

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

急性蝸牛エネルギー不全におけるカスパーゼ阻害薬による難聴阻止効果

研究協力者	水足邦雄	国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚・平衡覚部長
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

急性蝸牛エネルギー不全モデルラットを用いて、その難聴をアポトーシスインヒビターの全身投与にて *in vivo* で改善を試みた。その結果、蝸牛外側壁の線維細胞は保護され、低音から中音域にかけて著明な聴力改善を認めた。また、コントロール群で認められた蝸牛外側壁線維細胞のアポトーシスは完全に防止することができた。カスパーゼ阻害薬が内耳虚血などの急性エネルギー不全による感音難聴の治療に有効である可能性が考えられる。

A. 研究目的

これまで、当研究室においてミトコンドリア機能阻害薬 3-nitropropionic acid (3-NP)を用いた、急性蝸牛エネルギー不全モデルラットを作成し、突発性難聴のモデル動物として病態解明を行ってきた。これまでの研究で、本モデルの病態として蝸牛外側壁のアポトーシスが難聴の出現に大きく関わっていることが示唆されている。本研究ではアポトーシス阻止による難聴に対する効果を解明することを目的とした。

B. 研究方法

Sprague-Dawley ラット (6 週齢、雄)を用いて実験を行った。3-NP の投与はこれまでの報告通り、全身麻酔下に耳後部切開

をおき中耳骨胞を開放、正円窓窩を明視化におき同部に 3-NP をマイクロチューブにて 300mM, 3 μ l 局所投与した。投与後ゼラチンスポンジにて固定をして縫合した。アポトーシスの阻害には、アポトーシスカスケードの下流に位置するカスパーゼを広範に阻害する pan-caspase inhibitor の z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketon (Z-VAD-FMK)を用いた。Z-VAD-FMK は腹腔内から 3 日間連続で全身投与し、3-NP は Z-VAD-FMK 投与 2 日目に局所投与した。コントロールとして Z-VAD-FMK の溶媒である DMSO を用いた。また聴力評価は Auditory Brainstem Response (ABR)にて術前、及び術後経時的に行った。3-NP 投与経時的に全身麻酔下に内耳を摘出し、組織

学的検討を行った。

C. 研究結果

8kHz において、コントロール群では 3-NP 投与手術 2 時間後に約 50dB の難聴を生じ、1 日後に約 70dB でピークとなる。また、その後徐々に聴力は回復し 21 日後にはほぼ術前聴力に回復する。Z-VAD-FMK 投与群では、術後 1 日目のピークが約 50dB と難聴が軽減されており、術後 7 日後には術前聴力に回復した(図 1)。20kHz では、コントロール群は術後 2 時間で約 70dB の難聴となり術後 1 日目に約 85dB とピークとなる。その後緩やかに回復するが、術後 28 日でも約 55dB の難聴が残存する。Z-VAD-FMK 投与群では、術後 1 日目に聴力が約 70dB と難聴が軽減され、術後 14 日目にはほぼ術前聴力に回復する著明な治療効果が認められた(図 2)。40kHz では、両群とも術直後から高度の難聴を呈し、改善傾向もほとんど認められなかった(図 3)。組織学的には、コントロール群では蝸牛基底回転の外側壁の線維細胞に著明な細胞脱落を進行性に認めた。また、TUNLE 染色にて基底回転外側壁らせん靱帯周囲に陽性細胞を認め、同部位には活性型カスパーゼ 3 の発現を認めた。一方 Z-VAD-FMK 投与群では、ほとんど細胞脱落を認めず、また TUNEL 染色も陰性であり、著明な外側壁線維細胞の保護効果を認めた(図 4)。

D. 考察

本モデルでは、これまでの研究で蝸牛外側壁の線維細胞がアポトーシスをきたすことが組織学的に示唆されていたが、今回の

実験でカスパーゼ阻害薬により蝸牛外側壁の線維細胞の阻止効果が認められたことより、本モデルにおける難聴出現のメカニズムに蝸牛外側壁線維細胞のアポトーシスが強く関与している可能性がより明確に示された。また、本実験でカスパーゼ阻害薬の全身投与により難聴の阻止効果も認められたことから、今後安全性や投与時期の検討が必要ではあるが、カスパーゼ阻害薬が内耳虚血などの急性エネルギー不全による感音難聴の治療に有効である可能性が考えられる。

E. 結論

アポトーシスの阻害により急性内耳エネルギー不全による難聴の阻止効果が認められた。また、組織学的には外側壁線維細胞の保護が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

水足邦雄、神谷和作、藤井正人、松永達雄、急性エネルギー不全ラットにおけるカスパーゼ阻害薬による難聴阻止効果、第 15 回日本耳科学会総会学術講演会、大阪、2005 年 10 月 20-22 日

