

厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー研究事業

内耳有毛細胞の再生による高度感音難聴
の治療に関する研究

平成13年度総括研究報告書

平成14年3月

主任研究者 伊藤 壽一
(京都大学大学院医学研究科)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成14年 3 月 30日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所 〒603-8054 京都市北区上賀茂桜井町15
グラン・シティオ北山通り式番館504号
研究者 氏 名 伊藤 壽一
生年月日 1950年 4 月 1日生

平成13年度厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー研究事業）に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：内耳有毛細胞の再生による高度感音難聴の治療に関する研究
(H13-感覚器-002)

国庫補助金精算所要額：金 20,000,066円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク
(別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添4のとおり)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6のとおり)

目 次

I. 総括研究報告

内耳有毛細胞の再生による高度感音難聴の治療に関する研究 ----- 1
伊藤壽一

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 6

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 9

内耳有毛細胞の再生による高度感音難聴の治療に関する研究

主任研究者 伊藤壽一 京都大学大学院医学研究科

研究要旨

人工的に内耳有毛細胞を再生することを目的とし、自発的再生誘導に関する研究、幹細胞移植に関する基礎的研究、これらをサポートする内耳薬剤投与方法の開発に関する研究を行い、接着分子、細胞周期制御タンパクが関与し、神経幹細胞を中心とした幹細胞が内耳移植細胞として高い潜在能力を有することが判明した。

分担研究者 内藤 泰 講師
村井紀彦 助手
金丸眞一 助手
中川隆之 助手
京都大学大学院医学研究科

A. 研究目的

本研究の目的は、聾者を含めた高度難聴者の聴覚の回復を目指した基礎研究および臨床応用を行う事である。

現在我が国には補聴器も使用できない高度難聴者および聾者が数十万人存在し、コミュニケーションは聴覚以外の方法—筆談、手話などに頼っている。このような高度難聴の原因は、内耳および中枢聴覚路の老化、騒音による障害、抗生物質や抗癌剤などの種々の薬物による障害など多岐にわたる。これらの高度難聴者に対しては人工内耳という治療手段はあるが、必ずしも満足できるものではない。感音難聴の原因は様々であるが、病態としては、大部分が内耳の感覚細胞（有毛細胞）の障害である。感覚細胞の再生が可能となれば、一度喪失した聴覚の再獲得も可能と思われる。

従来、内耳感覚細胞を含め、哺乳類の中枢神経系は一度障害を受けると再生は困難とされてきた。しかし、最近では障害を受けた哺乳類の中枢神経系でも条件さえよければ再生する系もあるという報告がある。さらに胚性幹細胞や神経幹細胞の分離が可能となり、神経

移植のドナーとして利用し、障害を受けた中枢神経系の再生を試みる報告もある。また、各種神経成長因子を中枢神経系に投与し、障害を受けた中枢神経系が修復されたとする報告もある。

本研究では、まず動物を用い、各種神経成長因子や幹細胞を利用して、障害を受けた内耳有毛細胞や中枢聴覚路の再生を試み、再生の可能性と安全性を確認した上でその技術を臨床に応用する予定である。

B. 研究方法

(1) 内耳有毛細胞、神経細胞の自然再生：

分子生物学的研究に適した実験動物であるマウスを用いた内耳有毛細胞、らせん神経節細胞の障害モデルを作製し、再生への起点となりえるタンパクに関する解析を行った。標的となるタンパクとして、接着分子であるカドヘリン、カテニンおよび細胞周期制御タンパクであるp27に関する研究を行った。

(2) 胎児組織移植による内耳、中枢聴覚路の再生、生存促進：

内耳および中枢聴覚路の再生、生存促進を目的として、それぞれの器官への胎児中枢由来の組織および細胞の移植に関する実験を行った。中枢聴覚路には、胎児脳組織の移植を行い、その再生に与える影響を神経トレーサーを用いて検討した。内耳については、胎児脳から採取した神経幹細胞を内耳の外リンパ腔に移植し、その分化と栄

養因子の分泌に関する解析を行った。

(3) 神経栄養因子を含めた薬物の
内耳投与：

種々の神経栄養因子や細胞増殖因子が内耳における細胞増殖、細胞生存に関与することが明らかにされているが、臨床応用を考慮した場合の最大の問題点はその投与方法にある。この問題に関して、我々は生体吸収性徐放ジェル
の応用が最も可能性の高い方法と考え、脳由来神経栄養因子 (BDNF) および活性酸素消去酵素 (SOD) に関する生体吸収性徐放ジェルの開発を行った。また、全身投与でも効果が期待できるレシチン化SODの内耳保護効果について組織化学的に検討した。

