

厚生労働科学研究費補助金
感覚器障害研究事業

内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川郁

平成17（2005）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築に関する研究 -----	1
総括研究者 小川郁	
II. 分担研究報告	
1. 内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築に関する研究 -----	6
分担研究者 梅澤 明弘	
2. 薬剤性内耳障害における内耳環境とアポトーシスに関する研究-----	9
分担研究者 神崎 晶	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	16

内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築

総括研究者 小川郁 慶應義塾大学耳鼻咽喉科教授

研究要旨 内耳への骨髄幹細胞移植を行い、聴覚機能や形態学的観察を行った。さらに、本研究遂行のために臨床応用に向けた内耳ドラッグデリバリーシステムについて検討した。本研究の結果、*in vitro*下では骨髄幹細胞から神経幹細胞に転化させることは可能であったが、生体の内耳で神経幹細胞が内耳幹細胞あるいは有毛細胞に分化させることが今後の課題と考えられた。

A. 研究目的

現在、遺伝子導入による内耳有毛細胞の再生について研究中である。またトランスジェニックラットを用いて内耳蝸牛と前庭の内耳幹細胞（様細胞）の同定を行い、蝸牛と前庭の再生能の差異について検討した。また、内耳障害後に幹細胞様細胞の発現がみられた。すなわち、内耳由来の幹細胞が有毛細胞に分化することを阻害する因子が存在していると考えており、その候補となる因子も同定中である。また臨床応用に向けて、1) ヒト内耳前庭（聴神経腫瘍患者から摘出された）の器官培養法と2) 内耳デリバリーシステムの安全性の確立を目的とした研究が進行中である。内耳器官培養法の確立後、間葉系細胞との共培養法などを確立することも可能になると予想している。

難治性である内耳性難聴の治療にむけて、間葉系幹細胞より分化した感覚細胞を内耳に投与することにより聴覚機能を回復させることを目的とする。さらに、本研究遂行のために、ヒト骨髄間質細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、細胞寿命の延長を行い、内耳移植モデルを用いた結果に基づき、臨床への探索的研究へ着手する。内耳性難聴は難治性であり人口の5%以上が内耳性難聴のためのコミュニケーション障害に悩んでいる。特に高齢者においては加齢変化により約34%が難聴者である。内耳性難聴の原因の80%は感覚細胞（有毛細胞）に障害がある。もし有毛細胞を生かせることが可能ならば、内耳性難聴の治療が期待できる。これらの聴力にかかわる社会的問題に対し、内耳機能の再生、維持は国民の健康、医療、福祉の向上、医療の観点からも急務であり、欠くことのない問題となっている。

B. 研究方法

1) 動物難聴モデルに対する骨髄幹（KUSA-A1細胞）の内耳蝸牛へ直接投与を行い、有毛細胞の存在するコルチ器への生着を観察す

る。実験動物において間葉系幹細胞から分化させた内耳幹細胞を投与し、細胞の着床を含めたnetworkの形成と内耳の機能再生について検討する。

2) 内耳性難聴モデルマウスに対する細胞治療の供給源としてのヒト骨髄間葉系細胞の調整とプロファイリング

3) ヒト内耳のドラッグデリバリーシステムの開発内耳に薬剤や細胞を投与するための内視鏡の開発を検討中である。

C. 研究結果

1) 骨髄幹細胞は内耳や中耳にわたって細胞が生着したが、多くの細胞は骨に置換されていた。生体内で神経幹細胞へ分化していたかどうかは今後の検討課題としたい。生体外では骨髄幹細胞（KUSA-A1細胞）から神経細胞へ分化させる方法は確立しており、今後は有毛細胞やらせん神経節細胞へ分化させることが生体内外で作成できるかが課題である。