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

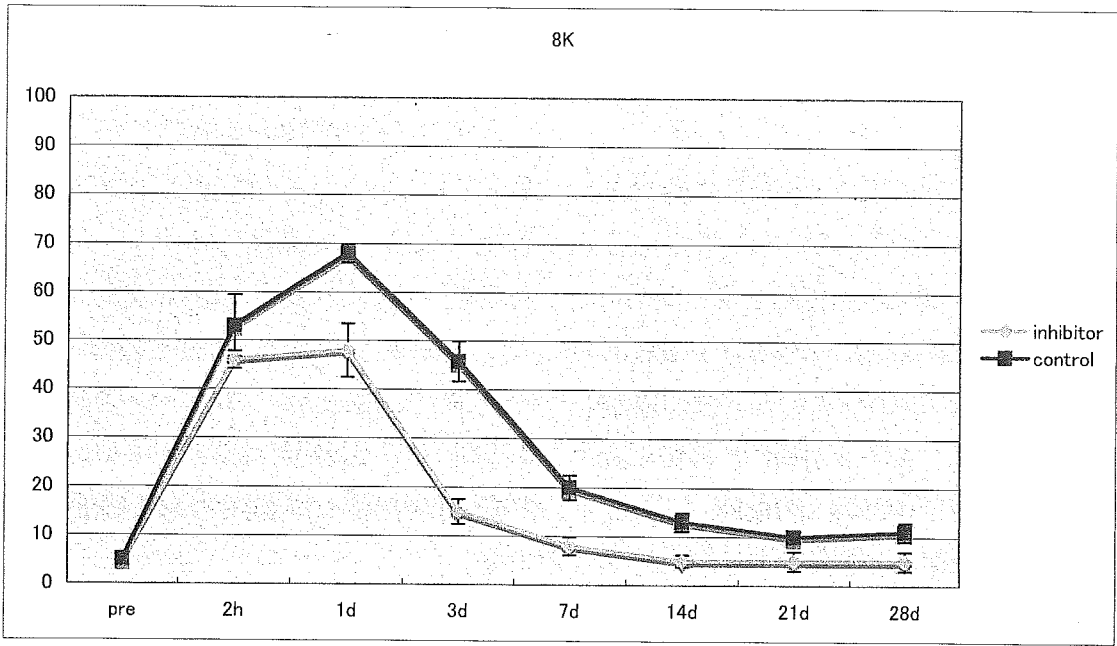


图 1

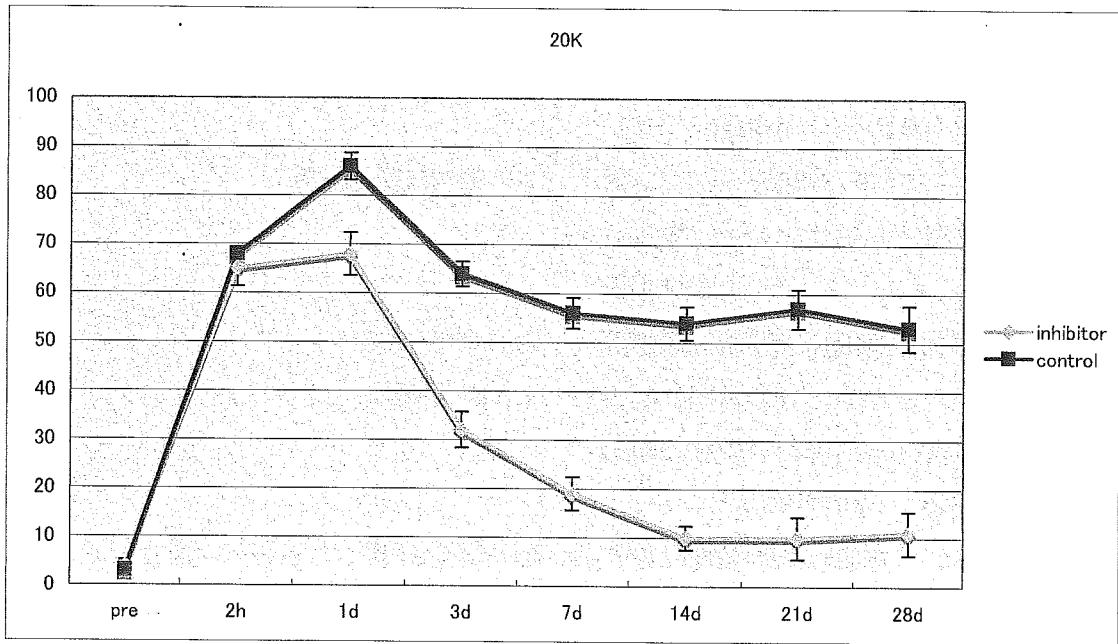


图 2

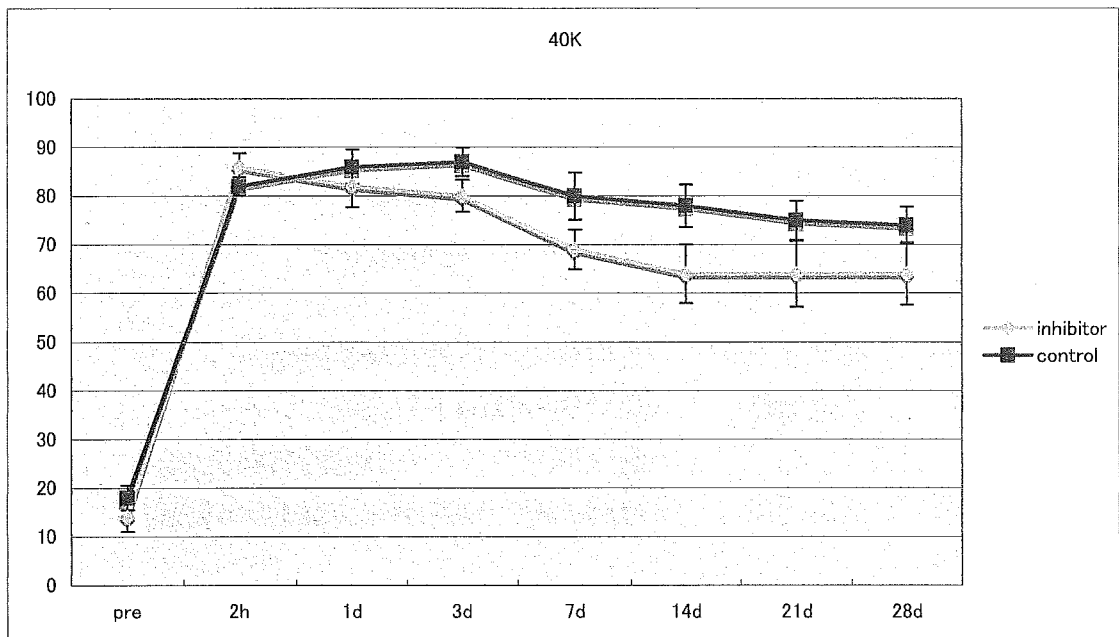


図 3

外側壁における組織変化

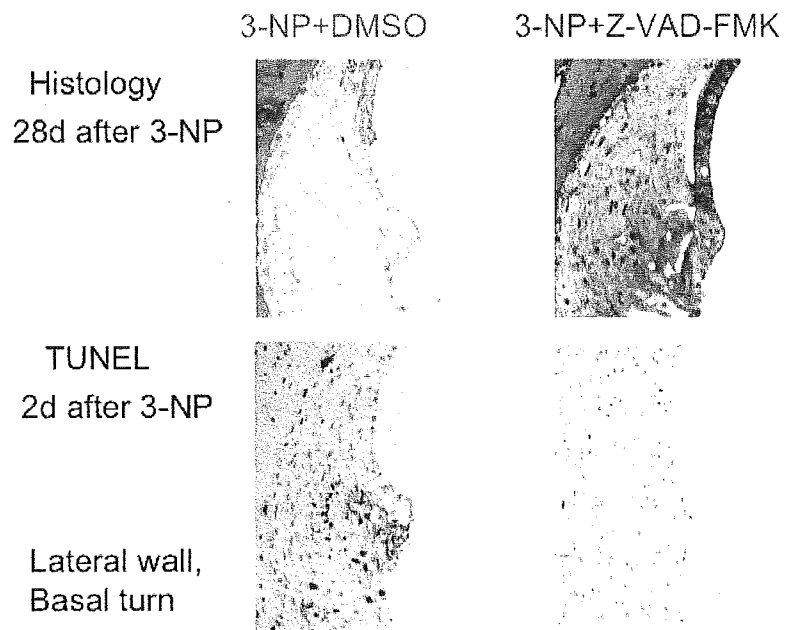


図 4

内耳エネルギー不全モデルによる突発性難聴モデルに対する
アポトーシス阻害剤の内耳保護効果

研究協力者 瀧口洋一郎 北里研究所病院耳鼻咽喉科
主任研究者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター聴覚障害研究室長
分担研究者 小川 郁 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科教授

研究要旨

内耳エネルギー不全モデルに対しアポトーシス阻害剤の内耳保護効果を *in vivo* に検討した。アポトーシス阻害剤には、pan-caspase inhibitor である z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone(z-VAD-fmk)を使用した。投与方法は、モデル動物作成直後・1日後・2日後に経静脈的に全身投与した。その結果、モデル動物作成後聴力はスケールアウトとなったが、低音部では6日目より聴力改善効果をもとめ徐々に聴力改善が得られ20日目にほぼ固定した。一方高音部では改善効果をもとめなかった。本モデルの難聴発現のメカニズムとしてカスペースを介したアポトーシスの関与が示唆された。今後、組織学的検査を行う予定である。

A. 研究目的

突発性難聴は臨床で接する機会の多い疾患であり発生率も10万人に5-15人と報告されているが、今なおそのメカニズムは不明であり治療成績も向上されていない。これまで我々は突発性難聴の病態の一つに内耳エネルギー不全があると考え、ミトコンドリアトキシンを用いた内耳エネルギー不全モデルを作成し、その投与濃度により一過性聴力閾値上昇モデル(TTSモデル)・永久的聴力閾値上昇モデル(PTSモデル)を作り分けることが可能となった。このモデルでは聴力変化が突発性難聴と類似しており、

我々はこのモデルを突発性難聴モデルとして病態解明を行ってきた。これまでの研究でこのモデルの難聴発現の病態として蝸牛外側壁のアポトーシスが考えられており、TTSモデルにおいてアポトーシス阻害剤を全身投与し聴力改善を生じたことが報告された。この報告では、アポトーシス阻害剤をモデル作成1日前・当日・1日後に腹腔内注入し内耳保護効果を得ている。臨床上突発性難聴は発症後より治療開始することや治療薬剤の投与経路は静脈注射が主流であることから、今回我々はPTSモデルに対しアポトーシス阻害剤をモデル作成直後・