(4) 幹細胞内耳移植による内耳有毛細胞の再生：

内耳有毛細胞の細胞移植による再生を目的とし、神経幹細胞および胚性幹細胞の内耳移植に関する研究を行った。(1)にて開発したマウス内耳障害モデルをレシピエントとし、マウス胎児脳由来の神経幹細胞およびマウス胚性幹細胞をドナー細胞とし、内耳への移植を行い、その分化に関して免疫組織化学的解析を行った。

(5) 内耳由来幹細胞：

ラット胎性期の内耳組織から、内耳幹細胞の分離、培養に関する研究を行い、細胞の性質に関して分子生物学的解析を行った。

C. 研究結果

(1) 内耳有毛細胞、神経細胞の自然再生：

これまで内耳障害モデル動物としては、内耳の易傷害性からモルモットおよびチンチラが汎用されてきた。一方、マウスは内耳の外科的取り扱いの困難さと内耳毒物に関する抵抗性から敬遠されてきた。しかし、分子生物学的解析や細胞移植を考慮した場合、マウスモデルは不可欠となる。そこで、マウス内耳に対する外科的アプローチ方法を開発し、蝸牛、前庭感覚上皮の細胞死が惹起されるモデルを開発した。このモデルを用い、感覚上皮の傷害過程および組織修復過程におけるE-cadherin、 β -cateninの発現様式の変化を観察したところ、細胞死の出現に伴い、これ

らの分子は発現が低下し、組織修復とともに回復することが判明した。さらに、注目すべき点として、細胞増殖の制御に深く関与する β -cateninが感覚上皮の傷害に伴い、支持細胞の核に集積する像が観察された。内耳感覚上皮の発生で重要な役割を果たすことが知られている細胞増殖制御因子であるp27については、正常感覚上皮では支持細胞にその発現が認められたが、感覚上皮における細胞死誘導後、その発現が減少することが判明した。

(2) 胎児組織移植による内耳、中枢聴覚路の再生、生存促進：

胎児脳組織を傷害を与えた中枢聴覚伝導路に移植することにより、聴覚機能が回復しうることが組織学的、電気生理学的に明らかとなった。また、神経幹細胞を内耳外リンパ腔に移植したところ、これらの細胞は生着し、グリア細胞に分化しうることが判明し、これらの細胞は神経栄養に係わる因子を分泌していることが示唆された。

(3) 神経栄養因子を含めた薬物の
内耳投与：

BDNF、SODの2週間徐放が可能
なジェルを開発した。これまでに
in vitroでの徐放に関する解析を
終了し、現在内耳組織およびその
機能に対する保護効果を検討して
いる。同時に遺伝子の内耳導入に
用いるプラスミドに関する徐放
ジェルも開発し、内耳への遺伝子
導入に関する効果を組織学的に
検討している。全身投与でも十分
な生物学的半減期が期待できる
レシチン化SODの内耳組織保護
効果に関しては、組織学的にその
有用性が示唆され、現在機能面
に関する解析を行っている。今
後、内耳再生に関する因子の分
子生物学的解析の結果に応じて、
その候補物質に関する徐放ジェ
ルの開発を行う。

(4) 幹細胞内耳移植による内耳有毛細胞の再生：

内耳内リンパ腔に神経幹細胞を移植した場合、生着率は外リンパ腔移植に劣るが、感覚上皮に生着しうることが判明した。また、生着細胞に対する免疫組織学的解析から、これらの一部は内耳有毛細胞の特異的マーカーとされるミオシン7a陽性であることが判明した。つまり、神経幹細胞は、内耳有毛細胞

再生をターゲットとした細胞治療のドナー細胞として高い潜在能力があるということが出来る。胚性幹細胞を内耳に移植した場合にも、内耳に生着することがあきらかとなったが、感覚上皮への生着を確認することはできなかった。内耳に生着した胚性幹細胞は様々な性質を持つ細胞に分化していることが形態学的に示唆され、現在これらの細胞に関する免疫組織学的解析を行っている。

(5) 内耳由来幹細胞：

ラット胎性期の内耳組織を分散培養することにより得られた細胞株の分子生物学的解析を行った。その結果、これらの細胞は内耳感覚細胞に特徴的とされるいくつかのマーカー陽性であることが判明した。現在、この細胞を用いた内耳への移植実験を *in vivo*, *in vitro*で行っている段階にある。

