

氏 名	まつもとまさひろ 松本昌宏
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第3222号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Innervation of stem cell-derived neurons into auditory epithelia of mice (マウス蝸牛上皮への胚性幹細胞由来神経の神経支配)

論文調査委員 (主査) 教授 大森治紀 教授 吉村長久 教授 河野憲二

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】聴覚神経系は人間が外的環境とその変化を感知する上で重要な感覚神経系の一つであるが、種々の外的侵襲に対する脆弱性を有している。特に、聴神経（ラセン神経節細胞）は有毛細胞と共に最も障害を受けやすい部位である。聴神経変性には、①有毛細胞変性に引き続いて二次的に変性する病態（二次的聴神経変性）と②聴神経が一次的に障害される病態（一次的聴神経変性）があるが、いずれの病態においても共通して聴神経が変性するため、この再生をめざすことは聴覚再生研究上、大きな意義がある。そして聴神経再生において最も重要なことの一つは、「再生聴神経と有毛細胞間にシナプス形成が起こりうるか？」という問題である。この点を明らかにするために本研究を実施した。

【予備実験】上記の①の病態については、これまで膨大な研究集積がある。しかし上記②の病態については未だ多くの点が不明であった。そこで下記の予備実験を実施した。ラット聴神経に機械的圧迫を負荷して聴神経障害を作成、一次的聴神経変性を作成した。その後ラットを長期生存させた後、種々の検討を行った。その結果、聴神経が高度変性した後でも有毛細胞は変性せず機能も温存されることが初めて明らかになった（Matsumoto et al., *Exp Neurol*, in press, doi:10.1016/j.expneurol.2007.11.006）。以上のことから、病態②では、有毛細胞は残存しているため移植細胞との間でシナプス形成を促すことよっての聴覚再生を実現できる可能性があることが判明した。したがって、有毛細胞と聴神経共に再生させる必要がある病態①の検討に先立って、本研究では、病態②を想定して実験を行うこととした。

【本実験：方法と結果】哺乳動物においては、聴神経の自己再生は望めないこと、聴神経の内因性幹細胞は得られていないことから、外部から細胞を導入する細胞移植法を取った。移植細胞としては高い増殖能と分化能を有する胚性幹細胞（以下ES細胞）を使用した。はじめにGFP発現マウスES細胞を胎生期マウス頭蓋骨由来間葉系細胞PA6と共培養してES細胞から神経組織を誘導した（SDIA法）。この誘導ES細胞由来神経細胞をICRマウス有毛細胞 explant と共培養することによって、両者の間でシナプス形成が生じうるかを検討した。その結果、ES細胞由来神経細胞から多数の神経突起が有毛細胞方向に伸長し有毛細胞の基底部分や基底外側に接する所見を認めた。その走行様式は、側枝が内有毛細胞と接するものと外有毛細胞間に入って外有毛細胞間を走行するものがあった。これらは聴神経の正常走行様式に近似したものであった。さらにはES細胞由来神経終末にsynaptophysin陽性所見を認めた。以上のことから、神経突起と有毛細胞間にシナプス形成が起こっていることが強く示唆された（Matsumoto et al., *NeuroReport* 16:787-790, 2005）。

【結論と考察】ES細胞由来神経突起が有毛細胞とシナプス形成する可能性がはじめて示された。これは、ES細胞が聴神経再生のための有力な移植細胞の候補となり得ることを示している。また、現在、人工内耳（cochlear implant）は広く実施されて多くの難聴者を救済しているが、聴神経数が極端に減少している患者にはその適応がない。この点からも聴神経再生は人工内耳の適応を拡大する可能性があり、聴覚再生医学上さらに検討を推進すべき課題である。

論文審査の結果の要旨

感音難聴は有毛細胞やラセン神経節細胞の変性によって引き起こされるが、特にラセン神経節細胞障害による難聴は補聴器や人工内耳による効果が乏しいという問題点がある。この問題点を克服するために細胞移植によるラセン神経節細胞再生を目指した。この時に最も重要なことの1つは「移植細胞と有毛細胞間にシナプス形成が起こりうるか」という問題である。申請者はこの点を明らかにするために本研究を実施した。

移植細胞としては、高い増殖能を持ち神経への誘導方法が確立しているマウス胚性幹細胞（ES細胞）を使用した。はじめにES細胞から神経組織を誘導し、このES細胞由来神経を幼若マウスから取り出した蝸牛感覚上皮と共培養した。その結果、ES細胞由来神経は有毛細胞へ多数の神経突起を伸長した。また有毛細胞基底部に付着したES細胞由来神経終末においてシナプス小胞のマーカの発現を認めた。透過電子顕微鏡による観察では、ES細胞由来神経終末に小胞様構造を認め、有毛細胞基底膜に接する部分に高い電子密度を認めた。以上のことからES細胞が有毛細胞とシナプス形成する可能性が示された。これは、ES細胞がラセン神経節細胞再生のための移植細胞の候補となり得ることを意味する。

以上の研究はES細胞の有毛細胞とのシナプス形成能力の解明に貢献し、ラセン神経節細胞再生の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成20年2月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。