

厚生労働科学研究費補助金

(感覚器障害研究事業H16-感覚器-009)

内耳有毛細胞の再生による
難聴の治療

平成16年度総括研究報告書

平成17年3月

主任研究者 伊藤 壽一
(京都大学大学院医学研究科)

厚生労働科学研究費補助金

(感覚器障害研究事業H16-感覚器-009)

内耳有毛細胞の再生による

難聴の治療

平成16年度総括研究報告書

平成17年3月

主任研究者 伊藤 壽一

(京都大学大学院医学研究科)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成17年3月31日

厚生労働大臣 尾辻 秀久 殿

住 所 〒603-8054 京都市北区上賀茂桜井町15

グラン・シティオ北山通り貳番館504号

研究者 氏 名 伊藤 壽一

(所属機関 京都大学大学院医学研究科)

平成16年度厚生労働科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)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難聴の治療

(H16-感覚器-009)

国庫補助金精算所要額 : 金 14,000,000円也

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
5. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

目 次

I. 総括研究報告

内耳有毛細胞の再生による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難聴の治療

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

感音難聴は、先天的、後天的にも最も頻度の高い身体障害であり、65歳以上の高齢者の2人に1人は感音難聴を有する。先天性難聴もまた最も頻度の高い先天的異常のひとつである。しかし、感音難聴のほとんどは不可逆である。音刺激を受容するために不可欠な内耳有毛細胞が再生しないためである。我々は、有毛細胞再生による聴力再生を研究最終目標とし、広く社会福祉に貢献すべく本研究課題を申請するものである。

本研究は、発達段階の内耳有毛細胞の分化機構の解析結果を障害内耳における有毛細胞再生に応用しようとするものである。内耳有毛細胞の発達段階における分化運命決定機構に、ノッチ情報伝達系は重要な役割を果たしている。内耳有毛細胞の周囲には支持細胞とよばれる細胞が配列されているが、有毛細胞からのノッチ情報伝達系を介した側方抑制により、支持細胞となるべき細胞は有毛細胞にならないよう制御されている。我々は、生後の内耳感覚上皮において、ノッチ情報伝達系の上流に位置する転写因子であるRBP-Jをノックアウトすると、支持細胞が有毛細胞に分化転換することを発見した。しかし、遺伝子操作による有毛細胞再生には、臨床応用に際して多くの障壁が存在する。そこで、我々は、ノッチ情報伝達系を薬物で制御することにより、支持細胞から有毛細胞再生を誘導し、聴力再生することを本研究の目的とした。具体的には、ノッチ情報伝達系の阻害薬であるセクレターゼ阻害薬の内耳投与により新生した有毛細胞の機能評価および蝸牛を含めた聴覚系の機能評価を行い、機能的再生を証明する。並行して、臨床応用可能なセクレターゼ阻害薬の内耳投与システムの開発を行う。

初年度（平成16年度）には、器官培養系を用いて、再生有毛細胞が有毛細胞の生理的機能を持ちうることをメカノエレクトロニックトランスデューサーに対する蛍光色素を用いる方法で確認した。in vivoモデルでは、セクレターゼ阻害薬の実験的投与方法として、埋め込み型ポンプによる内耳薬物投与方法を確立した。臨床応用可能なセクレターゼ阻害薬内耳投与方法として、PLAコーティングによる薬物徐放システムによる経正円窓膜内耳薬物投与方法の開発を行った。

分担研究者 中川 隆之
藤野 清大
喜多 知子
京都大学大学院医学研究科

A. 研究目的

研究目的は、直ちに臨床応用可能な内耳有毛細胞再生のための技術開発を行い、感音難聴を中心とした内耳障害に対する全く新しい治療方法を提供することにある。現在、身体障害者に認定される高度感音難聴者は約36万人におよび、65歳以上人口の60%は感音難聴を有するとされている。今後の高齢者社会を考えた場合、感音難聴の克服は必ず解決しなければならない問題といえる。また、先天障害で最も高頻度

な障害が聴覚障害である事実も無視できない問題である。聴覚獲得に基づく言語社会こそが人間社会の最大の特徴であることを考えれば、高度難聴の克服は我々にとって解決すべき重要課題のひとつであることは論を待たない。この障壁となるのが、いかにして内耳有毛細胞を機能的に再生させるかという問題である。本研究では、有毛細胞再生の手段として、ノッチ情報伝達系の薬物による制御を用い、支持細胞から有毛細胞再生を誘導し、聴力再生することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) セクレターゼ阻害薬による再生有毛細胞の機能評価
内耳感覚上皮の器官培養を用い、

セクレターゼ阻害薬投与により支持細胞から有毛細胞に分化転換を誘導し、新生有毛細胞が音刺激受容に必要な機能、すなわちmechanoelectrical transducerを有するか否かを検討した。mechanoelectrical transducerの蛍光マーカーであるFM1-43による染色を行った。また、有毛細胞への分化転換の高率を向上させる目的で、本薬物による分化転換誘導のメカニズムの解析をRT-PCRにて行った。

2) セクレターゼ阻害薬による再生内耳の機能評価

セクレターゼ阻害薬を埋め込み型ポンプで蝸牛内投与することによりin vitroで観察された支持細胞から有毛細胞への分化転換をin vivoで再現性の検討を行った。最終的には非侵襲的な投与方法を用いるが、確実に蝸牛内に薬物を到達される意味から、本年度は埋め込み型ポンプを用い、モルモット蝸牛基底回転に先端部を挿入する方法を用いた。ポンプ使用による蝸牛組織障害および聴覚機能の変化を評価し、新生有毛細胞について組織化学的に評価した。

3) セクレターゼ阻害薬内耳投与システム開発

埋め込み型ポンプを用いずに内耳にセクレターゼ阻害薬を投与するシステム開発を目的とし、poly lactic/glycolic acid (PLGA) コーティングによる内耳薬物投与システムの開発を行った。内耳感覚上皮への薬物到達性と効果発現を検証する目的で、すでに感覚上皮に対する効果が知られているアミノ配糖体抗生物質であるゲンタマイシンを投与薬物として、本システムの有効性を調べた。

これらの実験は、すべて京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設の定める倫理規定に準じて行い、京都大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認を得て行ったものである。

C. 研究結果

1) セクレターゼ阻害薬による再生有毛細胞の機能評価

蝸牛感覚上皮の器官培養にセクレターゼ阻害薬を添加することにより、外有毛細胞のさらに外側に有毛細胞の新生が誘導されることが確認された。これらの新生有毛細胞は、元来存在する有毛細胞と同様にFM1-43で染色され、有毛細胞としての機能を有することが示唆された。また、セクレターゼ阻害薬の添加による有毛細胞の分化と関連する転写因子の発現変化を解析したところ、本薬物の投与により、有毛細胞への分化を促進するAthol1が増加し、これを阻害するHess 5が低下することが示された。Hess1の変化は特に認められなかった。以上の結果から、セクレターゼ阻害薬投与により、機能的な外有毛細胞の誘導が期待できることが示された。

2) セクレターゼ阻害薬による再生内耳の機能評価

埋め込み型浸透圧ポンプの留置をモルモット蝸牛基底回転に行い、組織および機能障害の有無を検討したが、いずれも認められなかった。アミノ配糖体による傷害を受けた動物で、新生有毛細胞の出現を示唆する所見が認められたが、無処置の動物では、現在のところ有毛細胞の新生は認められていない。また、傷害動物での有毛細胞誘導も個体差があり、薬物の種類、濃度投与期間を変え、有毛細胞誘導への至適条件の解析が必要であると考えられた。

