタミン酸受容体拮抗剤である、DNQXを内耳虚血1時間前に蝸牛内投与したところ、進行性の内毛細胞脱落を抑制し虚血性難聴を防御する効果のあることが確認された。また近年、脳血流障害において、神経細胞障害の増悪因子にグルタミン酸の神経毒性が強く関与していることが報告されているが、我々の一過性内耳虚血モデルにおいても、内毛細胞における進行性脱落障害にグルタミン酸が関与していることも確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1. 暁 清文：内耳損傷の予防と対応。JOHNS 19:3:322-326, 2003
2. 白馬伸洋、谷口昌史、前谷俊樹、清水義貴、盛實 勲、暁 清文：AMPA 型受容体拮抗剤による虚血性内耳障害の抑制。Otol Jpn 13(3):185-188, 2003
3. 盛實 勲、白馬伸洋、谷口昌史、前谷俊樹、清水義貴、暁 清文：蝸牛神経複合活動電位ならびに蝸牛直流電位に及ぼすグルタミン酸アゴニストの影響。Audiol Jpn 46: 262-267, 2003
4. 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 in gerbil. Gene Therapy 10(5):426-433, 2003
5. Koga K, Hakuba N, Watanabe F, Shudou M, Nakagawa T, Gyo K : Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti : An experimental study in gerbils. J Comp Neurol 456(2):105-111, 2003
6. Hakuba N, Matsubara A, Hyodo J, Taniguchi M, Maetani T, Shimizu Y, Tsujiuchi Y, Shudou M, Gyo K : AMPA/kainate-type glutamate receptor antagonist reduces progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia. Brain Res 25:979(1-2):194-202, 2003
7. Maetani T, Hakuba N, Taniguchi M, Hyodo J, Shimizu Y, Gyo K : Free radical scavenger protects against inner hair cell loss after cochlear ischemia. Neuroreport 6:14(14):1881-1884, 2003
8. Kanzaki J, Inoue Y, Ogawa K, Fukuda S, Fukushima K, Gyo K, Yanagihara N : Effect of single-drug treatment on idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Auris Nasus Larynx 30:123-127, 2003

9. Hata R : Recent advances in adenovirus-mediated gene therapy for cerebral ischemia. Current Gene Therapy 3:43-48, 2003

10. Hata R : Testosterone up-regulates aquaporin-4 expression in cultured astrocytes. J Neurosci Res 72:709-15, 2003

2. 学会発表

1. 盛實 勲：蝸牛内直流電位に及ぼすグルタミン酸アゴニストの効果。第33回日本聴覚医学会 ERA 研究会、平成15年7月
2. 白馬伸洋：虚血性内耳障害に対する神経幹細胞を用いた再生治療の基礎的研究。第2回愛媛再生移植医療研究会、平成15年7月
3. 暁 清文：虚血性難聴とその治療。第57回奈良県耳鼻咽喉科研修会、平成15年10月
4. 清水義貴：GLAST ノックアウトマウスにおける聴覚の検討。第48回日本聴覚医学会、平成15年9月
5. 白馬伸洋：虚血性内耳障害に対する神経幹細胞を用いた再生治療の基礎的研究。第2回愛媛再生移植医療研究会、平成15年7月
6. 白馬伸洋：GDNF アデノウイルスによる一過性内耳虚血障害抑制効果。第26回日本神経学会、平成15年7月

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定も含む。）

2001年11月特許出願・取得、「突発性難聴に対するフリーラジカルスカベンジャー：ラジカットの効果」。

虚血性難聴に対する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講師

研究要旨

本研究では突発性難聴の原因として内耳虚血説に着眼し、一過性内耳虚血の動物モデルを用い、現在までに虚血性細胞障害の病態を反映した新しい治療法開発を進めてきた。虚血性細胞障害の病態としては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・消失することが明らかとなった。このため虚血性内耳障害に対する治療は therapeutic time window を考慮し、できるだけ早期に開始することが肝要であると報告してきた。特に虚血直後の急性期にはフリーラジカル捕捉剤、ジンセンノサイト Rb1、グルタミン酸拮抗剤、低温療法などが有効であるが、虚血数日間が経過した慢性期には幹細胞移植による内耳再生が有望な治療法として提唱された。

前年度は虚血性難聴に対する幹細胞を用いた再生治療の研究として、虚血数日後に脱落した有毛細胞を再生させる目的で、蝸牛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。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。今年度はさらに神経幹細胞の注入により、虚血後に進行する聴力障害に対する防御効果について検討を行った。その結果、神経幹細胞の注入側はコントロール側と比較し、有意に ABR 波形の閾値上昇が抑制されていた。以上のことから、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