D. 考察

薬剤による傷害後の内耳感覚上皮を免疫組織学的手法で観察したところ、細胞接着分子である E-cadherin と β -catenin が細胞増殖誘導と関連する可能性がある発現様式の変化を示し、細胞増殖を抑制する p27 の感覚上皮支持細胞における発現の低下が認められた。これらの変化は内耳感覚上皮における細胞増殖誘導と関連する可能性があるが、現実には細胞増殖は極めて稀にしか認められない。したがって、これらの細胞増殖方向へのシグナルを抑制する何らかの機構が存在することが推察される。今後、このメカニズムに関与する分子に関して分子生物学的に検索する。

これまで聴覚再生への手段として、このような組織あるいは細胞の移植は全く検討されていなかったが、今回の検討から高い潜在力を持つ治療的手段である可能性が示唆された。特に、神経幹細胞は、前庭ではあるが、有毛細胞に分化する能力を持ち、細胞治療に関して最も期待できる細胞といえる。さらに、効率がよく、機能的な細胞移植に関する技術開発が今後の課題である。また、神経幹細胞の内耳移植は、内耳有毛細胞および神経節細胞の生存を促進する方法としても有用であるこ

とが判明した。これらの結果と内耳薬剤投与システムを応用することにより、内耳有毛細胞再生による高度難聴の治療方法が実現できるものと期待できる。

E. 結論

内耳有毛細胞の再生は極めて困難な課題であり、世界の数多くの研究組織がこの課題に臨んでいる。我々は、細胞治療という新しい概念をこの分野に応用し、この1年間の研究によりこの方法が期待を持てることを明らかにした。今後、自発的再生の抑制機構などの分子生物学的な研究成果をさらに反映させ、機能再生が可能なレベルに細胞治療を高めるための研究を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤壽一：27 耳鼻咽喉疾患 高度難聴者のリハビリテーション. 今日の治療指針 Vol.43 (多賀須幸男、尾形悦郎、山口 徹、北原光久 編) 889、医学書院、東京、2001
- 2) 内藤 泰：ENTONI (EB ENT, 2) 内耳奇形. 13-18、全日本病院出版会、東京、2001
- 3) 内藤 泰：人工内耳の医療と倫理. 聴覚障害 56: 4-8、2001
- 4) 内藤 泰：小児人工内耳手術の問題点. 頭頸部外科 11: 17-22、2001
- 5) 内藤 泰：聴皮質の発達と可塑性. 音声言語医学 42: 264-271、2001
- 6) 内藤 泰：聴覚の機能画像. JHONS 17: 25-28、2001
- 7) Ito J, Kojima K Takahashi M and Kawaguchi S : Survival of neural stem cells in the inner ear. Acta Otolaryngol (Stockh) 121 : 140-142, 2001
- 8) 内藤 泰：難聴の画像診断 1) CT. 耳鼻咽喉科診療プラクティス 3 新生児・幼児・小児の難聴、88-91、文光堂、東京、2001
- 9) 伊藤壽一：特集 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域の新しい器械、器具 VI. その他の器械 1. 人工内耳. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 第73巻 第5号 (増刊号) 135-139、医学書院、東京、2001