3) セクレターゼ阻害薬内耳投与システム開発

PLGAコーティングでは、乳酸とグリコール酸の比率の調整により、薬物の徐放速度を調整することができるので、数種類の比率の製剤を用意し、薬物放出動態を解析した。急峻な放出を示すタイプと放出速度の遅いタイプの製剤を併せて使用することにより、内耳

感覚上皮での有毛細胞の喪失が認められることが分かった。以上の結果から、徐放動態の異なるタイプをあわせて使用することにより、薬物を内耳に一定期間安定して作用させることが可能であることが判明した。

D. 考察

器官培養を用いた解析の結果から、セクレターゼ阻害薬により蝸牛感覚上皮でノッチ情報伝達系の転写因子の増減が確認され、有毛細胞、特に外有毛細胞への分化を誘導するパターンの転写因子発現の変化が認められることが判明した。この結果は、セクレターゼ阻害薬による再生の標的を蝸牛外有毛細胞とすることが妥当であることを示唆している。蝸牛外有毛細胞は、最も脆弱な細胞であり、再生の標的となる病態が最も多いと考えられる。次に、*in vivo*の実験系においては、*in vitro*での結果の再現性を*in vivo*で解析するための基盤技術が開発できた。したがって、今後、種々のセクレターゼ阻害薬の効果の比較、至適投与条件の解析が可能となった。さらに、実際の臨床応用において、重要な問題となる内耳への薬物投与方法について、臨床応用が可能な低侵襲な方法の開発に成功した。今後、*in vivo*での至適条件の解析結果を今回開発したシステムで再現することにより、早期の臨床応用可能な蝸牛有毛細胞再生技術が開発できる。

E. 結論

器官培養系を用いた検討から、セクレターゼ阻害薬投与により、機能的な蝸牛外有毛細胞の再生が誘導できることが明らかとなった。また、*in vivo*では、埋め込み型ポンプによる薬物蝸牛投与に関する基盤技術開発ができた。これにより、多種のセクレターゼ阻害薬を種々の条件で使用することができ、今後、有毛細胞新生への至適条件決定に研究開発を進めることができる。この結果を本年度に開発した薬物投与システムにて、再現することができれば、直ちに臨床応用可能な有毛細胞再生システムが完成する。

F. 研究発表

1. 著書

- 1) 伊藤壽一, 中川隆之: 難聴Q & A. ミネルヴァ書房, 京都, 2005年3月15日

2. 論文発表

- 1) 中川隆之: 聴力のバイオロジー: 老化による聴力低下のメカニズムと聴力再生への取り組み. 日老医誌 41: 607-609, 2004年1月25日
- 2) Lee JE, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Shiga A, Lee SH, Ito J: Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. ORL 66: 111-118, 2004年4月29日
- 3) Kitajiri S, Fukumoto K, Hata M, Sasaki H, Katsuno T, Nakagawa T, Ito J, Tsukita S, Tsukita S: Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. J Cell Biol 166: 559-570, 2004年6月14日
- 4) 中川隆之, 井口福一郎, 伊藤壽一: 内耳への神経幹細胞移植. 炎症・再生 24: 562-566, 2004年9月25日
- 5) Endo T, Nakagawa T, Iguchi F, Kita T, Okano T, Sha SH, Schacht J, Shiga A, Kim TS, Ito J: Elevation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure. Free Rad Biol Med 38: 492-498, 2004年12月2日
- 6) Shiga A, Nakagawa T, Nakayama M, Endo T, Iguchi F, Kim TS, Naito Y, Ito J: Aging effects on vestibulo-ocular responses in C57B/6 mice: comparison with alteration in auditory function. Audiol Neurootol 10: 97-104, 2005年1月12日
- 7) Takebayashi S, Nakagawa T, Kojima K, Kim TS, Endo T, Iguchi F, Kita T, Yamamoto N, Ito J: Nuclear translocation of beta-catenin in developing auditory epithelia of mice.

- Neuroreport 16: 431-434, 2005年
1月24日
- 8) Nakagawa T, Ito J: Cell therapy for inner ear diseases. *Curr Pharm Des* 11: 1203-1207, 2005年
3月10日
3. 学会発表
- 1) Ito J: 特別講演 Reneration Medicine in the Otolaryngological Field. The 10th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2004/4/1 ~ 2004/4/3. Tokyo, Japan.
- 2) Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Kita T, Sha SH, Schacht J, Shiga A, Kim TS, Ito J: Redox paradox in the mouse cochlea following noise trauma. The 10th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2004/4/1 ~ 2004/4/3. Tokyo, Japan.
- 3) Kim TS, Nakagawa T, Kitajiri S, Iguchi F, Endo T, Takebayashi S, Kita T, Lee JE, Naito Y, Ito J: Temporal disruption of adherens junctions in the mouse vestibular epithelium following aminoglycoside treatment. The 10th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2004/4/1 ~ 2004/4/3. Tokyo, Japan.
- 4) Kita T, Nakagawa T, Kim TS, Iwai K, Takebayashi S, Higashi T, Naito Y, Akaike A, Ito J: Serofendic acid rescues cochlear hair cells from aminoglycoside ototoxicity. The 10th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2004/4/1 ~ 2004/4/3. Tokyo, Japan.
- 5) Takebayashi S, Nakagawa T, Kojima K, Kim TS, Kita T, Endo T, Iguchi F, Yamamoto N, Naito Y, Ito J: b-catenin expression during cochlear development of mice. The 10th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2004/4/1 ~ 2004/4/3. Tokyo, Japan.
- 6) Nakagawa T, Shiga A, Endo T, Iguchi F, Kim TS, Naito Y, Nakayama M, Ito J: Aging effects on vestibulo-ocular responses in C57B/6 mice: comparison with alteration in auditory function. The 23rd Bárány Society Meeting. 2004/7/7 ~ 2004/7/9. Paris, France.
- 7) Nakagawa T, Kim TS, Kita T, Higashi T, Sakamoto T, Takebayashi S, Matsumoto M, Ito J: Interaction between inner ear hair cells and grafted ES cell-derived neurons in vitro. The 41st Meeting of the Inner Ear Biology Society. 2004/9/4 ~ 2004/9/7. Debrecen, Hungary.
- 8) Okano T, Nakagawa T, Iguchi F, Kita T, Endo T, Sha SH, Schacht J, Shiga A, Kim TS, Ito J: Elevation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure. The 41st Meeting of the Inner Ear Biology Society. 2004/9/4 ~ 2004/9/7. Debrecen, Hungary.
- 9) 岩井浩治, 小島 憲, 田村すなほ, 竹林慎治, 喜多知子, 中川隆之, 伊藤壽一: 培養内耳前駆細胞の分化におけるDMSOの効果. 第14回日本耳科学会. 2004年10月21日 ~ 2004年10月23日. 京都.
- 10) 中川隆之: 内耳再生への幹細胞医学の応用. 第14回日本耳科学会. 2004年10月21日 ~ 2004年10月23日. 京都.
- 11) 山本典生, 伊藤壽一: Notch/RBP-Jシグナル伝達系阻害薬による生後マウスの内耳異所性有毛細胞の誘導. 第14回日本耳科学会. 2004年10月21日 ~ 2004年10月23日. 京都.
- 12) Matsumoto M, Nakagawa T, Kim TS, Higashi T, Kita T, Sakamoto T, Kojima K, Sekiya T, Ito J: The potential of embryonic stem cell-derived neurons