3) 内耳用内視鏡を開発するため、内視鏡の角度、解像度、レンズ、内視鏡の角度、投与用チャンネルなどについて安全性や効率性を高めた条件を検討中である。

D. 考察

我々は有毛細胞の存在する内リンパ腔に骨髄幹細胞を投与したが、現時点では有毛細胞やらせん神経節の完全なる分化や再生には至っていない。しかしながら、これらを基盤に本研究を推進することにより ①有毛細胞が消失した部位に移植された幹細胞が着床することによる、聴力低下のある患者に対する自家ないし同種他家細胞を用いた内耳再生法の確立 ②ヒト骨髄間葉系細胞の寿命延長、増殖法の研究から得られる結果に基づくバイオインフォマティクスからの情報の蓄積、それらの方法の安全性、科学性、倫理性の確立を今後の課題としたい。分担研究者の神崎の報告のごとく、投与した細胞が分化あるいは再生しやすい環境についても検討を加えていく必要があるだろう。上記のシステ

ムが確立されると同時に臨床応用が可能になるようにヒト内耳用内視鏡を開発に専心したい。

いままで内耳再生の視点で骨髄幹細胞の投与について論じたが、視点を変えてみると、中・内耳は骨で囲まれた組織であり、骨髄幹細胞が骨細胞に分化し、骨組織に変化することは内耳再生とは別に、慢性中耳炎や真珠腫性中耳炎などの中耳疾患に対するアプローチには有用であるかもしれない。この知見は中耳の再生医療として新たな選択肢になりうるかもしれない。

E. 結論

内耳の内リンパ腔に骨髄幹細胞を投与した。神経幹細胞やさらに分化した細胞の投与方法について検討を加え、さらに分化させた神経幹細胞をいかにして内耳幹細胞あるいは有毛細胞へ転化させるかについて検討していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomita T, Tanaka K, Shinden S, Ogawa K: Tracheoesophageal diversion versus total laryngectomy for intractable aspiration. J Laryngol Otol 118: 15-18, 2004.

Kanzaki S, Inoue Y, Watabe T, Ogawa K: Hypertrophic chronic pathymeningitis associated with chronic otitis media and mastoiditis. ANL 31: 155-159, 2004.

Kanzaki S, Kunihiro T, Imanishi T, Yamashita D, Ogawa K: Two cases of pulmonary embolism after head and neck surgery. ANL 31: 313-317, 2004.

小川 郁: 【鼓室形成術 私のコツ・私の工夫】

顔面神経の処理. ENTONI 36: 43-49, 2004.

小川 郁: 【耳閉塞感診断治療update】 聴神経腫瘍と耳閉塞感. ENTONI 35: 37-41, 2004.

小川 郁: 【手術範囲と術式】 聴神経腫瘍. JOHN S 20 (9): 1251-1254, 2004.

五島史行, 國弘幸伸, 小川 郁: 長期間にわたり聴力経過を観察可能であったPaget病症例. Equilibrium Res 63 (3): 194-201, 2004.

増田正次, 井上泰宏, 佐藤美奈子, 神崎 晶, 滝口洋一郎, 山下大介, 栗田昭宏, 藤岡正人, 小川 郁: 純音聴力レベルと聴性定常反応を利用した推定

聴力レベルとの比較 聴力正常者を対象にAuderaを用いて. Audiology Japan 47 (4): 207-213, 2004. 藤岡正人, 五島史行, 國弘幸伸, 荒木康智, 深谷和正, 小川 郁: 下垂体腫瘍摘出術後に脳膿瘍を形成した蝶形骨洞篩骨洞膿胞の1例. 耳喉頭頸 76 (12): 867-870, 2004.

池田麻子, 塩谷彰浩, 磯貝豊, 茂呂和久, 荒木幸仁, 齋藤康一郎, 大久保啓介, 福田宏之, 小川 郁: 咽喉頭異常感症における下咽頭ファイバースコープの有用性. 喉頭 16 (1): 22-25, 2004.