1日後・2日後に経静脈的に全身投与しその効果を検討した。

B. 研究方法

動物は、Sprague-Dawley Rat(体重160-200g;6週齢;雄)を用いて実験を行った。PTSモデルは、これまで当研究室での報告通り、ミトコンドリアトキシンである3-nitropropionic acid(3-NP) 500mMをマイクロチューブにて3 μ l正円窓窩に局所投与して作成した。アポトーシス阻害剤はpan-caspase inhibitorであるz-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone(z-VAD-fmk)を用いた。Z-VAD-fmkは3-NP局所投与直後、1日後、2日後にそれぞれ尾静脈より経静脈的に投与した。聴力評価は、Auditory Brainstem Response(ABR)にて、術前及び術後経時的に行った。

なお動物実験に際しては国立病院機構東京医療センター動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

8kHzでは3-NP投与後1日後には聴力がスケールアウトとなったが、6日目より徐々に聴力は改善し、20日目にはほぼ固定された。20kHzでは1日目にスケールアウトになり聴力の改善はみとめられなかった。

D. 考察

PTSモデルでは、3-NP投与後1日目に聴力はABR測定でスケールアウトになり、その後回復しないことが報告されている。このモデルの聴覚域値上昇をもたらす主たる原因は蝸牛外側壁の障害であることが示

されており、その障害発現にアポトーシスが関与している可能性が示唆されている。今回アポトーシス阻害剤としてz-VAD-fmkを用い、8kHzでは6日目より徐々に聴力が回復した。Z-VAD-fmkはアポトーシスカスケードの下流に位置するカスペースを広範に阻害するpan-caspase inhibitorである。この薬剤の投与により聴力が回復したことから、PTSモデルにおける難聴発現のメカニズムとしてアポトーシスの関与が考えられ、またそのアポトーシス誘導にはカスペースが関与していると示唆された。これまで内耳障害モデルに対するcaspase inhibitorの効果を実験として、GM或いはCDDPによる難聴モデルに対し、z-VAD-fmkの内耳局所投与を行い内耳保護効果が得られたとの報告がある。これらのモデルの主たる障害部位が外有毛細胞であると報告されている一方、本モデルの主たる障害部位は蝸牛外側壁であり同部位は血流豊富な部位であるため今回経静脈的な薬剤投与によって効果発現が得られた可能性があると考えられる。一方、8kHzで難聴が残存し20kHzで聴力改善がなかったことより、本モデルの難聴発現のメカニズムとしてカスペースを介さないアポトーシスの関与やネクローシスの関与の可能性のあるものと考えられた。今後組織学的検査を行い障害部位の観察、またTUNELやbcl-2などのアポトーシスに関連した免疫染色を行い、更なる検討を加える予定である。