- 10) Ito J, Murata M and Kawaguchi S: Regeneration and recovery of the hearing function of central auditory pathway by transplants of embryonic brain tissue in adult rats. *Exp. Neurology* 169: 30-35, 2001
- 11) 伊藤壽一:人工内耳. 医学のあゆみ Vol.197 No.6 496-497、日本医書出版協会、東京、2001
- 12) 金丸眞一、森田武志:人工内耳手術中の電極モニター. *ENTONI (人工内耳適応の実際)* No.1 55-62、全日本病院出版会、東京、2001
- 13) 内藤 泰:画像診断. *CLIENT21 (臨床耳鼻咽喉科・頭頸部外科)* 第5巻、内耳・内耳道(星野知之編)、162-176、中山書店、東京、2001
- 14) 中川隆之:内耳有毛細胞の細胞死機構—アポトーシスについて. *Equilibrium Research* 60:159-168、2001
- 15) 伊藤 壽一:人工内耳手術. *CLIENT21 (臨床耳鼻咽喉科・頭頸部外科)* 第7巻、補聴器と人工内耳(野田 寛編) 247-253、中山書店、東京、2001
- 16) 内藤 泰、平野 滋:人工内耳による音声情報の符合化. *CLIENT21 (臨床耳鼻咽喉科・頭頸部外科)* 第7巻、補聴器と人工内耳(野田 寛編)、210-217、中山書店、東京、2001
- 17) 金丸眞一、伊藤壽一:難聴に対する人工内耳挿入術. *Medicina* 第38巻、第7号1124-6、医学書院、東京、2001
- 18) 村井紀彦、内藤 泰、船曳和雄、加藤尚美、伊藤壽一:振子様回転中の視・前庭相互作用によるvisual suppression検査. *Equilibrium Res* 60: 234-240、2001
- 19) 金丸眞一、伊藤壽一:人工内耳の問題点は. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科クリニカルトレンドPart3(野村恭也、本庄巖、小松崎篤編)、93-95、中山書店、東京、2001
- 20) 内藤 泰、伊藤壽一:人工内耳摘出・再手術を要した症例. *JHONS* 17: 1741-1744、2001
- 21) 村井紀彦、辻 純、堀 龍介、船曳和雄、内藤 泰、中川隆之、伊藤壽一:マウスにおける一側内耳破壊後の前庭眼反射の代償. *Equilibrium Res* 61: 40-44、2001
2. 学会発表
- 1) 内藤 泰. シンポジウム:人工内耳手術の問題点:小児人工内耳手術の問題点. 第11回日本頭頸部外科学会. 2001/1/26-2001/1/27. 横浜.
- 2) 内藤 泰. Cortical processing of vestibular signals and dizziness: a PET study. 24th Association for Research in Otolaryngology MidWinter Meeting. 2001/2/4-2001/2/8. Florida.
- 3) 金丸眞一、児嶋久剛、平野滋、中村達雄、平塚康之、清水慶彦. 臓器再生医工学的手法を用いた反回神経再生の試み. 第13回日本喉頭科学会. 2001/3/16-2001/3/17. 滋賀.
- 4) 金丸眞一、児嶋久剛、平野 滋、中村達雄、平塚康之、清水慶彦. 自家幹細胞を用いた声帯再生の試み. 第102回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2001/5/17-2001/5/19. 福岡.
- 5) 内藤 泰. 前庭感覚の皮質機構. 第102回日本耳鼻咽喉科学会. 2001/5/17-2001/5/19. 福岡.
- 6) 伊藤壽一. パネルディスカッション:明日の感覚器医学への貢献—聴覚、平衡覚、嗅覚、味覚の医学. 第102回日本耳鼻咽喉科学会. 2001/5/17. 福岡.
- 7) Kanemaru S, Nakamura T, Kojima H, Hiratsuka Y, Hirano S, Magrufov A.A, Shimizu Y. Regeneration of the recurrent laryngeal nerve using a woven polyglycolic acid (PGA) tube coated with collagen. The Annual Conference of A Peer Reviewed Journal of the American Society For Artificial Internal Organs. 2001/6/7-2001/6/9. New York.