齋藤康一郎, 塩谷彰浩, 大久保啓介, 茂呂和久, 荒木幸仁, 池田麻子, 福田宏之, 小川 郁: 癥痕性喉頭気管狭窄症例の検討 とくに上方充填型Tチューブの有用性について. 日気食会報 55 (3): 229-234, 2004.

佐藤美奈子, 小川 郁, 井上泰宏, 増田正次: HHIA (Hearing Handicap Inventory for Adults) 日本語版を用いた聴覚障害の評価法に関する検討. 日耳鼻 107 (5): 489-493, 2004.

齋藤康一郎, 塩谷彰浩, 大久保啓介, 茂呂和久, 荒木幸仁, 池田麻子, 福田宏之, 小川 郁: 片側性声帯麻痺症例の臨床的観察. 日気食 55 (1): 1-8, 2004.

富田俊樹, 小川 郁, 山口寛, 田川崇正, 藤井正人: 特定機能病院における包括評価が口腔・中咽頭癌診療に与える影響 平成15年度版の検討. 耳鼻展 47 (5): 322-327, 2004.

池田麻子, 塩谷彰浩, 磯貝豊, 茂呂和久, 荒木幸仁, 齋藤康一郎, 大久保啓介, 福田宏之, 小川 郁: 咽喉頭異常感症における下咽頭ファイバースコープの有用性. 喉頭 16 (1): 22-25, 2004.

五島史行, 國弘幸伸, 荒木康智, 齋藤 晶, 小川 郁: ドロップアタックを認めたメニエール病の2症例. 日耳鼻 108 (3): 222-225, 2005.

富田俊樹, 田川崇正, 山口寛, 八幡有紀子, 小川 郁, 田中一郎, 藤井正人: 頬粘膜癌切除術における顎下腺管グラフトを用いた耳下腺管再建. 頸部外科 14 (2): 133-137, 2004.

神崎 晶, 國弘幸伸, 小川 郁: 耳鼻咽喉科・頭頸部外科手術に伴う周術期肺塞栓症について. 頭頸部外科 14 (3): 319-325,

2. 学会発表

・セミナー: 慢性感音難聴の治療戦略と人工中耳・人工内耳 小川郁, 再生医療 2004

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 |

内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築

分担研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部長

研究要旨 内耳性難聴は難治性であり人口の 5%以上が内耳性難聴のためのコミュニケーション障害に悩んでいる。特に高齢者においては加齢変化により約 34%が難聴者である。内耳性難聴の原因の 80%は感覚細胞（有毛細胞）に障害がある。もし有毛細胞を生かせることが可能ならば、内耳性難聴の治療が期待できる。これらの聴力にかかわる社会的問題に対し、内耳機能の再生、維持は国民の健康、医療、福祉の向上、政策医療の観点からも急務であり、欠くことの出来ない問題となっている。このような中で、本研究では実験動物において間葉系幹細胞から分化させた内耳幹細胞を投与し、細胞の着床を含めた network の形成と内耳の機能再生について検討することにより、難治性である内耳性難聴の治療にむけて、間葉系幹細胞より分化した感覚細胞を内耳に投与することにより聴覚機能を回復させることを目的とする。さらに、本研究遂行のために、ヒト骨髄間質細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、細胞寿命の延長を行い、内耳移植モデルを用いた結果に基づき、臨床への探索的研究へ着手する。

A. 研究目的

実験動物において間葉系幹細胞から分化させた内耳幹細胞を投与し、細胞の着床を含めた network の形成と内耳の機能再生について検討する。難治性である内耳性難聴の治療にむけて、間葉系幹細胞より分化した感覚細胞を内耳に投与することにより聴覚機能を回復させることを目的とする。さらに、本研究遂行のために、ヒト骨髄間質細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、細胞寿命の延長を行い、内耳移植モデルを用いた結果に基づき、臨床への探索的研究へ着手する。

B. 研究方法

臍帯血・月経血・骨髄・末梢血由来のヒト間葉系幹細胞を用いる。同時に対象として、従来より蓄積されている骨髄由来のヒト間葉系細胞を用いる。

(1) 内耳性難聴モデルマウスに対する細

胞治療の供給源としてのヒト骨髄間葉系細胞の調整とプロファイリング

分離培養したヒト骨髄間質細胞の性質を細胞表面マーカー、gene arrayを用いたプロファイリングを行い細胞の有する性格を詳細に検討する。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す状態を保つ培養条件、方法等を確認する。

(2) モデルマウスへの移植

同種他家移植モデルの検討方法として、梅澤らにより分離培養されたマウス骨髄由来間葉系幹細胞（KUSA-A1細胞）を他系統マウスへ移植し免疫抑制剤の応用下での骨再生能また免疫寛容についても検討する。

(3) 内耳機能の病理学的評価システム
移植後の内耳における病理組織学的な解析を推進する。光学顕微鏡レベルのみならず、超微形態学的検討も同時に遂行中である。

C. 研究結果

(1) ヒト骨髄間葉系細胞の調整とプロファイリング

ヒト間葉系幹細胞を用いて、細胞表面マーカー、gene arrayを用いたプロファイリングを行い、データベース化した。細胞の有する性格を詳細に検討し、特に骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心筋、神経への分化能に注目してその形質を検討して細胞毎に結果を得た。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す状態を保つ培養条件、方法等を確認することに成功した。

(2) モデルマウスへの移植

同種他家移植モデルの検討方法を行う前段階として、分離培養されたマウス骨髄由来間葉系幹細胞 (KUSA-A1細胞) を同系統マウスへ移植した。

(3) 病理学的評価システム

同系統マウスに間葉系細胞を移植後の内耳における病理組織学的な解析を行うことを進行させている。

D. 考察

これらを基盤に本研究を推進することにより ①有毛細胞が消失した部位に移植された幹細胞が着床することによる、聴力低下のある患者に対する自家ないし同種他家細胞を用いた内耳再生法の確立 ②ヒト骨髄間葉系細胞の寿命延長、分化法の研究から得られる結果に基づくバイオインフォマティクスからの情報の蓄積、それらの方法の安全性、科学性、倫理性の確立することができる。

E. 結論

ヒト骨髄間葉系細胞の調整とプロファイリングを元に、ヒト間葉系幹細胞の特徴をデータベース化し、特に骨、軟骨、脂肪、骨格筋、心筋、神経への分化能に注目してその形質を検討して細胞毎に結果を得た。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す状態を保つ培養条件、方法等を確認することに成功した。さらに、分離培養されたマウス骨髄由来間葉系幹細胞 (KUSA-A1細胞) を同系統マウスへ移植した系において、病理組織学的な解析を行うこ

とを進行させている。間葉系細胞を有毛細胞を生させることが可能ならば、内耳性難聴の治療の細胞移植供給源として期待することができる。

F. 健康危険情報

なし

G. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。ヒト由来細胞を用いた研究に関しては、機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査された。ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている (国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 16 年 12 月追加承認、受付番号 88、平成 16 年 8 月承認、受付番号 89、平成 16 年 8 月承認、受付番号 90、平成 16 年 8 月承認)。医療を前提とした品質管理システムの構築、標準操作手順書の作製、試薬等の受入試験検査、ならびに細菌・真菌・ウイルス等の汚染の危険性排除については、それらの記録、最新技術の反映を含めて検討した。また、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針 (未定稿)」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮している。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター動物実験指針に準拠して研究を実施している。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなっている。