E. 結論

3-NPによる内耳エネルギー不全モデル

ラットに対し、アポトーシス阻害剤の経静脈的投与による内耳保護効果を *in vivo* に検討した。その結果、低音部では閾値変化の改善をみとめたが、高音部では閾値変化の改善はみとめられなかった。これらの結果より本モデルでの難聴発現にカススペースを介したアポトーシスの関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

急性内耳エネルギー不全による平衡機能障害と有毛細胞特異的変化

研究協力者	水足邦雄	国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚・平衡覚研究部長
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

急性蝸牛エネルギー不全モデルラットにおける平衡障害について観察を行った。その結果 300mM, 500mM の 3-NP 投与にて著明な眼振を認め、高度の平衡障害が示唆された。また、投与 1 週間後に行ったカロリックテストでは、500mM では CP を、300mM では機能の残存が認められた。組織学的には前庭有毛細胞の脱落を認め、本モデルにおける蝸牛障害と異なる病態が明らかになった。

A. 研究目的

当研究室においてミトコンドリア機能阻害薬 3-nitropropionic acid (3-NP) を用いて急性蝸牛エネルギー不全モデルラットを作成し、突発性難聴のモデル動物として病態解明を行ってきた。本モデルでは一部の突発性難聴と同様に、聴覚障害と同時に平衡障害が認められる。本研究ではこのモデルの平衡機能および組織像につき検討した。

B. 研究方法

Sprague-Dawley ラット（6 週齢、雄）を用いて実験を行った。3-NP の投与はこれまでの報告通り、全身麻酔下に耳後部切開をおき中耳骨胞を開放、正円窓窩を明視化におき同部に 3-NP をマイクロチューブに

て 500mM および 300mM、コントロールとして生理食塩水を 3 μ l 局所投与した。投与後ゼラチンスポンジにて固定をして縫合した。平衡機能の評価として赤外線カメラを用いた自発眼振を経時的に測定した。さらに、術後 1 週間で氷水を用いてカロリックテストを行った。3-NP 投与 1 週間後に全身麻酔下に内耳を摘出し、組織学的検討を行った。

C. 研究結果

500mM, 300mM の両者で術後 6 時間をピークとする強い自発性眼振を認め、徐々に減衰し約 3 日間で消失した（図 1）。一方、術後 1 週間後に行ったカロリックテスト（0°C）では 500mM では無反応だが、

300mM では眼振が誘発された（図2）。組織学的には、500mM では卵形嚢、球形嚢、半規管クプラいずれでも高度の有毛細胞脱落が見られ、残存した有毛細胞でも感覚毛の消失が認められた。一方、300mM では軽度の有毛細胞脱落が見られるのみであった（図3）。

D. 考察

500mM では持続的な、300mM では一過性の平衡障害が生じていることを示しており、本モデルの聴覚障害の経過と類似していた。一方、蝸牛では主として線維細胞に傷害が認められたのに対して、前庭内耳では有毛細胞に限局して傷害が認められ、蝸牛とは異なる病態であることが明らかとなった。

E. 結論

急性内耳エネルギー不全により平衡障害が

観察された。その平衡障害は蝸牛と異なり有毛細胞の障害により引き起こされていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

水足邦雄、岡本康秀、小川郁、藤井正人、松永達雄、急性内耳エネルギー不全による平衡機能障害と有毛細胞特異的变化、第64回日本めまい平衡医学会総会、東京、2005年11月24-25日

