TGF-alpha のマウス卵形囊感覚上皮に対する効果

— 7 日間器官培養を用いて —

山下 裕司

Effect of TGF-alpha on Mice Sensory Epithelia after Culturing Utricles for 7 Days

Hiroshi Yamashita

Department of Otolaryngology, Yamaguchi University School of Medicine

Using autoradiography with ^3H -thymidine, the effect of transforming growth factor (TGF)-alpha was studied after culturing utricles of mice for 7 days. Cell proliferation was induced in the sensory epithelium by TGF-alpha. Compared with utricles cultured for 3 days, many labeled cells were detected in the hair cell layer of the sensory epithelium of utricles cultured for 7 days. These observations suggest that stimulation of the EGF receptors by TGF-alpha binding stimulates cell differentiation as well as cell proliferation in the mature mammalian vestibular sensory epithelium.

Key words: TGF-alpha, hair cell regeneration, cell proliferation, mouse utricle, organ culture

はじめに

内耳感覚細胞は、種々の疾患や音響障害、薬物障害、加齢等により障害を受けることが知られている。ここ数年の研究により、両生類、魚類、鳥類においては、音響負荷やアミノグリコシド系抗生剤による障害後に、失った感覚細胞が再生してほぼ完全に置き替わることが明らかになってきた^{1)~6)}。再生した感覚細胞は、形態学的に成熟した感覚細胞に類似するばかりでなく、機能的にも回復することが確認されている^{7)~9)}。

一方、哺乳動物においては、成熟した前庭感覚上皮において、感覚細胞の再生能力が極くわずかであるが備わっていることがわかってきた。成熟したモルモットの卵形囊の培養を用いた実験

により、アミノグリコシド系抗生剤の負荷後に前庭感覚上皮内に新たな細胞増殖が生じることが報告された¹⁰⁾。また、走査電顕による研究においても、ゲンタマイシンの投与後4週間のモルモット卵形囊に未熟な感覚毛をもつ細胞を認めている¹¹⁾。しかしながら、 ^3H -thymidine を用いた *in vivo* の実験において、ゲンタマイシン負荷後においてもモルモット卵形囊感覚上皮内には極くわずかの陽性細胞しか認められなかった¹²⁾。このことは、哺乳類においては薬剤負荷後においても、前庭感覚上皮において極くわずかの再生能力しかないことを示している。

これらのことより、哺乳動物において内耳感覚細胞の再生を促進させるためには何らかの成長因子が必要と考え、既に次の実験を施行し若干の知見を得ている。成熟マウスの卵形囊の器官培養を用い、種々の成長因子を検討した結果、transfor-

ming growth factor (TGF)- α 及び epidermal growth factor (EGF) に、卵形嚢感覚上皮において支持細胞の細胞増殖を促進する結果を得た¹³⁾。EGF と TGF- α では、TGF- α のほうがその効果が強く認められた¹³⁾。ただ、この検討では3日間の培養を用いたため、TGF- α の細胞増殖を促進する効果については検討できなかったが、その後の細胞分化については検討できないため、今回の検討では、培養期間を7日に延長して検討した。器官培養は非常に有用である反面、長い期間培養すると形態が変化し検討が困難になることが多い。今回の検討では、7日間の培養でもよく形態が保たれたマウス卵形嚢の培養に成功し、更にTGF- α の効果についても新たな知見を得たので、ここに報告する。

対象と方法

18匹のマウス (Swiss Webster, 20–15 g) を用いた。エーテル麻酔下にマウスを断頭し卵形嚢を無菌下に摘出した。

培養の方法については、ニワトリの卵形嚢の培養法¹⁴⁾ に準じて施行した。単離したマウス卵形嚢を 24-well tissue culture plate に浮遊させて培養した。培養液として、Earle's Balanced Salt Solution (Gibco) を加えた Basal Medium Eagle (Gibco) を用いた。この培養液に 0.5% D-glucose (Gibco) と 0.1% fetal bovine serum (FBS, Gibco) を加えたものを、コントロールとした。3日間の器官培養においては、TGF- α の濃度が 50 ng/ml のときにマウス卵形嚢感覚上皮において細胞増殖に対する効果が大きくなることを既に報告しており¹³⁾、今回の7日間の器官培養においては、TGF- α の濃度を 50 ng/ml に設定した。50 ng/ml TGF- α (Collaborative Biomedical Products) 及び 5 μ g/ml insulin (Sigma) を加えたものを成長因子のグループとした。

細胞増殖のマーカーとして、1 μ Ci/ml ³H-methyl-thymidine (Amersham) を培養の最初から加えた。5% CO₂ incubator, 37°C で培養した。既に報告している3日間の培養においては¹³⁾、培養液を交換せず施行したが、7日間の培養では、3日目に培養液を半分交換した。