感音性難聴に対し現存する治療手段には限界があり、難聴者福祉に十分に対応出来ているとは言いがたい状況にある。感音性難聴の原因として、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、一過性内耳虚血・再環流のスナネズミ動物モデルを用いて、内耳虚血障害に対する新しい治療法について研究を進めてきた。今回、特に虚血数日後における内耳障害の慢性期に対する最も効果的な治療法を探求することを目的に、虚血性内耳障害に対する神経幹細胞を用いた内耳再生の有用性を検討した。

B. 研究方法

スナネズミ胎児より神経幹細胞を採取・培養し、蝸牛内に注入した神経幹細胞が、一過性内耳虚血負荷後の障害部位に移行し、再生細胞として分化していく可能性について検討を行う。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案が行った。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神経細胞を採取の上、3日間培養・増殖させる。他のスナネズミを用いて15分間の内耳虚血負荷を行った。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誘導することができる。幹細胞投与群としてスナネズミ右側蝸牛を用い、虚血1日後、培養・増殖させた海馬あるいは線条体由来の神経幹細胞を内径200 μ mのガラス管を用い、正円窓経路にて蝸牛内注入を行った。コントロール群として処置を行っていない左側蝸牛を用いた。虚血後の聴力域値変化はABRを測定する事によって行った。反応電位は信号処理装置を用い300回加算して求めた。

C. 研究結果

培養された神経幹細胞の虚血1日後の蝸牛内投与の結果、虚血-幹細胞投与群において虚血4日後、脱落したと考えられた有毛細胞の部位に

において、DAB 染色にてネスチン陽性である幼弱な神経幹細胞が数多く認められたことより、有毛細胞が脱落したと思われる部位に神経幹細胞が移行していることが確認された。

虚血障害に対する神経幹細胞の効果については、一過性内耳虚血前に蝸牛正円窓より神経幹細胞を投与した結果、ABR 検査では虚血 4 日後の ABR 域値上昇が有意に抑制されていた。このことより、内耳虚血障害 1 日後に神経幹細胞の蝸牛内投与を行った場合、虚血性難聴の有望な治療手段になりうることが示唆された。

D. 考察

培養した神経幹細胞の虚血 1 日後の蝸牛内投与により、虚血 4 日後に脱落した有毛細胞の部位に移入することが確認された。また ABR を用いた虚血後の聴力域値の測定の結果、神経幹細胞投与群において虚血後に生じる聴力域値の上昇が有意に抑制されたことより、今後、内耳における再生医療への道が開かれた。ヒトの有毛細胞は一旦障害されて消失した場合、鳥類のような自己再生能力は持たない。自己複製能と他分化能を有する神経幹細胞を虚血後の蝸牛に投与することは、進行性に脱落していく有毛細胞における細胞再生を強力に促す効果を有することから、突発性難聴に対しては絶大な効果が期待される。これらの研究は細胞再生そのものを促すため、虚血性障害ばかりでなく、音響外傷性難聴や老人性難聴など内耳の神経細胞変性に伴うさまざまな難聴に対しても有効な治療法となり、本研究の社会的意義は大きいと考えられる。

E. 結論

以上の結果から、蝸牛内に投与した神経幹細胞の、虚血後に有毛細胞における脱落した部位に移行と、虚血後に生じる聴力域値の上昇が有意に抑制されたことより、内耳における再生治療の可能性が強く示唆された。今後、神経幹細胞の虚血性細胞障害に対する有毛細胞の再生効果を、神経幹細胞投与した後の長期に渡る観察から検討するとともに、その他の細胞再生効果を増強する種々の神経栄養因子 (G- DNF 、 bFGF) について同時投与を行い、内耳における神経幹細胞を用いた再生治療について臨床応用をめざす。特に当科では高度感音難聴患者に対し、人

