

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 高 木 太 郎

学位論文名 一過性内耳虚血に対する骨髄単核球細胞の静脈内投与の効果

学位論文の要約

<はじめに>

骨髄単核球細胞は、血管内皮前駆細胞や骨髄間質細胞を含む。これらの細胞は様々な虚血性疾患で局所における血管新生を促進し、組織の修復作用があることが知られている。血管内皮前駆細胞は、血管内皮細胞への分化、血管新生因子の分泌により、虚血局所での血管新生を促す。また、骨髄間質細胞も様々な血管新生因子を分泌する。

突発性難聴の原因はいまだ不明であるが、ウィルス説とともに内耳虚血説が有力である。今回われわれは、突発性難聴治療に対する臨床応用に向けて、この骨髄単核球細胞を用いた内耳障害防御効果を検討した。

<対象および方法>

1. 骨髄単核球細胞の分離抽出法：スナネズミ大腿骨および脛骨から骨髄細胞を取り出し、比重遠心分離法にて抽出した。最終的に一匹あたり $4\sim 5 \times 10^6$ 個の細胞を得た。
2. 一過性内耳虚血負荷：実験動物には雄スナネズミ（8～12 週齢、体重 60～80g）を用いた。前頸部皮膚切開を行い、両側の椎骨動脈を剥離し、絹糸を掛けて牽引することで血流を遮断した。虚血負荷 15 分後に牽引を解除し、血流を再開通させた。
3. 骨髄単核球細胞の静脈内投与：内耳への虚血負荷 15 分後、血流を再開通させた直後に、大腿静脈にカテーテルを留置し、骨髄単核球細胞 ($2\sim 3 \times 10^6$ 個/ml in PBS)、phosphate buffered saline (PBS) のいずれかを 2ml/kg ずつ投与した。
4. 骨髄単核球細胞の局在の評価：分離抽出した骨髄単核球細胞を、蛍光色素 PKH67 にて染色した。PKH67 陽性細胞を静脈内投与し、虚血負荷 4 日目に全身灌流固定を行い、蝸牛を採取した。採取標本で凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡にて観察した。
5. 聴力評価：聴力の評価は聴性脳幹反応（以下、ABR と略）にて行った。虚血前、虚血 1、4、7 日後に沈静下に記録した。刺激には 8000、16000、32000Hz の tone burst 音を用いた。
6. 組織学的評価：虚血 7 日後に蝸牛を採取した。surface preparation 法にてコルチ器を取り

出した。基底回転を摘出し、Rhodamine-phalloidin、Hoechst33342による二重染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し、有毛細胞の脱落割合を算出した。

7. ウェスタンブロット解析：サンプルは摘出した蝸牛を浸漬、細片化し、超音波破砕を加えホモジナイズした後、遠心分離で得られた上清の可溶性蛋白質を用いた。一次抗体として抗GDNF、抗BDNF、抗VEGF、抗Ang1、抗FGF2、抗NT3抗体と反応させ、二次抗体以後はECL Western blotting Kitを用いて施行し、神経栄養因子の発現量を比較検討した。
8. 統計学的検討：ABR 閾値変化および内有毛細胞脱落割合の統計学的検討にはMann-Whitney U testを、ウェスタンブロット解析にはone-way analysis of varianceを用いて有意差検定を行った後、Bonferroni's multiple comparison testにて多変量解析を行った。得られた結果は、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

<結果>

1. 骨髄単核球細胞の局在：PKH67陽性細胞は迷路動脈やらせん動脈の内腔にみられたが、コルチ器や周辺組織への侵入像や融合像はみられず、有毛細胞と置換や融合することはなかった。
2. ABR 閾値変化：虚血前のABR 閾値を0dBとして、ABR 閾値変化について比較検討した。8000、16000Hzにおいては、1、4、7日後いずれにおいても骨髄単核球細胞投与群ではcontrol群と比較して、ABR 閾値の上昇を有意に抑制していた。
3. 内有毛細胞の脱落割合：骨髄単核球細胞投与群とcontrol群において、内有毛細胞の核の消失と聴毛の脱落所見を観察したところ、control群と比較して細胞投与群では内有毛細胞の脱落割合が有意に抑制されていた。
4. 神経栄養因子蛋白の発現：骨髄単核球細胞投与群とcontrol群において、6種類（GDNF、BDNF、VEGF、Ang1、FGF2、NT3）の神経栄養因子の発現を比較したところ、GDNFとNT3の発現が、細胞投与群では有意に上昇していた。

<考察>

今回の実験では、ABR 閾値変化や内有毛細胞脱落割合の結果から、細胞投与群はcontrol群よりも内耳障害が軽微であり、虚血性内耳障害を保護する効果をもつことが確認された。

骨髄単核球細胞による内耳保護作用効果のメカニズムは明らかではない。静脈内投与した細胞はらせん動脈内には確認されたがコルチ器には観察されず、この結果からは投与した細胞がコルチ器内へ沈着し、有毛細胞への分化や細胞融合による保護効果を示した可能性は低いと考えられる。神経栄養因子の発現が内耳において上昇していたことを考えると、骨髄単核球細胞が栄養因子を分泌し、これが障害部位に作用することによって内耳障害を抑制したという機序が最も考えられる。骨髄単核球細胞は神経栄養因子を活性化し、内耳機能保護効果に働いた可能性が推察された。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文：Taro Takagi, Masahiro Okada, Tadashi Yoshida, Ryuji Hata, Naohito Hato, Kiyofumi Gyo and Nobuhiro Hakuba: Intravenous administration of bone marrow mononuclear cells alleviate hearing loss after transient cochlear ischemia through paracrine effects. NeuroReport 2014, 25: 807-813