- for innervation into the organ of Corti. The 28th Midwinter Research Meeting of Association for Research in Otolaryngology. 2005/ 2 /19~2005/ 2 /24. New Orleans, Louisiana, USA.
- 13) Kim TS, Nakagawa T, Matsumoto M, Higashi T, Kita T, Sakamoto T, Kojima K, Ito J: Transplantation of embryonic stem cell derived neurons into vestibular sensory epithelia in vitro. The 28th Midwinter Research Meeting of Association for Research in Otolaryngology. 2005/ 2 /19~2005/ 2 /24. New Orleans, Louisiana, USA.
- 14) Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Iguchi F, Yamamoto N, Takebayashi S, Naito Y, Ito J: Role of the F-box protein Skp2 in cell proliferation in the developing auditory system in mice. The 28th Midwinter Research Meeting of Association for Research in Otolaryngology. 2005/ 2 /19~2005/ 2 /24. New Orleans, Louisiana, USA.
- 15) Nakagawa T, Endo T, Kita T, Matsumoto M, Kim TS, Iwai K, Tamura T, Okano T, Sakamoto T, Higashi T, Kojima K, Sekiya T, Iguchi F, Ito J: Functionality of cochleae received ES cell transplantation into the modiolus. The 28th Midwinter Research Meeting of Association for Research in Otolaryngology. 2005/ 2 /19~2005/ 2 /24. New Orleans, Louisiana, USA.
- 16) Higashi T, Nakagawa T, Kita T, Takebayashi S, Kim TS, Matsumoto M, Iwai K, Sakamoto T, Ito J: Expression of myosin VIIa in embryonic stem cells treated with the stromal cell-derived inducing activity. The 28th Midwinter Research Meeting of Association for Research in Otolaryngology. 2005/ 2 /19~2005/ 2 /24. New Orleans, Louisiana, USA.
- 17) Kita T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Okano T, Sha SH, Schacht J, Shiga A, Kim TS, Ito J: Evaluation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure. The 28th Midwinter Research Meeting of Association for Research in Otolaryngology. 2005/ 2 /19~2005/ 2 /24. New Orleans, Louisiana, USA.

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

著書

著者氏名	タイトル名	書籍名・編者名など	頁	出版社名	出版地	出版年
伊藤壽一, 中川隆之:	難聴 Q & A.	難聴 Q & A	1-134	ミネルヴァ書房	京都	2005年 3月15日

論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号・頁	出版年
中川隆之:	聴力のバイオロジー:老化による聴力低下のメカニズムと聴力再生への取り組み.	日老医誌	41: 607-609	2004年 1月25日
Lee JE, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Shiga A, Lee SH, Ito J:	Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis.	ORL	66:111-118	2004年 4月29日
Kitajiri S, Fukumoto K, Hata M, Sasaki H, Katsuno T, Nakagawa T, Ito J, Tsukita S, Tsukita S:	Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia.	J Cell Biol	166:559-570	2004年 6月14日
中川隆之, 井口福一郎, 伊藤壽一:	内耳への神経幹細胞移植.	炎症・再生	24: 562-566	2004年 9月25日
Endo T, Nakagawa T, Iguchi F, Kita T, Okano T, Sha SH, Schacht J, Shiga A, Kim TS, Ito J:	Elevation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure.	Free Rad Biol Med	38: 492-498	2004年 12月2日
Shiga A, Nakagawa T, Nakayama M, Endo T, Iguchi F, Kim TS, Naito Y, Ito J:	Aging effects on vestibulo-ocular responses in C57B/6 mice: comparison with alteration in auditory function.	Audiol Neurotol	10:97-104	2005年 1月12日
Takebayashi S, Nakagawa T, Kojima K, Kim TS, Endo T, Iguchi F, Kita T, Yamamoto N, Ito J:	Nuclear translocation of beta-catenin in developing auditory epithelia of mice.	Neuroreport	16:431-434	2005年 1月24日
Nakagawa T, Ito J:	Cell therapy for inner ear diseases.	Curr Pharm Des	11:1203-1207	2005年 3月10日

4. 聴力のバイオロジー： 老化による聴力低下のメカニズムと聴力再生への取り組み

中川 隆之

Key words：老化，聴力，保護，再生

(日老医誌 2004；41：607—609)

老人性難聴の現状

人間の最も頻度の高い身体機能障害のひとつに聴覚障害があり、これは後天的、先天的ともにあてはまる事実である。高齢者の多くは、何らかの聴覚障害と関連する訴えを有する。音がクリアに聞こえない、耳鳴りがするなどの訴えに始まり、日常生活に困難なレベルまで難聴が進行することも少なくない。実際、本邦を含め先進国では、60歳以上人口の60%が感音難聴を有し、75歳以上になれば日常生活に困難をおぼえるレベルの難聴者が25%を占めるといわれている。老人性難聴は、最も頻度の高い感音難聴の要因という側面も持つ。今後の高齢化社会を考慮すれば、誰もが関係する疾患とも言える老人性難聴に対して豊富な対処方法があるのかといえば、現実には補聴器の装用に限定されているのが現状である。近年の進歩に伴い、補聴器によりえられる聴覚の質は向上している。しかし、老人性難聴に対する防御、治療法は全くないのが現状である。さらなる高齢化社会の到来を前に、老人性難聴の進行を予防する方法、あるいは高度感音難聴に陥った場合には、聴覚を再生する方法の開発が急務といえる。

老人性難聴の病態

老人性難聴に対する予防法、治療法を考えるにあたっては、老人性難聴の病態を解明することが不可欠となる。これまでも、老人性難聴の病態解明は重要な課題とされ、数多くの研究がなされてきた。代表的な研究として、Schuknechtによる一連のヒト側頭骨病理の解析が知られている¹⁾。彼は、その詳細な組織学的解析から、老人性難聴の病理組織像による分類を提起している。ひとつ

は、蝸牛コルチ器の有毛細胞の変性とするタイプであり、長く動物実験などから有毛細胞変性が感音難聴の主な病態と考えられてきた病態である。しかし、実際に有毛細胞変性が明らかな老人性難聴例は少なく、ラセン神経節の変性や血管条、ラセン靭帯を含む蝸牛側壁の変性がよく認められる所見であることを指摘している。最近の動物実験²⁾³⁾から、このSchuknechtのヒト側頭骨の観察を支持する所見がえられている。しかし、蝸牛の老化現象のメカニズムには未だ不明の点が多いのが現状である。

我々は、加齢による内耳機能低下と組織所見の関連性を調べる目的で、C57BL/6マウスの聴覚および平衡機能をそれぞれの末梢感覚器の組織像を検討した。結果、聴覚機能の低下と蝸牛の組織学的変性はよく相関するが、平衡機能においてはほとんど相関しないことが判明した。すなわち、加齢による聴覚機能低下には、末梢感覚器である蝸牛が大きな役割を占めると考えられる。一方、蝸牛の組織学的変性を部位別に検討すると、ラセン神経節における神経細胞密度減少および血管条の萎縮が聴力低下とよく相関することが示唆された。最近、ラセン靭帯の変性も加齢とともに進行することが報告されており⁴⁾、老化による蝸牛変性は単一の病態で説明できるものではないと考えられる。今後、蝸牛の加齢に伴う変性の分子生物学的な機構を明確にし、機能低下の鍵を握る部位を明確にする必要がある。