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

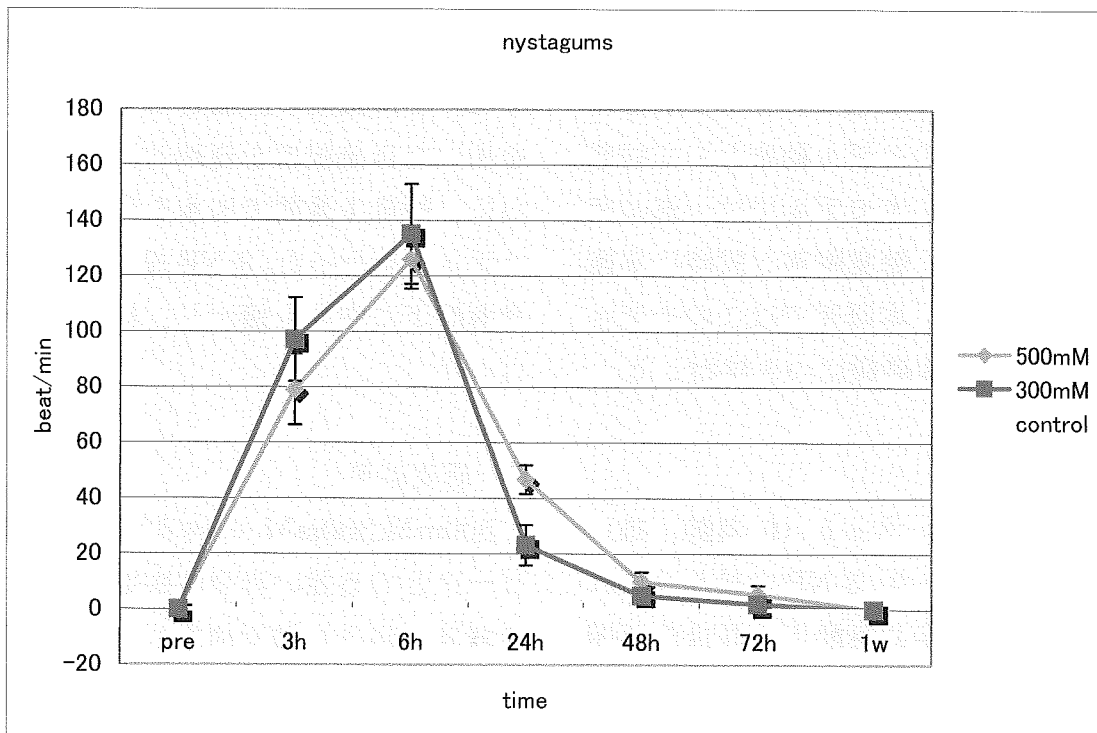


図1

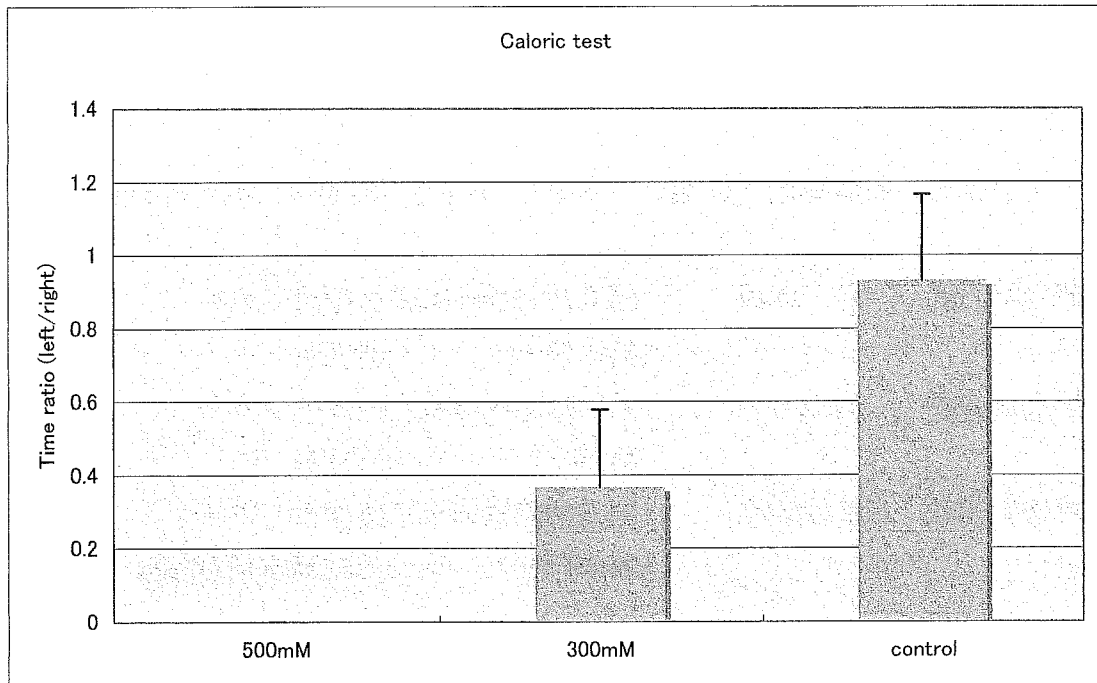
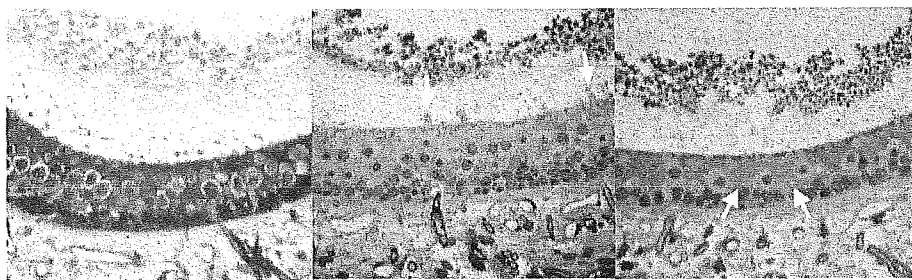


図 2

組織学的所見



control

3-NP300mM

3-NP500mM

球形嚢、術後1週間、×400
EPON812で包埋後トルイジンブルーで染色

図 3

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

骨髄間葉系幹細胞の移植による蝸牛の機能的再構築に関する研究

研究協力者	孫 廣煒	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	幸池浩子	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

培養系を利用して、骨髄間葉系幹細胞（骨髄 MSC）の蝸牛線維細胞への分化、および線維細胞への影響を検討した。骨髄 MSC の Conditioned Medium (CM) の添加により、蝸牛線維細胞の増殖が促進されること、蝸牛線維細胞からの CM の添加により、一部の細胞は蝸牛線維細胞の特異的マーカーを発現することを明らかにした。この結果は、骨髄 MSC 移植による蝸牛の機能的な回復は、骨髄 MSC から蝸牛線維細胞への分化による作用機序以外にも、骨髄 MSC が蝸牛線維細胞の増殖を促進している可能性が考えられる。今後、骨髄 MSC と蝸牛線維細胞との液体因子を介した相互制御機構を解明する。

A. 研究目的

蝸牛線維細胞は内耳液のイオン組成を維持するため、重要な役割を果たしており、さらに難聴の発症、聴力の回復、および聴覚の維持にも大きく関与している（ Science1999: 285: 1408-1411; Neuroreport 2004: 15:1597-1600; Audiol Neurotol 2005; 10: 220-233）。蝸牛線維細胞が高度に傷害された場合には、残された細胞からの再生が期待できないため、移植などにより外部から細胞自体を補う必要がある。蝸牛線維細胞は発生時期において耳胞の周りの間葉系細胞から分化すること

が知られており、間葉系幹細胞 [Mesenchymal stem cell (MSC)] が移植に適している可能性が高いと考えられる。

骨髄間葉系幹細胞（骨髄 MSC）は多分化能を持つ細胞であり、成人の骨髄からでも容易に分離することが可能であり、軟骨、筋肉、脂肪など様々な細胞に分化できることが知られている。さらに、骨髄 MSC は培養により増殖させることが可能で、移植用に必要十分量の細胞を安定に供給できる。当研究室は 3 NP モデルラットの蝸牛に骨髄 MSC を移植したところ、一部の幹細胞は傷害部位に生着した上、分化を示すマー