培養が終了した卵形嚢は、3.5% glutaraldehyde で固定した後、1% O₃O₄ にて後固定した。

脱水後 Spurr's epoxy resin に包埋した後、3 μ m 連続切片を作成した。切片を通常のオートラジオグラフィー法にて処理した後¹⁴⁾、トルイジンブルーにて染色し、一卵形嚢あたりの陽性細胞数を計算した。その際、支持細胞層 (SL) における陽性細胞と感覚細胞層 (HL) における陽性細胞をあわせて計測した。そのうえで、既に報告している3日間の器官培養の結果と比較検討した。

結 果

コントロール群の卵形嚢を図1に示す。7日間培養においても形態は良く保たれ、耳石、感覚細胞の感覚毛も確認できた。したがって、この培養法にて、FBS の濃度を0.1%に設定しても、良好な形態を有する卵形嚢を得ることができ、今後、成長因子やその他の再生に関する研究に広く応用できるものと考えた。

TGF- α を加えた群の卵形嚢を図2に示す。TGF- α 群では、³H-thymidine 陽性細胞を感覚上皮内に認めた。陽性細胞は、支持細胞層 (SL) に多く認められたが、感覚細胞層 (HL) にも認められた。また、いくつかの陽性細胞は、感覚細胞に類似しているものも認められた (図2)。このような細胞は、3日間の器官培養にては認められなかった。

一卵形嚢あたりの ³H-thymidine 陽性細胞の個数を、既に報告している3日間培養のコントロール群と TGF- α 群とともに、7日間培養のコントロール群、TGF- α 群の4群について図

図1 コントロール培養液のなかで7日間培養したマウス卵形嚢

耳石、感覚細胞、感覚毛を認め、形態は非常に良好である。³H-thymidine で標識された細胞は認めない。

3に示す。コントロール群と TGF- α 群は、3日間及び7日間の器官培養とも1%の危険率で有意差を認めた (Student's t-test)。また、TGF- α 群に関しては、3日間と7日間の器官培養群間において5%の危険率で有意差を認めた (Student's t-test)。

また、それぞれの陽性細胞の存在場所を、感覚細胞層 (HL) と支持細胞層 (SL) に分けて計算した結果を図4に示す。TGF- α 群において

図2 50 ng/ml TGF- α を加えて7日間培養したマウス卵形囊

感覚細胞層 (HL) に一個、支持細胞層 (SL) に一個 ^3H -thymidine に標識された細胞を認める。感覚細胞層 (HL) に認めた陽性細胞 (矢印) は、感覚細胞に類似している。

は、3日間の器官培養では、陽性細胞の11.3%のみ感覚細胞層に認めたのに対し、7日間の器官培養では、陽性細胞の内33.7%の細胞が感覚細胞層に認められた。両者間については、5%の危険率で有意差を認めた (Student's t-test)。

考 察

TGF- α は、腫瘍組織、胎児組織、マクロファージ等に存在し、EGF と生物学的作用はほぼ同じであり、上皮系、あるいは、一部の非上皮系細胞の増殖を促進する。TGF- α は、EGF-receptor に結合し、DNA 合成や mitosis を促進する¹⁵⁾。内耳においては、マウスの胎児の耳胞の上皮に TGF- α の存在することを、in situ hybridization を用いて報告されている¹⁶⁾。これらのことから、TGF- α が内耳の感覚上皮において細胞分裂を誘発することは十分に考えられる。しかしながら、他の報告にも認められるように^{10) 12) 17)}、成熟した哺乳動物では、前庭感覚上皮において、薬剤障害後においても細胞増殖の能力が非常に低い。ニワトリなどの鳥類と比べると比較にならない程、哺乳動物の内耳感覚上皮の再生能力は低いと思われる。この種差の原因が何であるかを研究することは、哺乳動物における内耳感覚細胞の再生を可能にする回答を与えてくれると考えられるが、仮説としては、次のことが考えられる。まず、一つの可能性としては、哺乳類にお

図3 各群における、一卵形囊あたりの、 ^3H -thymidine により標識された感覚上皮内の全陽性細胞数の平均と標準偏差 (SD)

3日間培養及び7日間培養とも、コントロール群と TGF- α 群間で有意差を認めた ($p < 0.01$)。また、TGF- α 群に関しては、3日間と7日間の器官培養群間において有意差を認めた ($p < 0.05$)。このことは、培養3日目以降においても、器官培養中において新たな細胞増殖が行われていることを示している。n: 卵形囊数

図4 各群において、感覚細胞層（HL）と支持細胞層（SL）に認められた標識細胞数

3日間、TGF-alphaを加えて培養した卵形嚢では、平均11.3%の細胞が感覚細胞層に認められた。一方、7日間、TGF-alphaを加えて培養すると、33.7%の標識細胞が感覚細胞層に認められた。

いて内耳感覚上皮に何らかの再生に必須な因子が欠乏していること。また、もう一つの可能性として、因子が存在しても（成長因子等）、それに対する receptor が欠如している可能性がある。実際、本実験においても、TGF-alpha の効果がそれほど大きくないのは、TGF-alpha に対する receptor すなわち EGF-receptor が欠如もしくは、非常に少ない可能性がある。したがって、今後の研究として、胎生期、成熟期における成長因子の有無及び分布の変化や、その成長因子の receptor の存在の有無や、内耳障害前後における変化を検討する必要がある。この検討によって、哺乳動物においても、内耳の感覚上皮の再生が可能となることを期待したい。