ヒト側頭骨病理の解析については、先述したSchuknechtの研究が広く知られているが、日本人側頭骨に関する定量的な解析の報告は乏しい。動物実験で認められる所見がヒトでも認められるか否かを耳疾患を有さない日本人側頭骨96耳を用いて解析した。ヒト側頭骨においては、当然のことながら単一種のマウスでの解析とは異なり、明らかな個体差を認めた。しかし、ラセン神経節細胞密度、血管条断面積の減少と年齢との相関が認められた。つまり、ヒトでは、個々の症例に応じて、老化

T. Nakagawa：京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科

による蝸牛変性の程度, メカニズムを考える必要があるが, 老化に伴う蝸牛変性の共通所見として, ラセン神経節および血管条の萎縮が存在するといえることができる。

老人性難聴予防へのストラテジー

老人性難聴に対する現状での確立された治療は, 補聴器の装用のみであり, 厳密な意味での治療法はない。加齢による難聴の進行は一般に緩やかであることを考慮すれば, 老人性難聴治療方法として, 予防方法の開発が重要な意義をもつと考えられる。これまでも蝸牛, 特に有毛細胞, ラセン神経節細胞の変性, 細胞死の防御について数多くの研究がなされており, 様々な神経栄養因子⁹⁰⁾や抗酸化物質⁷⁸⁾の有効性が実験的に示されている。しかし, これらの研究成果が臨床応用に進んだ例は, 今のところない。臨床応用への道を狭めている要因に内耳にいかにか有効に薬物を到達させるかという問題がある。内耳には, 中枢神経系と同様の血液-内耳関門が存在し, 全身投与された薬物が内耳に到達しにくいという特徴がある。また, 投与された薬物が十分な効果を発揮するためには, 必要な容量が必要な時間内耳に存在しなければならない。われわれは, この問題を解決すべく内耳薬物投与システムの開発を行った。

われわれの考案した内耳薬物投与システムは, 京都大学再生医学研究所の田畑教授のグループが開発した生体吸収性徐放ゲル⁹⁾を応用したものである。投与方法は簡潔で, 中耳正円窓膜状にゲルを留置するのみである。われわれは, 内耳保護効果がすでに明らかにされている脳由来神経栄養因子 (BDNF) を投与薬物とし, この薬物投与システムの有効性を検証した。BDNFを浸漬したゲルを留置後, 経時的に蝸牛外リンパ液中のBDNF濃度をELISA法で測定したところ, 投与2週後でも高濃度のBDNFを内耳リンパ液中に検出することができた。実際に薬物効果発現をラセン神経節の2次性変性モデルを用いて検討した。BDNF投与を受けたモルモットでは, コントロールとした生食投与モデルに比して, 組織学的に有意にラセン神経節細胞保護効果が認められ, さらに, 機能的保護効果が電気刺激聴性脳幹反応により明らかにされた。以上の結果から, 生体吸収性徐放ゲルを用いた薬物投与システムが内耳に対しても応用できることが示唆された。この内耳薬物投与システムは, 老化による蝸牛障害の予防に用いることができる可能性があり, 今後の研究発展が期待される。

聴覚機能再生へのストラテジー

加齢による聴力低下には大きな個人差があるが, 身体

障害者に該当する高度聴覚障害者は本邦でも約36万人存在する。この中で老人性難聴進行例の占める割合は無視できるものではない。現在のところ, いずれの原因にせよ一旦喪失した聴力を回復させることは極めて困難である。そこで, われわれは新しい研究的アプローチとして, 細胞移植による内耳再生を試みた。これまでに神経幹細胞による有毛細胞, ラセン神経節細胞再生の可能性¹⁰⁾¹¹⁾, 骨髄由来間葉系細胞移植によるラセン神経節細胞再生の可能性¹²⁾について報告した。ここでは, 胚性幹細胞 (以下ES細胞) 移植によるラセン神経節再生についての最近の知見を紹介する。

マウスES細胞を神経方向に分化誘導した後に回収し, あらかじめラセン神経節傷害を惹起しておいたモルモット蝸牛に移植した。4週間後にラセン神経節機能を電気刺激聴性脳幹反応で評価したところ, シャムオベを施行したコントロールでは全く反応が認められなかったのに対して, 一部の移植動物では反応が確認された。この反応が認められた動物では, 多量の移植細胞が本来ラセン神経節細胞および蝸牛神経が存在する蝸牛軸に生着し, 神経細胞に分化している像が観察された。これらの結果は, ES細胞の蝸牛移植によりラセン神経節細胞を再生することが可能であることを示唆するものであり, まだまだ解決すべき問題は山積みであるが, 細胞移植というストラテジーが内耳再生に応用可能であることを示すという意味で意義のある結果ととらえることができる。

今後の展望

第一に老化モデル動物を用いた研究により, 分子生物学的レベルで有毛細胞のみならずラセン神経節, 血管条, ラセン韌帯の加齢による変性のメカニズムを明らかにし, 老人性難聴防御におけるターゲットが明確にする必要がある。次に, ヒトにおける個体差の要因, つまり加齢による蝸牛変性が強い症例と軽い症例の差異の要因を解析する必要がある。この要因に聴覚におけるアンチエイジングの鍵が隠されている可能性がある。そして, これらの基礎的研究成果を現実の臨床の場に供するためのトランスレーショナルな研究 (内耳薬物投与システムの臨床応用もここに含まれる) が, われわれの重要な責務であると考えられる。

参考文献

- 1) Schuknecht HF: Pathology of the ear. Cambridge, Harvard UP, 1974.
- 2) Keithley EM, Ryan AF, Woolf NK: Spiral ganglion cell

- density in young and old gerbils. *Hear Res* 1989; 38: 125—133.
- 3) Gates GA, Mills D, Nam BH, D'Agostino R, Rubel EW: Effects of age on the distortion product otoacoustic emission growth functions. *Hear Res* 2002; 163: 53—60.
 - 4) Hequembourg S, Liberman MC: Spiral ligament pathology: a major aspect of age-related cochlear degeneration in C57BL/6 mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 2001; 2: 118—129.
 - 5) Ylikoski J, Pirvola U, Virkkala J, Suvanto P, Liang XQ, Magal E, et al.: Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear Res* 1998; 124: 17—26.
 - 6) Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, Pyykko I, Olivius NP, Kaksonen R, et al.: Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1657—1660.
 - 7) Sha SH, Schacht J: Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation in vitro and ototoxicity in vivo: D-methionine is a potential protectant. *Hear Res* 2000; 142: 34—40.
 - 8) Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S: Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 2000; 21: 513—520.
 - 9) Tabata Y, Ikada Y: Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 31: 287—301.
 - 10) Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim TS, Endo T, Yamada S, et al.: Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 2003; 14: 1677—1681.
 - 11) Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Tateya I, Endo T, Kim TS, et al.: Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. *Acta Otolaryngol* 2004; Suppl 551: 65—68.
 - 12) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, et al.: Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 2004; 15: 1—4.