H. 研究発表

論文発表

Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., Umezawa, A., and M

- ukai, K.: Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer letter*, in press 2005
- Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X-K., **Umezawa, A.**, and Kiyono, T.: Immortalization of human fetal cells: The life span of umbilical-cord-blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol. Biol. Cell*, in press. **Correspondence to AU.**
- Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and **Umezawa, A.**: Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, 316: 141-153, 2004
- Umezawa, A.**: Mesenchymal stem cells and epigenetics, *Brain & Development*, 26: 417-418, 2004
- Sakurai, K., Iizuka, S., Shen, J-S., Meng, X-L., Mori, T., **Umezawa, A.**, Ohashi, T., and Eto, Y.: Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice. *Gene Therapy*, 11(19):1475-1481, 2004
- Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., **Umezawa, A.**, Kuroda, M., and Mukai, K.: Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. *Cancer Res*, 64: 3545-3549, 2004
- Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., **Umezawa, A.**, and Mukai, K.: Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer letter*, in press 2005
- 梅澤明弘：遺伝子変異、病理と臨床「病理診断における分子生物学」、22:47-53, 2004
- 梅澤明弘：細胞分離・幹細胞工学、「図解 再生医療工学」第3章 再生医療のキーテクノロジー 技術編5、(株)工業調査会、2004
- 梅澤明弘：書評「絵でわかる 血液のはたらき」(八幡義人著)、*医学のあゆみ*, 209 (2): 115, 2004
- 高橋祐司、細井美彦、梅澤明弘、齊藤英和、入谷明：クローン技術・卵細胞質移植と核移植、産婦人科の世界、増刊号、2004
- 梅澤明弘：再生医療とエピジェネティクス (6章)、「エピジェネティクス」、佐々木裕之編、シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社、2004
- anscriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer letter*, in press.
- Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and **Umezawa, A.**: "Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?", *J Gene Med*, 6(8): 833-845, 2004.
- Higuchi, A., Hamamura, A., Shindo, Y., Kitamura, H., Yoon, B-O., Mori, T., Uyama, T., and **Umezawa, A.**: Photon-modulated changes of cell attachments on poly(spiropyran-co-methylmethacrylate) membranes, *Biomacromolecules*, 5(5): 1770-1774, 2004.
- Kato, Y., Imabayashi, H., Mori, M., Tani, T., Taniguchi, M., **Umezawa, A.**, and Tsunoda, Y.: Developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal: Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Biol Reprod*, 70: 415-418, 2004
- 梅澤明弘：精子形成にかかわるエピジェネティクス、特集「精子」、*Hormone Frontier in Gynecology*, 11 (3): 24-28, 2004
- 梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平：化学工学, 2004
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞を用いた細胞治療、7章再生治療モデル、「ヒト疾患モデルー難病の病態解明と診断・治療への応用」、秦順一編集、文光堂、2004年4月21日
- 梅澤明弘：ヒト幹細胞を用いた再生医療、*昭和医学会誌*, 64 (1): , 2004
- 梅澤明弘：骨芽細胞から神経細胞への分化、*再生医療*, 3 (1): 61-68, 2004
- 梅澤明弘、五條理志：間葉系幹細胞の基礎と臨床、40 (12), *Molecular Medicine*, 2004
- 梅澤明弘、竹田征治：骨髄間質細胞の可塑性、*実験医学*, 22 (1): 12-16, 2004

細胞」国際 (PCT/JP00/001148、平成13年2月28日)

「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」
(PCT/JP00/09323、平成13年12月27日)

出願人：協和醗酵株式会社

(b) 「骨の再生方法」

発明者：梅澤明弘、秦順一、立石哲也、牛田多加志、陳国平

出願日：第251365号、平成13年8月22日

出願人：梅澤明弘、牛田多加志、独立行政法人産業技術総合研究所

(c) 「間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法」

細胞」国際 (PCT/JP00/07741、平成13年11月2日)

「心筋細胞への分化能を有する細胞」 国際

発明者：梅澤明弘、伊澤良兼

出願日：平成14年4月17日

出願番号 特願2002-115201、

出願人：大塚製薬株式会社

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

厚生労働科学研究費助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

薬剤性内耳障害における内耳環境とアポトーシスに関する研究

分担研究 神崎晶、東京電力病院 副科長

研究要旨 細胞移植を含めた難聴治療のタイミングを知るため、内耳性難聴モデルの一つである薬剤性難聴モデル転写因子AP-1の発現について検討した。その結果薬剤投与後から発現を認めた。この結果、内耳の有毛細胞障害が開始されて7日目で治療方針を変更する必要があるのではないかと考えられた。換言すれば、7日目以降は内耳の再生医療が必要になると考えられた。

A. 研究目的

内耳性難聴における有毛細胞の細胞死のメカニズム、タイミング、内耳環境の変化を観察することは細胞移植を含めた治療において臨床的意義は高い。

我々は、内耳再生において再生を阻害している内耳の環境が存在しているのではないかと考えている。

内耳のサイトカインの発現が細胞移植あるいは分化

神経細胞と有毛細胞のネットワークに影響を及ぼすと推測している。転写因子activator protein-1 (AP-1) は従来からサイトカインの調節に強く関与していることが知られている。

今回われわれは薬剤性難聴モデルを用いてAP-1を検討した。薬剤性難聴のメカニズムは現在でも完全に解明されていないが、酸化ストレスが関与していることが知られており、形態的には血管条、有毛細胞を有するコルチ器を中心に障害をきたすことが報告されている。また有毛細胞の障害によって生じた二次的は反応としてらせん神経細胞の変成が生じること知られている。

AP-1はc-fos, c-Junなどから構成されるホモ/ヘテロダイマーであり、脳血管障害や網膜変成などにも関与していることが知られており、内耳アポトーシスにも関与していると考えられる。

B. 研究方法

臨床で現在も用いられるアミノグリコシド薬剤の一つであるカナマイシンを筋注したあと、利尿剤の一種であるエタクリン酸を静注した。聴力正常である白色モルモットに上記薬剤を投与して内耳性難聴モデルを作成した。

薬剤投与後から、直後、12時間、24時間、3日、5日、7日、14日後まで経過を追い、犠牲死させる前にauditory brain stem responses (ABR)

を施行し4, 12, 20 KHzで聴力閾値を測

定し、難聴であることを確認する。内耳を摘出して、ゲルシフトアッセイならびに免疫染色により、AP-1の発現を観察した。また、内耳有毛細胞を含むコルチ器の形態について蛍光顕微鏡を用いて観察した。

C. 研究結果

薬剤投与直後から4, 12, 20 KHzで高度難聴を認めた。AP-1の発現は投与直後より認め、徐々に増大し7日目で発現を強く認めた。これらの反応は、コルチ器、血管条、らせん神経節、と内耳の全てのコンパートメントでAP-1の発現を認めた。形態学的に有毛細胞におけるせん毛の消失も蛍光顕微鏡にて確認された。

D. 考察

内耳環境の整備は、内耳有毛細胞を再生しやすい環境を作るという意味で非常に重要である。通常、内耳性難聴は難治性であり、これは有毛細胞の再生能力が低いことが考えられるが、一方で環境の問題も無視できない。具体的には内耳へ幹細胞を投与した後、細胞の着床・分化に関連すると考えられる。薬剤による内耳障害は投与直後から始まり、内耳感覚細胞のアポトーシスが開始することが判明した。また、現段階ではこれらの治療は開発されていないがこれらの因子を阻害することが治療になりうる可能性を示唆している。また、治療のタイミングとして、本研究からAP-1がピークに達する7日目までに行うというタイムウィンドウが重要であると考えられた。また、興味深いことに薬剤性難聴で認めた変化は同じ急性内耳障害をきたす音響外傷のそれとは異なっていた（これらの反応はすでに論文等で報告している）。急性内耳障害においても様々な変化があること、音響外傷の変化は薬剤性難聴に比べてより早く進行することが判明した。薬剤性難聴の方が治療のタイミングが長いかもしれないと考えられた。

E. 結論

急性薬剤性難聴モデルにおいて転写因子AP-1の上昇が認められた。7日目まで徐々に上昇していくことを観察し、治療や細胞投与のタイミン

グを考察した。

G. 研究発表

1. 論文発表

・総説 内耳有毛細胞の再生とらせん神経変性の予防 神崎晶、小川郁, 再生医療 (in press)

・総説 遺伝性難聴モデルの前庭における検討 神崎晶、Equilibrium Research 62(4)61-68 2004

・ Degeneration and regeneration in auditory system, Degeneration and regeneration in neuron. Kanzaki S, Signpost (in press)

・ Hypertrophic chronic pachymeningitis associated with chronic otitis media and mastoiditis. Kanzaki S et al. ANL 31 155-159 2004

・ Two cases of pulmonary embolism after head and neck surgery. Kanzaki S et al. ANL 31 313-317 2004

1-1. 書籍

・ Curable sudden deafness. Kanzaki J, Kanzaki S. Hearing impairment, Springer 2004 282-286

2. 学会発表

・ 内耳有毛細胞の再生とらせん神経節細胞の変成予防 神崎 晶 再生医療学会 2004年

・ Change of transcriptional factor AP-1 in drug induced hearing loss Kanzaki S, Ogawa K. et al Association for research in Otolaryngology, 2005

・ 薬剤性難聴における転写因子AP-1の変化、神崎晶ら、日本耳科学会 2004年

・ モルモット蝸牛における薬物誘発性聴覚障害に伴う転写因子activator protein-1の変動、長島玲子、神崎晶ら、日本薬理学会 2004年

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 |

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Tomita T, Tanaka K, Shinden S, Ogawa K	Tracheoesophageal diversion versus total laryngectomy for intractable aspiration.	J Laryngol. Otol.	118	15-18	2004
小川 郁	【鼓室形成術 私のコツ・私の工夫】 顔面神経の処理.	ENTONI	36	43-49	2004
小川 郁	【耳閉塞感診断治療update】 聴神経腫瘍と耳閉塞感.	ENTONI	35	37-41	2004
小川 郁	【手術範囲と術式】 聴神経腫瘍	JOHNS	20	1251-1254	2004
五島史行、國弘幸伸、小川 郁	長期間にわたり聴力経過を観察可能であったPaget病症例	Equilibrium Res	63 (3)	194-201	2004
増田正次、井上泰宏、佐藤美奈子、神崎晶、滝口洋一郎、山下大介、栗田昭宏、藤岡正人、小川 郁	純音聴力レベルと聴性定常反応を利用した推定聴力レベルとの比較 聴力正常者を対象にAuderaを用いて.	Audiology Japan	47 (4)	207-213	2004.
藤岡正人、五島史行、國弘幸伸、荒木康智、深谷和正、小川 郁	下垂体腫瘍摘出術後に脳膿瘍を形成した蝶形骨洞篩骨洞嚢胞の1例.	耳喉頭頸	76 (12)	867-870	2004.

池田麻子、塩谷彰浩、磯貝豊、茂呂和久、荒木幸仁、齋藤康一郎、大久保啓介、福田宏之、小川 郁	咽喉頭異常感症における下咽頭ファイバースコープの有用性.	喉頭	16 (1)	22-25	2004
齋藤康一郎、塩谷彰浩、大久保啓介、茂呂和久、荒木幸仁、池田麻子、福田宏之、小川 郁	癒痕性喉頭気管狭窄症例の検討 とくに上方充填型Tチューブの有用性について	日気食 会報	55 (3)	229-234	2004
佐藤美奈子、小川 郁、井上泰宏、増田正次	HHIA (Hearing Handicap Inventory for Adults) 日本語版を用いた聴覚障害の評価法に関する検討.	日耳鼻	107 (5)	489-493	2004
齋藤康一郎、塩谷彰浩、大久保啓介、茂呂和久、荒木幸仁、池田麻子、福田宏之、小川 郁	片側性声帯麻痺症例の臨床的観察.	日気食	55 (1) :	1-8	2004
富田俊樹、小川 郁、山口寛、田川崇正、藤井正人	特定機能病院における包括評価が口腔・中咽頭癌診療に与える影響 平成15年度版の検討.	耳鼻展	47 (5)	322-327	2004
五島史行、國弘幸伸、荒木康智、齋藤 晶、小川 郁	ドロップアタックを認めたメニエール病の2症例.	日耳鼻	108 (3)	222-225	2005
富田俊樹、田川崇正、山口 寛、八幡有紀子、小川 郁、田中一郎、藤井正人	頬粘膜癌切除術における顎下腺管グラフトを用いた耳下腺管再建.	頭頸部 外科	14 (2)	133-137	2004
Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X-K., Umezawa, A., and Kiyono, T. Correspondence to AU.	Immortalization of human fetal cells: The life span of umbilical-cord-blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway.	Mol. Biol. Cell,	16	1491-1499	2005

Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Umezawa, A Correspondence to A U.	Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet.	Cell Tissue Res,	316	141-153,	2004
Sakurai, K., Iizuka, S., Shen, J-S., Meng, X-L., Mori, T., Umezawa, A., Ohashi, T., and Et o, Y.	Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice.	Gene Therapy,	11 (19)	1475-1481,	2004
Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K.	Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression.	Cancer Res,	64	3545-3549,	2004
Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and Umezawa, A. Correspondence to A U.	Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?	J Gene Med,	6(8)	833-845,	2004
Higuchi, A., Hamamura, A., Shindo, Y., Kitamura, H., Yoon, B-O., Mori, T., Uyama, T., and Umezawa, A.	Photon-modulated changes of cell attachments on poly(spiropyran-co-methylmethacrylate) membranes,	Biomacromolecules	5(5)	1770-1774	2004
梅澤明弘	ヒト幹細胞を用いた再生医療	昭和学会誌	64 (1)		2004
梅澤明弘、竹田征治	骨髄間質細胞の可塑性	実験医学	22 (1)	12-16	2004
梅澤明弘、五條理志	間葉系幹細胞の基礎と臨床	Molecular Medicine	40 (12)		2004
梅澤明弘	骨芽細胞から神経細胞への分化	再生医療	3 (1)	61-68	2004
梅澤明弘	書評「絵で分かる 血液のはたらき」	医学のあゆみ	209 (2)	115	2004
梅澤明弘	第1部必要な基礎知識9 遺伝子変異	病理と臨床臨時増刊号	22	47-53	2004

梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平	骨再生・形状システムの構築- 生分解性ハイブリッドシートを用いて。	医学のあゆみ	209 (12)	964-9 67	2004
梅澤明弘	骨をつくるー細胞移植の基盤研究とバイオマテリアルによる臨床応用	医学のあゆみ	209 (12)	929	2004
梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平	再生医療の現状と化学工学への期待	化学工学	68 (8)	414-4 17	2004
梅澤明弘、竹田征二	単離間葉系幹細胞心筋細胞への分化	生体の科学	55 (4)	329-3 33	2004
梅澤明弘	骨髄間葉系幹細胞を用いた再生医療	顕微鏡	39 (2)	84-87	2004
梅澤明弘	精子形成に関わるエピジネティクス	Hormone frontier in gynecology	11 (3)	231-2 34	2004
梅澤明弘	骨髄間葉細胞の現状と展望	治療学	38 (10)	1056- 1060	2004
小室一成、山下潤、桜田一洋、梅澤明弘	「座談会」細胞移植 細胞移植の現状と課題ー基礎から臨床へー	治療学	38 (10)	1133- 1143	2004
Kanzaki S, Inoue Y, Watabe T, Ogawa K	Hypertrophic chronic pathymeningitis associated with chronic otitis media and mastoiditis.	ANL	31	155-15 9	2004
Kanzaki S, Kunihiro T, Imanishi T, Yamashita D, Ogawa K	Two cases of pulmonary embolism after head and neck surgery	ANL	31	313-31 7	2004
神崎 晶	総説 遺伝性難聴モデルの前庭における検討	Equilibrium Research	62 (4)	61-68	2004