カーを発現し、聴力においても有意な回復が見られた (Kamiya K. et al, 42nd Workshop on Inner Ear Biology, 2005)。しかし、生着した移植細胞の性質と聴力回復のメカニズムはまだ不明である。

骨髄間葉系幹細胞移植による難聴の再生医療の実現化のためには、*in vitro* で骨髄間葉系幹細胞から蝸牛線維細胞への分化、そして周囲に残存する蝸牛線維細胞にどのような影響を与えるのかを解明することが不可欠である。本研究ではこの点の解明を目的とする。

B. 研究方法

- 1) 蝸牛線維細胞の分離と培養：蝸牛線維細胞は6週齢の C3H マウスから単離し、10%FBS 添加 MEM 培地で培養する。
- 2) 骨髄間葉系幹細胞の分離と培養：6週齢の C3H マウスの大腿骨から骨髄細胞を単離し、10%FBS 添加 RPMI 1640 培地で培養する。4 回継代した細胞は骨髄 MSC として利用する。
- 3) 骨髄 MSC 由来 CM を線維細胞へ添加す

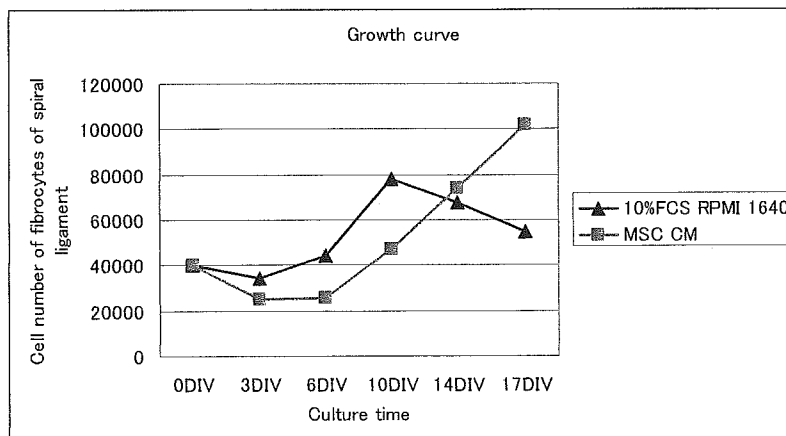
る。線維細胞の増殖能を検討する。

- 4) 線維細胞由来 CM を骨髄 MSC へ添加し、骨髄 MSC の蝸牛線維細胞への分化を検討する。骨髄 MSC(P4) を 10%FBS 添加 MEM 培地で培養する。3 日後、蝸牛線維細胞(P2) から調整した CM を骨髄 MSC に添加し、一週間培養する。

(倫理面への配慮) 全ての処置に置いて動物に苦痛を与えないよう配慮し、国立病院機構東京医療センター動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

- 1) 蝸牛線維細胞は 10%血清存在下で培養すると、細胞増殖を示し、各種類の線維細胞の存在が認められる。
- 2) 骨髄 MSC は蝸牛線維細胞の増殖を促進する。1)と同じ培養条件で培養した蝸牛線維細胞に骨髄 MSC からの CM を添加し、培養後 17 日間、蝸牛線維細胞の増殖はコントロール群と比較して顕著な差が認められた。



3) 蝸牛線維細胞からの液性因子は骨髄 MSC から蝸牛線維細胞への誘導を促進する。P4 の骨髄 MSC は蝸牛線維細胞と同じ培養条件下で三日間培養し、Na-K-ATPase, NKCC1 (タイプ II とタイプ IV 蝸牛線維細胞のマーカ―) 陽性の細胞は存在しなかった。さらに一週間培養することにより、一部の細胞は NKCC1 タンパク質を弱い発現が見られたが、Na-K-ATPase 陽性細胞は見られなかった。一方、蝸牛線維細胞の CM を添加した細胞には、Na-K-ATPase 陽性

細胞が存在し、NKCC1 タンパク質を発現する細胞の数および発現強度も上昇していた。Vimentin は間葉系のマーカ―として利用しているが、蝸牛線維細胞のマーカ―としても認識される (タイプ I, III, IV) 。蝸牛線維細胞の CM 添加した細胞には特に強く発現していた。この結果は、蝸牛線維細胞と同じ培養条件下で培養により、一部の MSC は自発的に蝸牛線維細胞へと分化するが、蝸牛線維細胞 CM の添加により効率よく誘導できることが示唆される。

蝸牛線維細胞マーカ―	3DIV	7DIV	7DIV 蝸牛線維細胞 CM
Na-K-ATPase	—	—	+
NKCC1	—	+	++
Vimentin	+	+	++

D. 考察

障害を受けた内耳では骨髄 MSC を移植することにより聴覚が回復するということが報告されている。今回の研究結果により、骨髄 MSC 移植の効果に二つのメカニズムが考えられる。一つは骨髄 MSC から放出された因子が残存した蝸牛線維細胞の増殖を刺激し、ラセン靭帯を修復するメカニズムであり、もう一つは蝸牛線維細胞から放出された因子が移植された骨髄 MSC を蝸牛線維細胞への分化誘導を促進するメカニズムである。このようにして、失われた蝸牛線維細胞が修復されることにより、内耳液のイオン輸送機構が修復されて、聴覚が回復することが考えられる。今後は、障害を受けた蝸牛線維細胞に対する骨髄 MSC

による保護効果を調べる予定である。

E. 結論

本研究により、骨髄 MSC が蝸牛線維細胞増殖の促進効果を有すること、そして骨髄 MSC は蝸牛線維細胞から放出される因子により、蝸牛線維細胞への分化が促進される可能性が示された。今後、この培養システムを用いて、線維細胞の分化、増殖に必要な因子の同定を試みる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

蝸牛外側壁線維細胞 in vitro 培養系を用いた 2 型線維細胞の増殖分化に関する研究

研究協力者	務台英樹	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員 (財)長寿科学振興財団 リサーチレジデント
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