Abstract

Mechanisms of age-related hearing loss and strategies for protection and restoration of hearing

Takayuki Nakagawa

Hearing impairment is the most frequent disability in elderly individuals; however, we have limited options for treatment of age-associated hearing loss. To establish novel strategies for the treatment of age-associated hearing loss, it is crucial to elucidate the mechanisms of age-associated hearing loss. Studies on animal models and human temporal bones have indicated a close relationship between degeneration of the spiral ganglion neurons and stria vascularis and age-associated hearing loss. We have developed a drug delivery system using biodegradable gel for the inner ear to protect inner ears against aging. In addition, recent studies on cell therapy for the inner ear have suggested the efficacy of cell transplantation for restoration of hearing.

Key words: *Aging, Hearing loss, Protection, Regeneration*
(*Jpn J Geriatr* 2004; 41: 607—609)

Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine

Mechanisms of Apoptosis Induced by Cisplatin in Marginal Cells in Mouse Stria Vascularis

Ji Eun Lee^{a,d} Takayuki Nakagawa^a Tomoko Kita^{a,b} Tae Soo Kim^a Fukuichiro Iguchi^a
Tsuyoshi Endo^a Atsushi Shiga^c Sang Heun Lee^d Juichi Ito^a

^aDepartment of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, ^bHorizontal Medical Research Organization, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, ^cDepartment of Otolaryngology, Aichi Medical University, Aichi, Japan; ^dDepartment of Otolaryngology, School of Medicine, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea

Key Words

Stria vascularis · Cisplatin · Lipid peroxidation · Peroxynitrite · Caspase · Nitric oxide

Abstract

Degeneration of the stria vascularis (SV) is amongst the major causes of cisplatin (CDDP)-induced hearing impairment. The pathways of apoptosis occurring in the SV due to CDDP were examined using a mouse experimental model. Temporal bones of adult C57BL/6 mice were collected on days 3, 7 and 14 after the local application of CDDP. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay and immunostaining for apoptosis-related proteins or reactive radical species were employed for analysis. Local application of CDDP caused apoptotic cell death of marginal cells 3 days after CDDP treatment. Immunohistochemical analyses demonstrated activation of caspase-3 and -9, but not -8, and redistribution of cytochrome c in affected marginal cells, indicating a caspase-dependent, mitochondrion-mediated apoptotic pathway in marginal cells. Temporary expression of hydroxynonenal, nitrotyrosine and inducible nitric oxide synthase in the SV was observed at the induction of apoptosis in marginal cells. CDDP toxicity generates reactive radical species in the SV, which causes mitochondrial membrane permeabilization leading to apoptosis of marginal cells.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

Introduction

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II; CDDP) is widely used as an effective and potent antineoplastic drug. It has been shown to be efficient against cancers of the head and neck; however, several side effects have been reported limiting its use. Ototoxicity remains a major problem and there is a high correlation between the degree of hearing loss and CDDP dosage [1, 2]. CDDP toxicity has been shown to cause degeneration in various regions of the inner ear. The stria vascularis (SV) is known as a primary site of CDDP ototoxicity. In the SV, it has been shown that marginal cells are especially vulnerable to CDDP-induced damage [3, 4]. In addition, it has been demonstrated that there is a high correlation between marginal cell damage and hearing loss [5]. Marginal cells play an important role in ion transport and maintenance of a high concentration of potassium in the perilymph of the cochlea [6]. Protection of marginal cells in the SV from CDDP toxicity is therefore critical for the preservation of hearing during CDDP treatment.

Protection of marginal cells of the SV from cell death due to CDDP requires an understanding of the mechanisms of cell death occurring in these cells during CDDP treatment. Cell death occurs by one of two methods, apoptosis or necrosis. Various ototoxic insults have been shown to induce apoptotic cell death in a variety of cell types in the inner ear [7–9]. Several pathways of apoptosis

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2004 S. Karger AG, Basel
0301-1569/04/0663-0111\$21.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ol

Takayuki Nakagawa, MD, PhD
Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery
Graduate School of Medicine, Kyoto University
Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, 606-8507 Kyoto (Japan)
Tel. +81 75 751 3346, Fax +81 75 751 7225, E-Mail tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

have been described. In the death receptor-mediated pathway, activation of the receptor induces activation of caspase-8, leading to activation of caspase-3 [10]. Activated caspase-3 then causes a chain reaction resulting in cell degradation. In the mitochondrion-mediated pathway, death signals cause permeabilization of the mitochondrial membrane, resulting in release of cytochrome c from the mitochondria to the cytoplasm. Released cytochrome c activates caspase-9, followed by activation of caspase-3 [11]. Stress of the endoplasmic reticulum also induces apoptosis, involving activation of caspase-12 and calpain [12]. These pathways require activation of the caspase family for degradation of cells. On the other hand, the apoptosis-inducing factor (AIF) is a key molecule for the caspase-independent pathway of apoptosis [13].

Elucidation of the triggers for cell death is also necessary for establishment of protective strategies against CDDP toxicity. Recent studies have revealed that reactive radical species play a central role in the degeneration of the inner ear due to various ototoxic insults including CDDP [14]. Superoxide is readily generated in the inner ear under pathological conditions. Superoxide is not in itself highly toxic, but it can be metabolized to highly reactive radical species. Superoxide is readily metabolized to two highly toxic radicals, peroxynitrite and hydroxy radicals. Superoxide can also react with nitric oxide (NO) to yield the toxic oxidizing agent peroxynitrite. This causes nitration of tyrosine residues and leads to changes in protein structure and function [15]. Nitrotyrosine (NT) is a useful marker for the analysis of protein peroxidation by peroxynitrite [16]. In another pathway, superoxide transforms into hydrogen peroxide and, as a result of catalysis by iron, forms highly toxic hydroxy radicals. Hydroxy radicals initiate lipid peroxidation. One of the products associated with lipid peroxidation, 4-hydroxynonenal (HNE), is a useful marker for the analysis of lipid peroxidation [17].

The aim of the present study was to elucidate the mechanisms of cell death in the SV caused by CDDP toxicity and the relationship between induction of cell death and generation of reactive radical species. Firstly, we established a mouse model for the rapid induction of apoptosis in the SV. We directly applied CDDP into inner ears of mice to cause massive and acute degeneration of the SV. Using this model, the pathway of apoptosis occurring in the SV was analyzed. The production of NT and HNE in the SV of this animal model was then examined together with expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS).

Materials and Methods

Experimental Animals

C57BL/6 mice (6 weeks of age; $n = 27$) were purchased from Japan SLC Inc. (Hamamatsu, Japan). Animals had free access to water and to a regular mouse diet. All experimental protocols were approved by the Animal Research Committee, Graduate School of Medicine, Kyoto University. Animal care was under the supervision of the Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University.

Ototoxic Treatment and Tissue Preparation

Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg). A CDDP solution (10 μ l, 2.0 mg/ml in physiological saline; Sigma, St. Louis, Mo., USA) was directly applied into the left posterior semicircular canal. The procedures used are described in detail elsewhere [18]. Animals treated with physiological saline acted as controls ($n = 6$). On day 3 ($n = 7$), day 7 ($n = 7$) or day 14 ($n = 7$) after CDDP treatment, the animals were deeply anesthetized with a lethal dose of ketamine and xylazine. They were then perfused intracardially with physiological saline, followed by 4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4. Controls were sacrificed on day 3 ($n = 3$) or day 14 ($n = 3$). The temporal bones were excised and immersed in fixative at 4°C for 4 h. Specimens were prepared (10 μ m thick) using a cryostat after decalcification with 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid in PBS for 24 h at 4°C. Sections were then mounted on γ -aminopropyl triethoxysilane-coated glass slides. Mid-modiolus sections from each animal were used for histological analysis. An average of 4 sections from each animal was used for quantitative analysis.

Estimation of Stria Degeneration

Hematoxylin and eosin (HE) staining was used for estimation of morphological changes in the SV after CDDP treatment. In addition, quantitative analysis of the volume of the SV was performed using HE-stained sections. The area of the SV of the cochlear second turn was measured using NIH Image software. The dying cells in the SV were labeled by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method. An Apoptag fluorescein direct in situ apoptosis detection kit (Intergen Company, Purchase, N.Y., USA) was used. After treatment with 0.5% Triton-X 100 in PBS for 20 min at room temperature, TUNEL staining was performed according to the manufacturer's instructions. At the end of the staining procedure, specimens were incubated in PBS containing 2 μ g/ml 4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA) to demonstrate nuclear chromatin. The specimens were then viewed with a Nikon ECLIPSE E600 fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). TUNEL-positive cells in the SV were identified using fluorescence images of TUNEL and DAPI staining. The numbers of TUNEL-positive cells in the SV of the second turn of the cochlea were also counted in 4 sections from each animal. Cell numbers in the SV were determined by counting DAPI signals in the SV using bright-field images merged with images of DAPI fluorescence. The area of the SV, the number of TUNEL-positive cells in the SV and the total cell numbers in the SV were statistically analyzed using StatView software (StatView Version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). The data obtained from control animals on day 14 were used as the control in this analysis. Differences between experimental groups were examined for significance

using analysis of variance with Bonferroni/Dunn protected least significant difference ($p < 0.01$).

Analysis of Cell Death Pathway

To determine the pathways involved in apoptosis in the SV as a result of CDDP toxicity, immunohistochemistry for cleaved caspase-3, -8, -9 or cytochrome c was performed in CDDP-treated or control specimens obtained on day 3. Rabbit polyclonal antibodies against cleaved caspase-3 (1:50; Cell Signaling Technology, Beverly, Mass., USA), cleaved caspase-9 (1:100; Cell Signaling Technology), cytochrome c (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA), mouse monoclonal antibody against cleaved caspase-8 (1:50; Cell Signaling Technology) and goat polyclonal antibody against AIF (1:100, Santa Cruz Biotechnology) were used as the primary antibodies. Alexa-Fluor 594-conjugated goat antirabbit or antimouse IgG (1:200; Molecular Probes) or Alexa-Fluor 594-conjugated donkey anti-goat IgG (1:200; Molecular Probes) was used as the secondary antibody. Counterstaining with DAPI was performed to demonstrate nuclear morphology. Expression of these molecules and their cellular location in apoptotic marginal cells was compared with that in normal marginal cells using a Nikon ECLIPSE E600 fluorescence microscope.

Generation of Reactive Radical Species

To examine the involvement of reactive oxygen species in CDDP-induced degeneration of the SV, the expression of NT and HNE was evaluated using immunohistochemistry. Rabbit anti-NT polyclonal antibody (1:100; Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y., USA) or mouse anti-HNE monoclonal antibody (1:8; Oxis Research, Portland, Oreg., USA) was used as the primary antibody. Specimens were incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody then washed with PBS three times and incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody. Rhodamine-conjugated donkey antirabbit IgG (1:500; Chemicon, Temecula, Calif., USA) or Alexa-Fluor 594-conjugated goat antimouse IgG (1:200; Molecular Probes) was used as the secondary antibody. Generation of NO was indirectly evaluated using analysis of iNOS activity. To determine NOS activity in the SV, immunohistochemistry for iNOS was employed. Rabbit anti-iNOS polyclonal antibody (1:20; BD Biosciences, San Jose, Calif., USA) was used as the primary antibody. Alexa-Fluor 594-conjugated goat antirabbit IgG (1:200; Molecular Probes) was used as the secondary antibody.

Results

Estimation of Stria Degeneration

HE staining revealed degenerative changes in the SV following CDDP treatment. On day 3 after treatment, edematous swelling was observed in the SV (fig. 1b), while atrophic changes were found on days 7 and 14 (fig. 1c, d). Control specimens obtained on day 3 or day 14 showed normal morphology (fig. 1a). The thickness of the SV on days 7 and 14 was much reduced compared with that of controls and quantitative analysis of the SV area supported this morphological observation. A significant decrease in the area of the SV was observed on days 7 and 14

(fig. 1m). In age-matched controls, no degenerative changes in the SV were observed. TUNEL staining demonstrated a rapid induction of apoptotic cell death in the SV after CDDP application (fig. 1e-h). Age-matched controls exhibited no TUNEL-positive cells in the SV. In specimens obtained on day 3, numerous TUNEL-positive cells were found in the SV (fig. 1f), with the majority located in the layer of marginal cells. TUNEL-positive cells were also observed in the SV on days 7 and 14, although they were limited in numbers. No TUNEL-positive cells were observed in control specimens. Quantitative analysis of TUNEL-positive cells in the SV clarified the time course of induction of apoptosis following CDDP treatment (fig. 1n). Merged DAPI fluorescence and bright-field images demonstrated a decrease in cell numbers in the cochlear lateral wall including the SV (fig. 1i-l). Quantitative assessment of cell numbers in the SV revealed a significant decrease in cell numbers between day 3 and day 7 (fig. 1o), corresponding to the induction of TUNEL-positive cells on day 3.

Analysis of Cell Death Pathways

Expression of apoptosis-related molecules in apoptotic marginal cells on day 3 was compared with that in healthy marginal cells in age-matched controls. Marginal cells affected by CDDP exhibited expression of cleaved caspase-3 (fig. 2b), while none was observed in marginal cells in controls (fig. 2a). In specimens obtained on day 3 after CDDP administration, a majority of marginal cells were positive for cleaved caspase-3. In contrast, there was no expression of cleaved caspase-8 in either control or CDDP-treated specimens (fig. 2c, d). Expression of cleaved caspase-9 was found in about 50% of marginal cells (fig. 2f), while normal marginal cells exhibited no expression (fig. 2e). No expression of AIF was found in either control or CDDP-treated specimens (fig. 2g, h). On the other hand, immunohistochemistry for cytochrome c indicated release of cytochrome c from the mitochondria into the cytoplasm in affected marginal cells. Marginal cells in controls exhibited expression of cytochrome c, which was extruded from the nuclear space, in the cytoplasm (fig. 3a-c). In contrast, marginal cells damaged by CDDP exhibited a weak and diffuse distribution of cytochrome c in the cytoplasm including the nuclear spaces (fig. 3d-f).

Generation of Reactive Radical Species

Immunohistochemistry for HNE demonstrated the occurrence of lipid peroxidation in the SV and spiral ligament (SL) after CDDP treatment (fig. 4a-d). In controls,

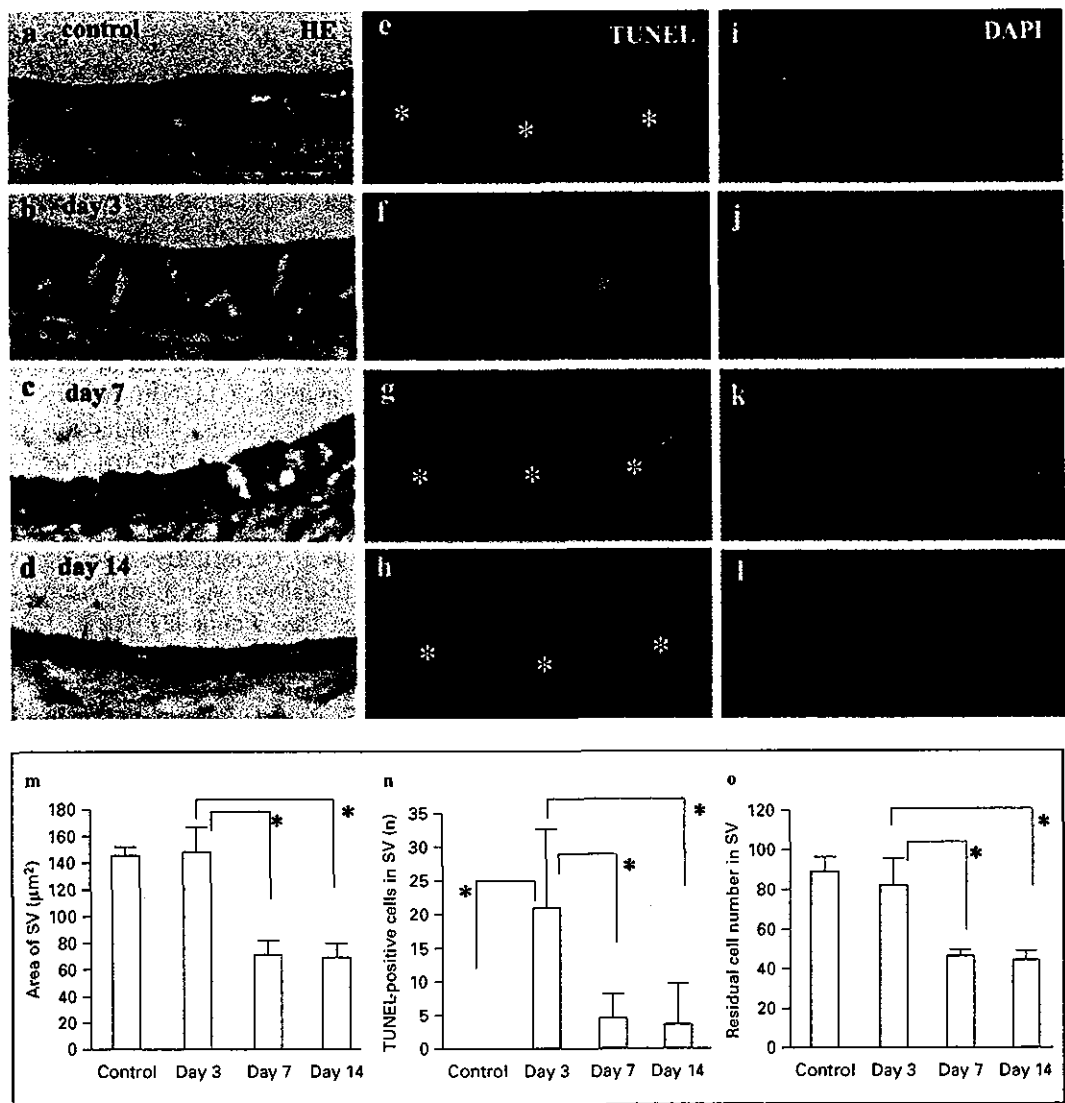


Fig. 1. Degeneration of the SV of the second turn of cochlea following CDDP treatment. HE staining (**a-d**) showing edematous swelling of the SV on day 3 (**b**) and progressive atrophy on days 7 (**c**) and 14 (**d**). TUNEL staining (green; **e-h**) showing predominant induction of apoptotic cell death in the SV on day 3 (**f**). Asterisks indicate the location of the SV. Combined images of DAPI fluorescence (blue) and bright fields (**i-l**) showing an apparent decrease in cell numbers in the SV on days 7 (**k**) and 14 (**l**). Bar represents 30 μm . Quantitative assessment of areas of the SV of the second turn of cochlea demonstrates a significant decrease in areas on day 7 and 14 (**m**). **n** Mean numbers of TUNEL-positive cells in the SV. Predominant induction of TUNEL labeling is observed on day 3. Residual cell numbers in the SV significantly decrease on days 7 and 14 (**o**). Bars represent standard deviations. Statistical significance is determined by ANOVA with Bonferroni/Dunn test for significance (* $p < 0.0083$).

no positive staining for HNE was found in the SV or the SL (fig. 4a). In specimens obtained on day 3, the SV and SL both exhibited strong expression of HNE on their cytoplasmic membrane (fig. 4b), with no differences in immunoreactivity between the SV and SL. In contrast, the SV

exhibited weak expression of HNE on days 7 and 14, although strong expression of HNE remained in the SL (fig. 4c, d).

Immunohistochemistry for NT verified the occurrence of protein peroxidation by peroxynitrite in the SV and SL

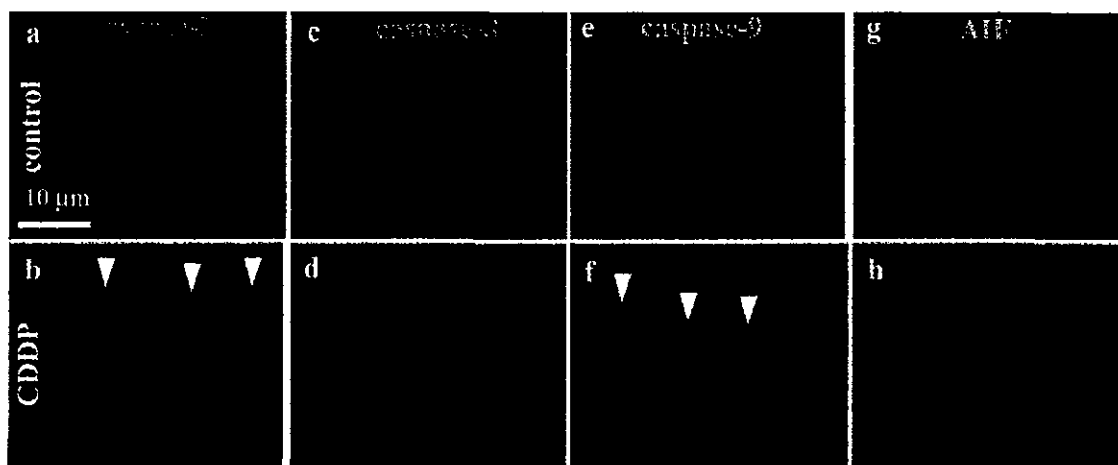


Fig. 2. Immunohistochemistry for apoptosis-related proteins in the SV of control specimens obtained on day 3 and of CDDP-treated specimens also obtained on day 3. In control specimens, no expression of cleaved caspase-3, -8, -9 or AIF is found in the SV (**a, c, e, g**). Damaged marginal cells express cleaved caspase-3 (arrowheads; **b**) and caspase-9 (arrowheads; **f**), but not cleaved caspase-8 (**d**) or AIF (**h**). Blue indicates counterstaining with DAPI. Bar represents 10 µm.

(fig. 4e–h). In controls, faint or no expression of NT was observed in the SV (fig. 4e). In contrast, CDDP-treated specimens exhibited striking expression of NT in the SV on days 3 and 7 (fig. 4f, g). Specimens on day 14 exhibited weak expression of NT in the SV (fig. 4h). The SL exhibited expression of NT in all CDDP-treated specimens.

In controls, there was no expression of iNOS in the SV and SL (fig. 4i). However, strong expression of iNOS was identified in the SV on day 3 (fig. 4j). In specimens obtained on day 7, expression of iNOS in the SV was moderate (fig. 4k). On day 14, only faint expression of iNOS was observed in the SV (fig. 4l). The SL of CDDP-treated animals exhibited weak expression of iNOS.

Discussion

Cell Death Model for the SV

In the present study, local application of CDDP into the inner ear of mice caused degeneration of the SV. The method for local application of ototoxic agents into the mouse inner ear has been reported [18]. A single injection of CDDP into the semicircular canal induces degeneration of cochlear hair cells [19] and spiral ganglions [20]. Degeneration of spiral ganglions has been found from the basal to apical portion of cochleae. These findings suggest that CDDP administered from the semicircular canal reaches to the apical portion of cochleae.

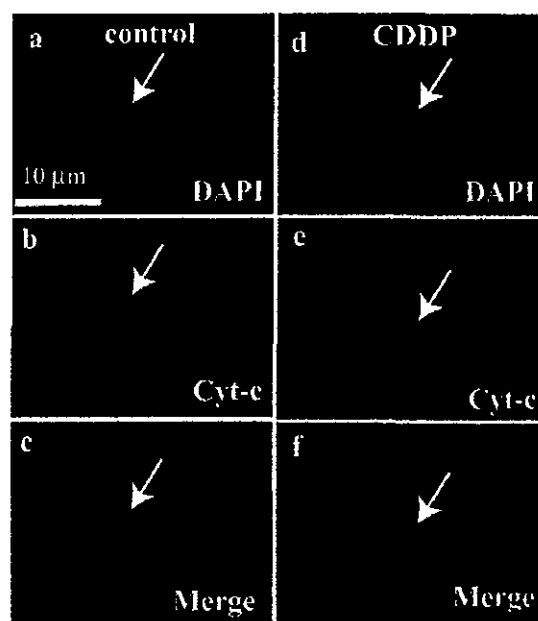


Fig. 3. Immunohistochemistry for cytochrome c (Cyt-c) of the SV of control specimens obtained on day 3 (**a–c**) and CDDP-treated specimen also obtained on day 3 (**d–f**). **a, d** Nuclear staining with DAPI. **b, e** Immunohistochemistry for Cyt-c. **c, f** Merged images. The distribution of Cyt-c in marginal cells of the control is clearly extruded from nuclear spaces (**a–c**, arrows), while that of the CDDP-treated specimen is diffuse throughout their nuclear spaces (**d–f**, arrows). Bar represents 10 µm.

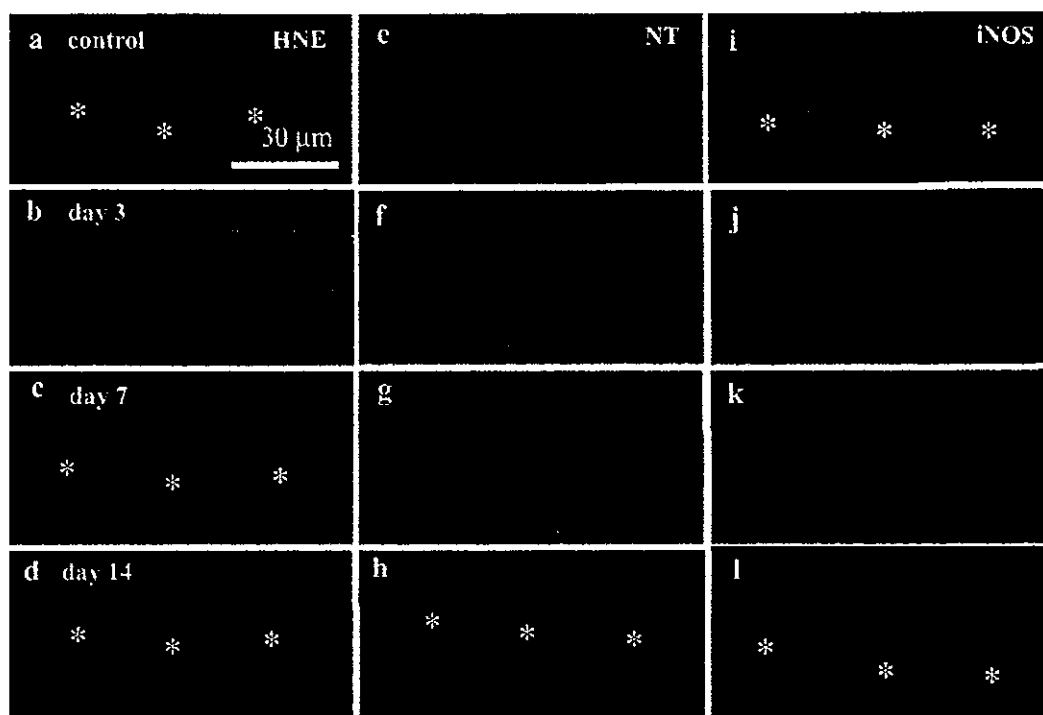


Fig. 4. Expression of HNE, NT and iNOS in the SV of the second turn of cochlea following CDDP treatment. Immunostaining for HNE (**a-d**) showing expression of HNE in the SV and SL following CDDP treatment (**b-d**). Strong expression in the SV on day 3 is noted (**b**). Immunostaining for NT (**e-h**) showing intense staining in the SV on days 3 (**f**) and 7 (**g**). Immunostaining for iNOS (**i-l**) showing expression of iNOS in the SV on days 3 (**j**) and 7 (**k**). Asterisks indicate the location of the SV. Bar represents 30 µm.

Morphologically, edema formation in the SV appeared during the early phase of degeneration after CDDP treatment, followed by severe atrophy during the late phase. The time course of morphological changes of the SV observed in this study was similar to that observed in previous studies using systemic CDDP application [3-5]. TUNEL assays revealed induction of apoptotic cell death in the SV after CDDP treatment. Most TUNEL-positive cells were located in the marginal cell layer of the SV, in agreement with previous findings using systemic administration of CDDP [9, 21]. The present findings demonstrate that apoptotic cells in the SV appeared predominantly on day 3 following CDDP treatment. The predictability of the induction of apoptotic cell death in the SV makes this an ideal system in which to study cell death mechanisms. In addition, there was a significant reduction in the area of the SV following induction of apoptotic cell death. Since marginal cells constitute a major part of the SV [5], their loss leads to a large reduction in the area of the SV.

Cell Death Pathways in Marginal Cells

Expression of proteins associated with apoptosis was examined using specimens obtained on day 3 after CDDP or control treatment. Day 3 was chosen as this was the day on which induction of apoptosis in marginal cells was most likely to be observed. Apoptosis is caused by a complicated cascade of pathways (fig. 5). The majority of marginal cells affected by CDDP exhibited expression of cleaved caspase-3, similar to the previous findings [22]. This indicates that caspases are involved in the process of apoptotic cell death in marginal cells following CDDP treatment. Activation of caspase-3 leads to activation of a series of caspases [23]. On the other hand, expression of AIF was not found in damaged marginal cells, which supports the hypothesis that the caspase family plays a central role in the degradation of marginal cells affected by CDDP. Apoptotic signaling is initiated by activation of the death receptor mediated by damage to the mitochondrial membrane or stress to the endoplasmic reticulum (fig. 5). In this study, damaged marginal cells exhibited no