工内耳埋め込み術を多く行っているが、実際に当大学病院にて人工内耳挿入術時に神経幹細胞を内耳内への注入を行えば、聴覚感覚細胞の再生を促し、術後良好な聴力成績を得る可能性が高いと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 暁 清文：内耳損傷の予防と対応。JOHNS 19:3;322-326, 2003
2. 白馬伸洋、谷口昌史、前谷俊樹、清水義貴、盛實 勲、暁 清文：AMPA 型受容体拮抗剤による虚血性内耳障害の抑制。Otol Jpn 13(3):185-188, 2003
3. 盛實 勲、白馬伸洋、谷口昌史、前谷俊樹、清水義貴、暁 清文：蝸牛神経複合活動電位ならびに蝸牛直流電位に及ぼすグルタミン酸アゴニストの影響。Audiol Jpn 46: 262-267, 2003
4. 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 in gerbil. Gene Therapy 10(5):426-433, 2003
5. Koga K, Hakuba N, Watanabe F, Shudou M, Nakagawa T, Gyo K : Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti : An experimental study in gerbils. J Comp Neurol 456(2):105-111, 2003
6. Hakuba N, Matsubara A, Hyodo J, Taniguchi M, Maetani T, Shimizu Y, Tsujiuchi Y, Shudou M, Gyo K : AMPA/kainate-type glutamate receptor antagonist reduces progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia. Brain Res 25:979(1-2):194-202, 2003
7. Maetani T, Hakuba N, Taniguchi M, Hyodo J, Shimizu Y, Gyo K : Free radical scavenger protects against inner hair cell loss after cochlear ischemia. Neuroreport 6:14(14):1881-1884, 2003
8. Kanzaki J, Inoue Y, Ogawa K, Fukuda S, Fukushima K, Gyo K, Yanagihara N : Effect of single-drug treatment on idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Auris Nasus Larynx 30:123-127, 2003
9. Hata R : Recent advances in adenovirus-mediated

gene therapy forcerebral ischemia. *Current Gene Therapy* 3:43-48, 2003

10. Hata R : Testosterone up-regulates aquaporin-4 expression in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 72:709-15, 2003

2. 学会発表

1. 盛實 勲 : 蝸牛内直流電位に及ぼすグルタミン酸アゴニストの効果。第33回日本聴覚医学会 ERA 研究会、平成15年7月

2. 白馬伸洋 : 虚血性内耳障害に対する神経幹細胞を用いた再生治療の基礎的研究。第2回愛媛再生移植医療研究会、平成15年7月

3. 暁 清文 : 虚血性難聴とその治療。第57回奈良県耳鼻咽喉科研修会、平成15年10月

4. 清水義貴 : GLAST ノックアウトマウスにおける聴覚の検討。第48回日本聴覚医学会、平成15年9月

5. 白馬伸洋 : 虚血性内耳障害に対する神経幹細胞を用いた再生治療の基礎的研究。第2回愛媛再生移植医療研究会、平成15年7月

6. 白馬伸洋 : GDNF アデノウイルスによる一過性内耳虚血障害抑制効果。第26回日本神経学会、平成15年7月

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定も含む。)

2001年11月特許出願・取得、「突発性難聴に対するフリーラジカルスカベンジャー：ラジカットの効果」。

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
（分担）研究報告書

骨髄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 愛媛大学医学部解剖学第2講座助教授

研究要旨

虚血性細胞障害による難聴の再生療法の可能性を検討する為に、前年度は神経幹細胞を用いた再生治療を試みた。本年度は将来の臨床応用に向けて神経幹細胞の代わりに骨髄幹細胞による再生療法の可能性を検討した。まずマウスの骨髄液を採取し、side population法 (Goodell *et al.*, *J Exp Med* 183, 1797-806, 1996) によりマウス骨髄幹細胞を約千倍に濃縮できる事を確認した。次いでこの手法をそのまま砂ネズミに応用し、同様に砂ネズミ骨髄幹細胞を約千倍に濃縮する事に成功した。今後得られた骨髄幹細胞を用いて虚血性難聴に対する再生療法の可能性を検討する。更に幹細胞移植後の体内動態を観察するためレポーターgeneとしてGFP発現Retrovirus vectorの作成を行なった。

A. 研究目的

前年度、我々は虚血性難聴の治療として再生治療が有用かどうかの検討を行った。即ち、虚血性細胞障害による難聴には内有毛細胞の細胞死が関連する事が示唆されており、細胞死に陥った内有毛細胞の治療に神経幹細胞を用いた再生治療が有効かどうかを検討した。そこで内耳虚血モデル動物への神経幹細胞の投与を行った所、聴覚機能を改善させる結果を得た。今回再生治療の臨床応用の可能性を探るため、神経幹細胞ではなく、臨床の現場でも使用可能な骨髄幹細胞の精製を行い、更に幹細胞移植後の体内動態を観察するためレポーターgeneとしてGFP発現Retrovirus vectorの作成を行なった。

B. 研究方法

2) 再生治療に用いる骨髄幹細胞の培養:

[A]: 前処理

1. 砂ネズミを sacrifice する。
2. 大腿骨、腓骨を関節部から外す。
3. 砂ネズミ: 腓骨: 22G、大腿骨: 18G
一方の端に針を突き刺し、内部の骨髄をPBSで押し流す。
4. シリンジ (22G) で良く pipetting して、single cell にする。

[B]: 骨髄細胞の処理

1. 得られた骨髄液を Spin down (1500rpm, 5 min, 4 °C) して上清を捨てる。

2. NH₄Cl を 10ml 入れ、yellow chip で pipetting 後、5分間待つ。
3. Spin down (1500rpm, 5 min, 4 °C) 後上清を捨てる。
4. PBS+2%FCS を 5ml 加え、mix する。
5. Spin down (1500rpm, 5 min, 4 °C)。上清を捨てる。
6. DMEM(high glucose)+10%FCS に約 500 万個/ml) になるように浮遊させ、4 °C で保存する。

[C]: Hoechst 33342 staining

1. 得られた骨髄液を Spin down (1500rpm, 5 min, 4 °C) 後、上清を捨てる。
2. マウス骨髄細胞を DMEM(high glucose)+2%FCS に 1×10^6 /ml (100 万個/ml) になるように浮遊させ、37 °C で 30 分 incubate して温める。
3. Hoechst 33342 1mg/ml solution (dH₂O にて溶解) を $\times 1/200$ となるように入れる (final 5 ug/ml)。
4. よく pipetting した後、100~200ul を別の falcon tube に入れ、verapamil 5mM solution (PBS 溶解) を 1/100 になる様に入れる (final conc 50uM)。その後 37 °C の恒温槽に入れて 90 分 (90-120 分) 遮光して incubate する。
5. 90 分経過したら、細胞浮遊液に氷冷していた 2%FCS 加 PBS を直接注ぎこんで急速に冷却する。

6. Spin down (1500rpm, 5 min, 4 ° C)後、上清を捨てる。
7. PBS+2%FCS を 5ml 加え、mix する。
8. Spin down (1500rpm, 5 min, 4 ° C)後、上清を捨てる。
9. 2ug/ml の propidium iodide (PI) の入った 2%FCS 加 PBS を 10ml 加え、mix する。
10. Spin down (1500rpm, 5 min, 4 ° C)後、上清を捨てる。
11. 500 万~1000 万/ml になるように 2%FCS 加 PBS に浮遊させ mesh で細胞塊を除去後、FACS Sorting を行う。

2) GFP 発現 Retrovirus vector の作成 :

[A]: レトロウイルスベクターの構築

レトロウイルスベクターはプラスミドの形で構築した。組み換えレトロウイルスを産生するのに必要な構造は、5' と 3' 末端に LTR 構造と、5'-LTR (long terminal repeat) に続くレトロウイルスパッケージングシグナル (ψ) を持ち LTR 間の全長が 8kb 以内であれば良く、目的遺伝子 (GFP) を 5'-LTR プロモーターを用いて発現させた。

[B]: パッケージング細胞へのトランスフェクション

今回はリポフェクションでベクターDNAを導入した。

- ① 前日に 10%FCS+DMEM を培地とし、3.5 cm dish に 2×10^5 個のパッケージング細胞を撒く ($2 \times 10^4/cm^2$)。
- ② リポフェクション当日、無血清培地 DMEM 100 ul に DNA 2 ug を含む A 液と、同じ無血清培地 DMEM 100ul に Lipofectamine 10ul を含む B 液をエッペンドルフチューブ内にそれぞれ用意し、この両者を緩徐にピペッチングして混和する。混和物を 4 5 分間室温に静置後、800 ul の無血清培地 DMEM を加える。
- ③ この液 (総量 1 ml) を前日用意した 3.5 cm dish の培地と置換する。この際無血清培地で 3 度細胞を洗ってから混和液 1ml を静かに加える。その後 CO2 incubator (37°C, 5% CO2) に dish を戻す。
- ④ 6 時間後に培地を吸引除去し、本来の血清入り培地 (10%FCS+DMEM) を加える。

[C]: レトロウイルス産生細胞の安定な形質転換体の選別

- ① トランスフェクション 2 日後に薬剤選択を

開始する。この時は細胞数が増加しているため、細胞を回収後 G418 (500ug/ml) (Geneticin: Gibco BRL, 11811) を含む培地で 6cm dish にまき直す。G418 は力価で 500 ug/ml とする。

- ② 3 日毎に G418 添加培地を新しいものと置換する。

最終的には 7~10 日後には薬剤耐性の生細胞がコロニーとして認められる様になる。

- ③ 顕微鏡をベンチ内に入れ、なるべく無菌下で採取できるようにする。

- ④ 顕微鏡下に、200ul 用ピペットマンに接続したイエローチップでコロニーの中心を小円上に掻き、それよりデッシュの底から剥がれかかった細胞塊をチップ内に吸い取る。この際なるべく隣接したコロニーのないものを選ぶ。

- ⑤ あらかじめ培地を適量入れてある 24~48well の培養 well に細胞塊を移し、数回 pipetting する事で細胞をばらして撒く。

- ⑥ 撒いた細胞数が不均一なため、細胞増殖が不揃いだがサブコンフルエントとなればより大きな培養皿にまき直す。この時ウイルスを含む培養上清回収用と細胞保存用とに分ける。クローン番号も記載する。

- ⑦ 培養上清は細胞がサブコンフルエントとなった所で培地を交換後 1 日置いて回収する。シリンジで吸入して 0.45 um フィルターで濾過する。

クローン間で力価を比較するため、なるべく細胞の密度が一定の条件で回収し、-40°C や -70°C でいったん凍結保存する。細胞保存用はサブコンフルエント程度で細胞を回収し、通常の方法通りに凍結保存する。

C. 研究結果

1) 再生治療に用いる骨髄幹細胞の同定

骨髄液採取後、骨髄幹細胞分画を得るため、side population 法 (Goodell, M., et al. (1996) J Exp Med 183, 1797-806) によりマウス骨髄幹細胞を約千倍に濃縮できる事を確認した。Side population 法により Hoechst33342 に染まらない細胞の内、死細胞やゴミを除いた分画を FACS sorter にて採取した。同領域の細胞は全骨髄細胞の約 0.1% を占めており、得られた骨髄液を約 1000 倍に濃縮できた。赤血球を除く骨髄細胞のうち、造血幹細胞の頻度が 1~2 万分の 1 と考えられているので、SP 法により採取された骨髄液分画には、造血幹細胞が 10~20 分の 1 の割合で存在していると考えられ、高純度の幹細胞液が得られたもの

と考えられた。

2) GFP 発現レトロウイルス発現細胞の選択
選択した 200 クローンのうち 32 クローンは全ての細胞で GFP を安定的に発現していた。現在このうち特に GFP 発現が良好であった 3 クローンを選んでレトロウイルスベクターの精製と力価評価を行っている。

2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

D. 考察

砂ネズミの骨髄幹細胞の精製に成功し、これを用いた再生治療を行う事が可能となった。また骨髄幹細胞の動態を観察するため、GFP 発現 Retrovirus vector を作成した。更に現在 GFP 発現 lentivirus vector の作成を開始している。これらは虚血性難聴の再生治療の臨床応用を検討するための基本的な tool となると考えられる。

E. 結論

以上のように、砂ネズミ骨髄幹細胞の採取と精製、幹細胞移植後の生体内での動態を観察するための virus vector の作成をおこなった。今後得られた骨髄幹細胞を用いて虚血性難聴の再生治療の可能性を動物モデルで検証し、臨床応用をめざす予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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 10:426-33, 2003

2. Masumura M and Hata R : Recent advances in adenovirus-mediated gene therapy for cerebral ischemia. Current Gene Therapy 3:43-48, 2003

3. Gu F, Hata R, Toku K, Yang L, Ma YJ, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J : Testosterone up-regulates aquaporin-4 expression in cultured astrocytes. J Neurosci Res 72:709-15, 2003

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定も含む。)

1. 特許修得
無し

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
Hakuba N, Matsubara A, Hyodo J, Taniguchi M, Maetani T, Shimizu Y, Shudou M, Gyo K	AMPA/kainate-type glutamate receptor antagonist reduces progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia.	Brain Research	979	194-202	2003
Maetani T, Hakuba N, Taniguchi M, Hyodo J, Shimizu Y, Gyo K	Free radical scavenger protects against inner hair cell loss after cochlear ischemia	NeuroReport	14	1881-1884	2003
Feng Gu, Hata R	Testosterone up-regulates aquaporin-4 expression in cultured astrocytes.	Journal of Neuroscience Research	72	709-715	2003
白馬伸洋, 谷 口昌史, 前谷 俊樹, 清水義 貴, 盛實 勲, 晁 清文	AMPA 型受容体拮抗剤に よる虚血性内耳障害の抑 制	Otlo Jpn	13	185-188	2003
盛實 勲, 白 馬伸洋, 谷口 昌史, 前谷俊 樹, 清水義 貴, 晁 清文	蝸牛神経複合活動電位な らびに蝸牛内直流電位に 及ぼすグルタミン酸アゴニ ストの影響	Audiology	46	262-267	2003

20030602

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