当研究室において確立された 3NP モデルの病態解析より、蝸牛外側壁に存在する 2 型線維細胞の傷害が、内耳エネルギー不全難聴の主要な原因と判明している。そのため、2 型線維細胞の再生分化機構の解明が、外側壁障害を原因とする難聴疾患の新規治療法開発へと発展することが、強く期待される。本研究では蝸牛外側壁より未分化線維細胞の初代培養をおこない、約 10% の培養細胞が 2 型線維細胞マーカーを発現する、細胞分化誘導系の確立に成功した。現在、2 型線維細胞マーカー発現細胞を分取し、他の細胞種との遺伝子発現の差異を検索することにより、2 型線維細胞の分化関連因子を探索中である。

A. 研究目的

当研究室では現在までに、3NP 動物モデルを用いた研究から、急性内耳エネルギー不全刺激が外側壁線維細胞のアポトーシスを引き起こすこと、主要な傷害は 2 型線維細胞にみられること、またエネルギー不全刺激により、アポトーシスとともに細胞増殖が活性化されること、さらに本細胞の再生に伴って聴覚の回復がおこることも示してきた。本研究は、未だ報告のない、哺乳類蝸牛における 2 型線維細胞初代培養系を確立し、2 型細胞分化の分子基盤を解明することにより、本細胞の損傷部位における速やかな再生治療法を開発することを目的

とする。

B. 研究方法

外側壁線維細胞初代培養：幼若ラットおよびマウス蝸牛蝸牛外側壁を採取し、血管条を除いたものを用いた。組織を 0.1% collagenase I and 0.1% collagenase IV で 37°C 15 分処理し、0.1% DNaseI を加えた後に 1,000 rpm, 5 分遠心し、10% FBS/DMEM 培地内で poly L lysine コートディッシュ上で培養した。継代は細胞が 70-80% コンフルエントに達した時点で行った。また、90% コンフルエントの時点で培地を分化誘導培地へ変更して一週間培養し、4%

paraformaldehydeにて固定後免疫染色に供した。一方、幼若ラット内耳を還流固定後脱灰およびパラフィン包埋し、切片を用いて組織免疫染色に供した。タイプ別線維細胞マーカーとして anti-NaK-ATPase・1 抗体 (Santa Cruz、sc21713) を 1:200 に希釈して使用した。細胞は DAPI により counter staining を行い、一定の条件により画像を取得した。細胞数計測には ImageJ を用いた。

C. 研究結果

7 日齢ラット蝸牛外側壁より採取した Spiral Ligament の初代培養において、増殖性で小型の細胞が多数得られた。増殖条件化では Na, K-ATPase・1+細胞はほとんど見られなかったが、分化誘導条件下で一週間培養すると、 $10.6 \pm 0.52\%$ (N=3) の細胞が Na, K-ATPase・1+であった。

D. 考察

今回、蝸牛外側壁より得た未分化線維細胞より、Na, K-ATPase・1+細胞の、in vitro における分化誘導に成功した。今回用いた抗体は、成熟個体蝸牛外側壁の免疫染色において 2 型および 5 型線維細胞のみを染色した。細胞の外側壁位置により、2 型と 5 型線維細胞を分類する報告もあるが、両者の発現分子に差異はなく、機能的にも同一の細胞と考えられる。また、以前の報告と異なり、今回用いた抗体で 4 型線維細胞は染色されなかった。これは抗体の epitope specificity の違いによるものと考えられる。今回は、polyL lysine コートしたカバーガラス上に単層培養した細胞を免疫染色

し、約 10 視野内に含まれる細胞のみを対象として計測した。各実験で計測した細胞数は 10 の 3 乗オーダーであり、ディッシュ上の培養細胞の均一性に疑問が残る。今後、Flowcytometry を使用し 10 の 6~7 乗の細胞数を解析し、分取した Na, K-ATPase1+細胞の発現遺伝子を解析することにより、細胞の分子性状についての詳細なデータが得られると考えられる。

E. 結論

本研究において、in vitro 条件で未分化の蝸牛外側壁線維細胞より Na, K-ATPase・1+細胞を分化誘導することに初めて成功した。免疫組織化学解析より、この細胞は 2 型線維細胞であると強く示唆される。2 型線維細胞の増殖分化の分子基盤を解明することにより、効果的かつ迅速な外側壁再生法を開発することで、蝸牛外側壁の線維細胞が傷害される、循環障害による突発性難聴などの治療法への応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

成熟マウス・蝸牛外側壁線維細胞のタイプ別細胞分離法の確立

研究協力者	幸池浩子	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	務台英樹	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員 (財)長寿科学振興財団リサーチレジデント
研究協力者	孫 廣煒	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

蝸牛外側壁線維細胞にはタイプ I, II, III, IV, V までの 5 つの細胞タイプに分類され、急性エネルギー不全では II 型細胞が最も障害を受けやすい。我々は II 型細胞を中心として、急性エネルギー不全による難聴の病態を解明するためには、各細胞に特異的な分子メカニズムを解明することが重要であると考え、成熟マウスを用いて外側壁線維細胞の初代培養を試みた。この結果、全てのタイプの線維細胞を含む培養系を確立することに成功した。

A. 研究目的

これまでの研究により、蝸牛外側壁線維細胞は、内耳のイオン環境を維持するために重要な役割を果たしている。ところで、タイプ I からタイプ V まで分類された蝸牛外側壁線維細胞は、各タイプ別の線維細胞の機能に関し、定義づけがほとんどなされていない。これまでの免疫組織化学的な解析により、各タイプ別に特異的な線維細胞のマーカーがいくつか報告されている。本研究では細胞機能の解析ツールの 1 つとして最近注目されているフローサイトメトリ

ーの手法を用い、数少ない線維細胞の表面抗原の特異性を最大限に活用し、タイプ別に分離・濃縮することで、当研究室の急性エネルギー不全難聴モデルをはじめ、既に報告されている外側壁傷害を原因とする難聴モデル動物の難聴の病態をより詳細に解明することが可能と考えられる。以上の研究を実現するために、本研究では成熟マウス・蝸牛外側壁線維細胞の初代培養系を確立し、そのタイプ別細胞分離法の確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) 成熟マウス蝸牛線維細胞の培養