本実験において、薬剤障害等の負荷を与えなかったのは、次の理由からである。Neomycin 負荷後にマウスの卵形嚢を培養した報告において¹⁷⁾、TGF-alpha の効果として同じく ³H-thymidine を指標として検討しているが、陽性細胞数が本研究より少なく、また、一臓器あたりの陽性細胞数にばらつきが多い。これほど、ばらつきが大きいと、先に我々が報告しているように¹³⁾、成長因子の有効性を決定するための有意差検定が困難なばかりか、各成長因子の最も効果の大きい濃度（至適濃度）の設定が困難である。従って、本研究は、陽性細胞の一臓器あたりのばらつきが非常に少なく、成長因子等の細胞増殖における効果を判定するには、適した方法と考える。しかしながら、in vivo の実験では、実際にほとんど細胞増殖が

認められないため、哺乳動物においては薬剤負荷モデルで研究する必要があると考える。

今回の検討で、7日間の培養において陽性細胞数が増加したばかりでなく、感覚細胞層における陽性細胞数が増加したことは、培養中に支持細胞層において増殖した細胞が感覚細胞層に移動していることを示している。またこのことより、本実験が、支持細胞から増殖した細胞が感覚細胞にどのように分化していくかを研究するのに適していると考えられる。また、実際に7日間の培養卵形嚢に、感覚細胞に類似した陽性細胞を認めたことは、TGF-alpha が細胞の増殖ばかりでなく、分化にも関与していることを示唆している。

まとめ

今回、成熟マウスの卵形嚢の器官培養を7日間行った。³H-thymidine を指標として、前庭感覚上皮の細胞増殖に対する TGF-alpha の効果を判定した。その結果、TGF-alpha は、前庭感覚上皮の細胞増殖を誘発する効果を認めた。また、3日間の器官培養と比較検討することにより、細胞の分化についても効果のあることが推定された。本方法は、これら成長因子等の効果を判定するのに、優れた方法であると考えた。

稿を終えるにあたりご校閲を賜った山口大学耳鼻咽喉科 高橋正紘教授に感謝致します。実験のご指導を賜った米国ワシントン大（シアトル）耳鼻咽喉科 E. C. Oesterle 博士に感謝致します。

文 献

- 1) Cotanche DA: Regeneration of hair cell ciliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hear Res* 30: 181-196, 1987
- 2) Corwin JT, Cotanche DA: Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240: 1772-1774, 1988
- 3) Ryals BM, Rubel EW: Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* 240: 1774-1776, 1988
- 4) Cruz RM, Lambert PR, Rubel EW: Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 1058-1062, 1987
- 5) Henry WJ, Makaretz M, Saunders JC, et al: Hair cell loss and regeneration after exposure to intense sound in neonatal chicks. *Otolaryngol Head Neck Surg* 98: 607-611, 1988
- 6) Weisleder P, Rubel EW: Hair cell regeneration after streptomycin toxicity in the avian vestibular epithelium. *J Comp Neurol* 331: 97-110, 1993
- 7) Hashino E, Tanaka Y, Sokabe M: Hair cell damage and recovery following chronic application of kanamycin in the chick cochlea. *Hear Res* 52: 356-368, 1992
- 8) Duckert LG, Rubel EW: Morphological correlates of functional recovery in the chicken inner ear after gentamycin treatment. *J Comp Neurol* 331: 75-96, 1993
- 9) Marean GC, Burt JM, Beecher MD, et al: Hair cell regeneration in the European starling (*Sturnus vulgaris*): recovery of pure-tone detection thresholds. *Hear Res* 71: 125-136, 1993
- 10) Warchol ME, Lambert PR, Goldstein BJ, et al: Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science* 259: 1619-1622, 1993
- 11) Forge A, Li L, Corwin JT, et al: Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 259: 1616-1619, 1993
- 12) Rubel EW, Dew LA, Roberson DW: Mammalian vestibular hair cell regeneration. *Science* 267: 701-703, 1994
- 13) Yamashita H, Oesterle EC: Induction of hair cell proliferation in mammalian inner-ear sensory epithelia by transforming growth factor α and epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3152-3155, 1995
- 14) Oesterle EC, Tsue TT, Reh TA, et al: Hair-cell regeneration in organ cultures of the postnatal chicken inner ear. *Hear Res* 70: 85-108, 1993
- 15) Derynck R: Transforming growth factor alpha. *Cell* 54: 593-595, 1988
- 16) Wilcox JN, Derynck R: Development expression of transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus. *Mol Cell Biol* 8: 3415-5422, 1988
- 17) Lambert PR: Inner ear hair cell regeneration in a mammal: identification of a trigger factor. *Laryngoscope* 104: 701-718, 1994

(原稿到着：平成7年4月28日
別刷請求先：山下裕司
〒755 山口県宇部市大字小串1144
山口大学医学部耳鼻咽喉科学教室)