- 8) 金丸眞一、児嶋久剛、平塚康之、平野 滋、伊藤壽一. 臓器再生工学的手法を用いた反回神経再生の試み. 第63回耳鼻咽喉科臨床学会. 2001/6/29-2001/6/30. 沖縄.
- 9) 伊藤壽一. シンポジウム: 小児人工内耳: 2. 幼小児人工内耳手術. 第63回耳鼻咽喉科臨床学会. 2001/6/29-2001/6/30. 沖縄.
- 10) 伊藤壽一. シンポジウム: 聴覚障害の成因・診断と治療・療育: S 1-2 人工内耳の進歩. 第41回日本先天異常学会. 2001/7/3. 東京.
- 11) Nakagawa T, Murai N, Endo T, Kim T, Yamamoto N, Tateya I, Ito J. A mouse experimental model for apoptosis of inner hair cells. The 38th Annual Workshop on Inner Ear Biology. 2001/9/1-2001/9/4. Rome.
- 12) Murai N, Nakagawa T, Endo T, Kim T, Ito J. The pathway of apoptosis in mouse hair cells induced by aminoglycoside toxicity. The 38th Annual Workshop on Inner Ear Biology. 2001/9/1-2001/9/4. Rome.
- 13) Naito Y. Cortical processing of vestibular sensation and its habituation: a PET study. The 38th Annual Workshop on Inner Ear Biology. 2001/9/2-2001/9/5. Rome.
- 14) 中川隆之、村井紀彦、遠藤 剛、金 泰秀、楯谷一郎、山本典生、伊藤壽一. マウス内耳アポトーシスモデルの作製. 第11回日本耳科学会. 2001/10/11-2001/10/13. 神戸.
- 15) 村井紀彦、中川隆之、遠藤 剛、金 泰秀、伊藤壽一. マウス内耳有毛細胞アポトーシスの実行機構. 第11回日本耳科学会. 2001/10/11-2001/10/13. 神戸.
- 16) 伊藤壽一、内藤 泰、辻 純、金丸眞一. 多発奇形・重複障害幼児での人工内耳手術例. 第11回日本耳科学会. 2001/10/11-2001/10/13. 神戸.
- 17) 伊藤壽一. シンポジウム1: 発達期の言語障害と可塑性. 第46回日本音声言語医学会. 2001/11/8. 東京.
- 18) 金丸眞一、中村達雄、児嶋久剛、Magrufof Akhmal、平塚康之、平野滋、清水慶彦、伊藤壽一. 自家幹細胞を用いた声帯再生の試み. 第53回日本気管食道科学会. 2001/11/29-2001/11/30. 東京.
- 19) 内藤泰. 前庭順応現象の皮質機構. 第60回日本めまい平衡医学会. 2001/11/29-2001/11/30. 東京.
- 20) 村井紀彦、辻 純、内藤 泰、船曳和雄、遠藤 剛、金 泰秀、伊藤壽一. 一側前庭傷害マウスの前庭代償. 第60回日本めまい平衡医学会. 2001/11/30-2001/12/1. 東京.
- 21) 中川隆之、楯谷一郎、村井紀彦、遠藤 剛、金 泰秀、坂本達則、山本典生、伊藤壽一. 前庭感覚上皮への神経幹細胞移植. 第60回日本めまい平衡医学会. 2001/11/30-2001/12/1. 東京.
- 22) 伊藤壽一. シンポジウム: 分子生物学的研究とめまい平衡医学. 第60回日本めまい平衡医学会. 2001/11/30. 東京.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
今日の治療指針 Vol. 43 27 耳鼻咽喉疾患 高度難聴者のリハビリテーション	2001年1月1日	医学書院	伊藤壽一
ENTONI (EB ENT, 2) 内耳奇形	2001年1月30日	全日本病院出版会	内藤 泰
聴覚障害 56 人工内耳の医療と倫理	2001年1月30日		内藤 泰
頭頸部外科 11 小児人工内耳手術の問題点	2001年1月30日	医学書院	内藤 泰
音声言語医学 42 聴皮質の発達と可塑性	2001年1月30日	音声言語医学会	内藤 泰
JHONS 17 聴覚の機能画像	2001年1月30日	東京医学社	内藤 泰
Acta Otolaryngol (Stockh) Survival of neural stem cells in the inner ear	2001年2月1日	Taylor & Francis	Ito J, et al
耳鼻咽喉科診療プラクティス 3 難聴の画像診断 1) CT	2001年2月26日	文光堂	内藤 泰
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 第73巻 第5号 (増刊号) 特集 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域の新しい器械、器具 VI. その他の器械 1. 人工内耳	2001年4月30日	医学書院	伊藤壽一
Experimental. Neurology 169 Regeneration and recovery of the hearing function of central auditory pathway by transplants of embryonic brain tissue in adult rats.	2001年5月1日	Academic Press	Ito J, et al
ENTONI (人工内耳適応の実際) No. 1 人工内耳手術中の電極モニター	2001年5月15日	全日本病院出版会	金丸眞一、他

CLIENT21 (臨床耳鼻咽喉科・頭頸部外科) 第5巻 画像診断	2001年5月25日	中山書店	内藤 泰
Equilibrium Research 60 内耳有毛細胞の細胞死機構— アポトーシスについて	2001年6月1日	日本めまい平衡医学会	中川隆之
CLIENT21 (臨床耳鼻咽喉科・頭頸部外科) 第7巻 人工内耳手術	2001年6月25日	中山書店	伊藤壽一
CLIENT21 (臨床耳鼻咽喉科・頭頸部外科) 第7巻 人工内耳による音声情報の 符合化	2001年6月25日	中山書店	内藤 泰、他
医学のあゆみ Vol.197 No.6 人工内耳	2001年6月25日	日本医書出版協会	伊藤壽一
Medicina 第38巻、第7号 難 聴に対する人工内耳挿入術	2001年7月1日	医学書院	金丸眞一、他
Equilibrium Res 60 振子様回転中の視・前庭相互作用 によるvisual suppression 検査	2001年8月1日	日本めまい平衡医学会	村井紀彦、他
耳鼻咽喉科・頭頸部外科クリニ カルトレンドPart3 小児人工内耳の問題点は	2001年11月22日	中山書店	金丸眞一、他
JHONS 17 人工内耳摘出・再手術を要した 症例	2001年12月1日	東京医学社	内藤 泰、他
耳鼻臨床 94 健常者脳底動脈MRA所見	2001年12月1日	耳鼻咽喉科臨床学会	中川隆之、他
Equilibrium Research 61 マウスにおける一側内耳破壊 後の前庭眼反射の代償	2002年2月1日	日本めまい平衡医学会	村井紀彦、他

20010769

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。