加齢性難聴を発症しない C3H マウス 6 週齢 (♂) の蝸牛を取り出し、実体顕微鏡下で外側の軟骨を丁寧にはずし、そのすぐ内側の外側壁線維細胞を取り出す。取り出した細胞は完全に分散できないため、ある程度分散した状態で、予め用意した type I コラーゲンでコートした 3.5cm ディッシュに 10%FCS 存在下 DMEM 培地で培養する (passage0)。

その後は細胞がコンフルエントになった時点で 0.25%trypsin-EDTA を用い、細胞の継代を行う。

2) 成熟マウス蝸牛線維細胞のタイプ別マーカーの免疫細胞染色

これまでに免疫組織学的な解析により証明されている希少な線維細胞特異的な抗体即ち Na-k-ATPase (タイプ II, IV), NKCC1 (タイプ II, IV), Vimentin (タイプ I, III, IV) を用い、培養中の細胞を染色する。

3) フローサイトメトリーによる細胞の分取を視野に入れた細胞調製法の確立

フローサイトメトリーの手法に基づき、I 型から IV 型までのタイプ別線維細胞の分取を試みようと線維細胞の分散方法を検討した。Trypsin 処理による細胞表面抗原マーカーの剥離を避けるため既製の分散剤をはじめ、collagenase, dispase, papain, などいくつかの分散剤で線維細胞が単一の細胞にできるかどうかを調べた。その結果、

collagenase I で 37°C, 30 分の処理で十分に線維細胞が単一の細胞に分散されることがわかった。

(倫理面への配慮)

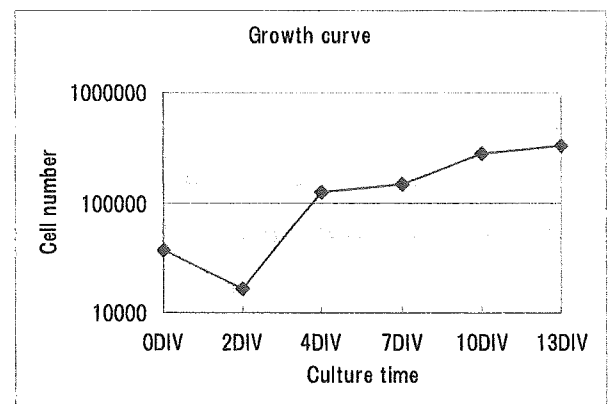
国立病院機構東京医療センター動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) 成熟マウス蝸牛外側壁線維細胞の増殖曲線

DMEM 培地 (10%FBS 存在下) で培養すると線維細胞が分裂増殖を繰り返し、図 1 に示すように線維細胞は培養 7 日目までに培養開始時の 2 倍に増殖し、培養 13 日目には 10 倍近く線維細胞が増殖することが明らかとなった。

図 1



(2) 成熟マウス蝸牛線維細胞のタイプ別マーカーの免疫細胞染色

線維細胞の染色の結果は下記の図 2、図 3 および図 4 に示すように、培養した細胞ではタイプ I からタイプ V までの全てのタイプの細胞が含まれることが示された。これをまとめたのが表 1 である。

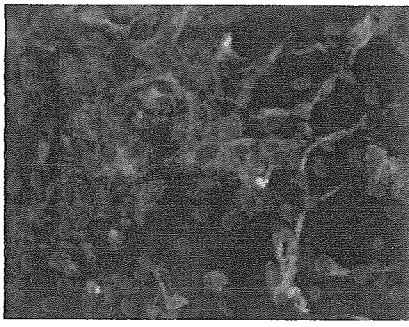


図 2 Na-K-ATPase(Green)/DAPI(Blue)

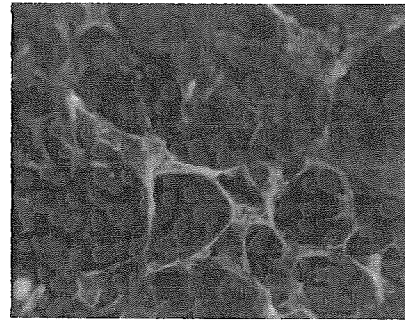


図 3 NKCC1(Green)/DAPI(Blue)



図 4 Vimentin(Green)/DAPI(Blue)

表 1 報告されている蝸牛線維細胞のマーカーのプロファイル (in vivo)

	type I	type II	type III	type IV	今回の結果(in vitro)
Na-K-ATPase	—	+	—	+	+
NKCC1	—	+	—	+	+
Vimentin	+	—	+	+	+

D. 考察

これまでに、Gerbil では蝸牛外側壁線維細胞のタイプ I 線維細胞の初代培養が可能であることは既に報告されている (*Classification and culture of spiral ligament fibrocytes from mice*. Suko et al., *Hearing Research* 140:137-144 (2000)。今回未だ報告されていない成熟マウスにおける蝸牛外側壁線維細胞の初代培養を試みたところ、初代培養に成功し、免疫細胞染色からタイプ I からタイプ V までの全タイプの線維細胞が含まれていることが明らかになった。今後は、フローサイトメトリーの手法に従い、先に述べた線維細胞特異的な

細胞表面抗原を指標に、線維細胞の各タイプの分離を行い、分取したタイプ別の線維細胞の培養系で、3NP 等による急性エネルギー不全の際の傷害と再生の分子機構を解析することにより、各タイプ固有の傷害・再生の分子機構が解明されると期待される。

E. 結論

成熟マウス蝸牛外側壁線維細胞のタイプ I からタイプ V までの全タイプの線維細胞が含まれるような初代培養に成功した。免疫細胞染色の結果から、今回検討した蝸牛外側壁線維細胞特異的な細胞表面マーカーを使用し、細胞を固定せずに生きたままの

状態でフローサイトメトリーによる各タイプ別線維細胞の分離の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし