

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17年度総括研究報告書

平成18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18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 イトウ ショイチ
伊藤 壽一

(所属機関 京都大学大学院医学研究科)

平成17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 13,300,000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 7

III. 研究成果の刊行物・別刷 9

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
総括研究報告書

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に制御されている。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。

初年度（平成16年度）には、器官培養系を用いて、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を行い、再生有毛細胞が有毛細胞の生理的機能を持つことを明らかとした。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。

平成17年度には、器官培養系の解析から、有毛細胞再生に有効性の高い、セクレターゼ阻害薬の選定、効果発現のための条件を明らかにした。培養系での機能評価方法として、カルシウムイメージングを応用した評価系を開発した。齧歯類を用いたin vivoでの解析から、1) 投与経路として、内リンパへの薬物直接注入が必要なこと2) 蝸牛有毛細胞再生だけでなく、ラセン神経節細胞などの再生にも応用できる可能性があることが明らかとなった。

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) in vitroでのセクレターゼ阻害薬による再生有毛細胞の機能評価

2種類のセクレターゼ阻害薬(MDL28170およびDAPT)を用い、器官培養組織として、胎生14、17日、生後3日の蝸牛感覚上皮を用い、新生有毛細胞誘導に関する条件の解析を組織学的、分子生物学的に行うと同時に新生有毛細胞誘導に際して、細胞増殖を伴うか否かについて、ブロモデオキシウリジンを用いた免疫染色にて評価を行った。また、新生有毛細胞機能の詳細な解析法の確立を目的として、器官培養蝸牛感覚上皮を用い、有毛細胞感覚毛の物理的刺激に対する応答をカルシウムイメージングで評価することを試みた。

2) in vivoでのセクレターゼ阻害薬による再生内耳の機能評価

モルモットを実験動物とし、セクレターゼ阻害薬を経鼓室階、中央階の3つの経路で投与し、投与

方法による支持細胞から有毛細胞への分化転換の効率についての比較検討を行った。あらかじめカナマイシンとエタクリン酸の全身投与により、聾としたモルモットを用いた。また、昨年度の結果に基づき、より迅速に、かつ高濃度の薬物を感覚上皮に作用させる目的で、鼓室階への投与に際しては、微量注入ポンプでの薬物注入後に埋め込み型ポンプを接続する工夫を加えた。昨年度の解析から、セクレターゼ阻害薬は蝸牛感覚上皮でのノッチ情報伝達系の転写因子であるHes1, 5を抑制することにより、支持細胞から有毛細胞への分化転換が誘導されていることが示唆された。つまり、これらの転写因子が発現し、分化が抑制されていることが、有毛細胞への分化誘導に必要な因子と考えられる。そこで、Hes1発現に伴いGFP蛍光を発する遺伝子改変マウスを用いて、成熟した内耳での発現を解析した。また、サルでの応用実験の準備として、サル蝸牛障害モデルの作製を目的とし、シスプラチンの局所投与モデルの有用性について、機能的解析を行った。

3) 内耳へのセクレターゼ阻害薬投与システムの開発

より高濃度のセクレターゼ阻害薬を感覚上皮に到達させるためには、内リンパ腔への薬物投与が望ましいが、臨床応用を考慮すれば、低侵襲な投与方法の開発が望まれる。そこで、経内リンパ嚢で蝸牛内リンパ腔への薬物投与の可能性について、モルモットを用いた解析を行った。

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・医学部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) *in vitro*でのセクレターゼ阻害薬による再生有毛細胞の機能評価

投与する薬物種類に関しての解析結果として、*in vitro*では、DAPTがより効率的に有毛細胞への分化誘導を行う作用があることが示唆された。特に、作用させる時間が短くても、分化誘導が可能であることが示唆された点は、*in vivo*への応用について有用な所見と考えられた。しかしながら、DAPTは未熟な感覚上皮では、きわめて高率に有毛細胞を増加させる効果を示したが、生後の組織では著しく低下することも明らかとなった。すなわち、高濃度のDAPTを作用させることが、*in vivo*での再現に必要な因子であることが示唆された。一方、MDL28170は、生後の組織でも分化誘導を行うことができるが、Hes1に対する抑制効果が弱く、有毛細胞新生を誘導できる部位が限定される傾向があることが判明した。細胞増殖誘導に関しての解析では、DAPTにより、支持細胞の細胞増殖が誘導されることが示唆されたが、増殖した支持細胞から分化した有毛細胞は認められず、既存の支持細胞からのみ新生有毛細胞が誘導されていることが明らかとなった。新生有毛細胞の機能評価方法として、すでに、再生前庭有毛細胞では、機能評価が可能であることが分かっていたカルシウムイメージングを蝸牛に応用する基盤技術を開発した。蝸牛有毛細胞では、前庭有毛細胞に比して、感覚毛が短く、物理的刺激を与えることが困難であったが、プローブの位置、角度などの工夫により、蝸牛でも評価できることが判明した。ラセン神経節への刺激伝達の評価については、現在解析中である。本システムが完成すれば、器官培養系でより高度な機能評価が可能となる。

2) *in vivo*でのセクレターゼ阻害薬による再生内耳の機能評価

Atoh1遺伝子の強制発現により

有毛細胞新生を誘導したIzumikawa et al. Nat Med 2005と同じプロトコルの実験系を用い、遺伝子強制発現の代わりにセクレターゼ阻害薬を投与することとした。カナマイシンとエタクリン酸の全身投与により、ほぼすべての外有毛細胞が消失し、蝸牛基底回転部で内有毛細胞の消失が認められた。MDL28170の鼓室階への投与により、内溝細胞領域に新生有毛細胞が誘導されたが、数は少なく、また、外有毛細胞領域には全く新生有毛細胞を認めなかった。一方、DAPTの投与では、新生有毛細胞は認められなかった。セクレターゼ阻害薬は、半減期が短く、動物体温の条件下では失活しやすいことから、より高濃度の薬物を短期的に投与する方法が必要と考えられた。DAPTの中央階への1回注入を試みたが、新生有毛細胞の誘導は、現在のところ観察されていない。*in vitro*の環境を*in vivo*で再現するためには、より高濃度の薬物を投与することが必要となると考えられた。遺伝子改変マウスでのHes1発現に関する解析では、蝸牛支持細胞、前庭支持細胞、ラセン神経節に発現が認められた。特に、前庭で強い発現が認められ、前庭では、有毛細胞再生を誘導可能であることとの関連性が示唆された。サル蝸牛障害モデル作製については、シスプラチンの局所投与により、高度難聴を惹起できることが聴性脳幹反応を用いた解析より明らかとなった。

3) 内耳へのセクレターゼ阻害薬投与システムの開発

内リンパ嚢からの投与についてモルモットを用いて解析した。後頭蓋窩からアプローチし、内リンパ嚢を露出し、薬物の注入を試みたが、安定した蝸牛への薬物到達は得られなかった。

D. 考察

高濃度のセクレターゼ阻害薬の蝸牛感覚上皮への暴露が有毛細胞新生に必要であり、特に *in vivo* での高率な有毛細胞新生の実現のために解決すべき課題であることが明確になった。一方で、長時間の暴露は重要な因子ではないことが示唆された。また、内リンパ囊経由の投与方法が齧歯類では有効ではないことが示された。したがって、直接蝸牛内リンパ腔に高濃度のセクレターゼ阻害薬を注入する方法が、現段階では最も効果が期待できる方法と考えられた。また、*in vitro* と *in vivo* の結果に若干の乖離が認められることから、*in vivo* でのより詳細なセクレターゼ阻害薬の効果機序を解析することが必要であることが明らかとなった。このため、マウスを実験動物とした *in vivo* の実験をこれまでのモルモットを用いた実験と並行して行い、マウスモデルでは分子生物学的な解析を中心に行い、モルモットモデルで組織学的解析を進め、セクレターゼ阻害薬を *in vivo* で効果的に作用させるための方法を開発することが今後の課題となる。また、Hes1発現の遺伝子改変動物での解析から、蝸牛感覚上皮のみならず、前庭、ラセン神経節でも、それぞれ有毛細胞、神経細胞の再生にセクレターゼ阻害薬を応用できる可能性が示唆された。次年度には、これらの組織でのセクレターゼ阻害薬の効果についても詳細な解析を加える必要があると考えられた。

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る支持細胞から有毛細胞への分化転換のメカニズムが明らかとなり、分化誘導の実現に必要な条件が明らかとなった。また、*in vivo* では、より高濃度のセクレターゼ阻害薬を作用させる必要性が示唆され、投与方法として、蝸牛内リンパ腔への直接注入が必要であることが示唆された。さらに、セクレターゼ阻害薬投与による前庭感覚上皮およびラセン神経節での有毛細胞、神経細胞再生の可能性があることが示された。

F. 研究発表

1. 著書

1. Ito J, Endo T, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F. A New Method for Drug Application to the Inner Ear. In : Gusset Editor Takahashi. Meniere's Disease Recent Research Supported by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, ORL, Isehara-shi, Kanagawa: Kargar; 2005; 272-275.
2. 小島 憲：内耳再生へ向けての幹細胞・前駆細胞の応用. 再生医療 Vol.4 No.2, 33-38頁, メディカルレビュー社, 東京, 2005 .
3. 小島 憲, 伊藤壽一：難聴の最新研究 再生医学. 毎日ライフ 12月号, 55-57頁, 毎日新聞社, 東京, 2005.

2. 論文

1. Endo T, Nakagawa T, Kita T, Iguchi F, Kim TS, Tamura T, Iwai K, Tabata Y, Ito J. A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. Laryngoscope 2005; 115: 2016-2020.
2. Kim TS, Nakagawa T, Kitajiri S, Endo T, Takebayashi S, Iguchi F, Kita T, Tamura T, Ito J. Disruption and restoration of cell-cell junctions in mouse vestibular epithelia following aminoglycoside treatment. Hear Res 2005; 205: 201-209.
3. Tamura T, Kita T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Ishihara T, Mizushima Y, Higaki M, Ito J. Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. Laryngoscope 2005; 115: 2000-2005.
4. Kita T, Nakagawa T, Kim TS, Iwai K, Takebayashi S, Akaike A, Ito J. Serofendic acid promotes survival of auditory hair cells and neurons of mice. Neuroreport 2005; 16: 689-692.
5. 伊藤壽一：内耳への新しい薬物投与方法 -徐放性ドラッグデリバリーシステム-. 耳鼻臨床 98:1-4, 2005.

6. 伊藤壽一：内耳の再生医療. Drug Delivery System 20:96-104, 2005.
 7. 岩井浩治, 内藤 泰：内耳障害と再生医学シリーズ① 内耳障害の病態1. JOHNS 21:122-124, 2005.
 8. 岩井浩治, 中川隆之:内耳障害と再生医学シリーズ⑨ 内耳障害モデル. JOHNS 21:1424-1425, 2005.
 9. 岩井浩治, 伊藤壽一：内耳障害と再生医学シリーズ⑫ 内耳再生の臨床応用への展望. JOHNS 21:1830-1831, 2005.
 - 岡野高之,内藤 泰：内耳障害と再生医学シリーズ② 内耳障害の病態2. JOHNS 21: 256-259, 2005.
3. 学会発表
 1. Ito J, Nakagawa T. Cell therapy for inner ear disease. 5th International Symposium: The 5th International Symposium: Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders. Los Angeles, CA, USA. Apr 2-5, 2005.
 2. Ito J. A Novel Method to Inner Ear Drug Delivery - Experimental Study. The 18th World Congress of International Federation of Otorhino Laryngological Societies. Rome, Italy. Jun 25-30, 2005.
 3. Ito J, Nakagawa T, Kita T, Endo T, Tamura T, Iwai K, Matsuoka Y, Okano T, Tabata Y, Ishihara T, Higaki M. Local drug delivery to the cochlea by the biodegradable polymer and gel. The 42nd Workshop on Inner Ear Biology. Tubingen Germany, Sep 18-20, 2005.
 4. Ito J. Symposium: Tissue Engineering and Biomaterials in Otology. The 25th Politzer Society Meeting. Seoul, Korea. Oct 5-9, 2005.
 5. Ito J. Regeneration Medicine in the field of Otolaryngology. Yonsei University, Korea. Oct 11-12, 2005.
 6. Ito J. Regeneration Medicine for Inner Ear Diseases. The 8th Taiwan-Japan Conference in Otolaryngology Head and Neck Surgery. Taipei, Taiwan. Dec 16-18, 2005.
 7. Endo T, Nakagawa T, Kita T, Iguchi F, Kim TS, Tamura T, Iwai K, Tabata Y, Ito J. Novel strategy for treatment of inner ear disease using a biodegradable gel. The 5th International Symposium: Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders. Los Angeles, CA, USA. Apr 2-5, 2005
 8. Takebayashi S, Yamamoto N, Yabe D, Fukuda H, Tsuji M, Han H, Ito J, Honjo T. Analysis of Mint during inner ear development. The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington, DC, USA. Nov 12-16, 2005.
 9. Nakagawa T, Matsuoka Y, Kita T, Takebayashi S, Iwai K, Yamamoto N, Ito J: In vivo effects of pharmacological inhibitor of notch signaling on normal and damaged cochleae of guinea pigs. The 29th Midwinter Research Meeting in Otolaryngology. Baltimore, ML, USA. Feb 5-9, 2006.
 10. Yamamoto N, Tanigaki K, Tsuji M, Yabe D, Ito J, Honjo T: Inhibition of Notch/RBP-J signaling induces hair cell formation in neonate mouse cochleas. The 29th Midwinter Research Meeting in Otolaryngology. Baltimore, ML, USA. Feb 5-9, 2006.
 11. Kada S, Nakagawa T, Ito J: A mouse model for specific degeneration of the spiral ligament. The 29th Midwinter Research Meeting in Otolaryngology. Baltimore, ML, USA. Feb 5-9, 2006.
 12. Takebayashi S, Yamamoto Y, Yabe D, Fukuda H, Kojima K, Ito J, Honjo T: The effect of g-secretase inhibitor or TACE inhibitor to hair cell development in embryonic cochlear organ culture. The 29th Midwinter Research Meeting in Otolaryngology. Baltimore, ML, USA. Feb 5-9, 2006.

13. Matsuoka Y, Nakagawa T, Iwai K, Endo T, Kita T, Kim TS, Tabata Y, Ito J: Cochlea protection by local IGF-1 application using a biodegradable hydrogel. The 29th Midwinter Research Meeting in Otolaryngology. Baltimore, ML, USA. Feb 5-9, 2006.
 14. Mizukoshi M, Tamura T, Nakagawa T, Kita T, Endo T, Kim TS, Ishihara T, Higaki M, Ito J: Drug delivery to the cochlea using poly lactic/glycolic acid nanoparticles. The 29th Midwinter Research Meeting in Otolaryngology. Baltimore, ML, USA. Feb 5-9, 2006.
 15. 中川隆之, 喜多知子, 遠藤 剛, 田村哲也, 岩井浩治, 金 泰秀, 伊藤壽一: 生体吸収性徐放製剤を応用した内耳薬物局所投与. 第15回日本耳科学会. 平成17年10月20-22日. 大阪.
 16. 喜多知子, 中川隆之, 金 泰秀, 竹林慎治, 岩井浩治, 伊藤壽一: 新規神経保護活性因子セロフェンド酸による内耳保護効果. 第15回日本耳科学会. 平成17年10月20-22日. 大阪.
- 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
Ito J, Endo T, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F.	A New Method for Drug Application to the Inner Ear.	In : Guset Editor Takahashi. Meniere's Disease Recent Research Supported by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, ORL	272-275	Kargar	Iseharashi, Kanagawa	2005
小島憲 :	内耳再生へ向けての幹細胞・前駆細胞の応用.	再生医療	Vol.4 No.2, 33-38頁	メディカルレビュー社	東京	2005
小島憲, 伊藤壽一 :	難聴の最新研究 再生医学.	毎日ライフ	12月号, 55-57頁	毎日新聞社	東京	2005

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
Endo T, Nakagawa T, Kita T, Iguchi F, Kim TS, Tamura T, Iwai K, Tabata Y, Ito J.	A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel.	Laryngoscope	115: 2016-2020.	2005
Kim TS, Nakagawa T, Kitajiri S, Endo T, Takebayashi S, Iguchi F, Kita T, Tamura T, Ito J.	Disruption and restoration of cell-cell junctions in mouse vestibular epithelia following aminoglycoside treatment.	Hear Res	205: 201-209.	2005
Tamura T, Kita T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Ishihara T, Mizushima Y, Higaki M, Ito J.	Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles.	Laryngoscope	115: 2000-2005.	2005
Kita T, Nakagawa T, Kim TS, Iwai K, Takebayashi S, Akaike A, Ito J.	Serofendic acid promotes survival of auditory hair cells and neurons of mice.	Neuroreport	16: 689-692.	2005
伊藤壽一：	内耳への新しい薬物投与方法 - 徐放性ドラッグデリバリーシステム -.	耳鼻臨床	98: 1-4.	2005
伊藤壽一：	内耳の再生医療.	Drug Delivery System	20: 96-104.	2005
岩井浩治, 内藤 泰：	内耳障害と再生医学シリーズ① 内耳障害の病態1.	JOHNS	21: 122-124.	2005
岩井浩治, 中川隆之：	内耳障害と再生医学シリーズ⑨ 内耳障害モデル.	JOHNS	21: 1424-1425.	2005
岩井浩治, 伊藤壽一：	内耳障害と再生医学シリーズ⑫ 内耳再生の臨床応用への展望.	JOHNS	21: 1830-1831.	2005
岡野高之, 内藤 泰：	内耳障害と再生医学シリーズ② 内耳障害の病態2.	JOHNS	21: 256-259.	2005

A New Method for Drug Application to the Inner Ear

Juichi Ito Tsuyoshi Endo Takayuki Nakagawa Tomoko Kita Tae-Soo Kim
Fukuichiro Iguchi

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

Key Words

Hair cell · Spiral ganglion neuron · Regeneration ·
Drug delivery system · Biodegradable hydrogel

Abstract

Inner ear sensory cells are very susceptible to injuries and recovery after damage is very difficult. Recently several drugs including neurotrophic factors have been reported to protect against inner ear injury. The purpose of this experimental study is to find new methods for applying drugs to the inner ear that effectively protect against inner ear damage. Biodegradable hydrogel was used as a carrier for application of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) into the inner ear of guinea pigs through the round window membrane. After application of BDNF the number of surviving spiral ganglion neurons increased following injury of inner ear hair cells and spiral ganglion neurons by ototoxic treatment. This result indicates that BDNF provides effective protection against inner ear damage and that biodegradable hydrogel is useful for application of drugs to the inner ear.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Introduction

There are more than 300,000 deaf or highly hearing-impaired subjects in Japan. To provide effective treatment for this population is a great challenge in the field of otolaryngology. A major problem of developing therapeutic strategies for the treatment of inner ear diseases such as sensorineural hearing loss is the difficulty of application of effective drugs to the inner ear. One possible reason for this difficulty is limited blood supply to the inner ear and another is limited transportation of molecules from blood to inner ear tissues as well as to the brain. Sustained delivery of therapeutic molecules is another critical issue for the treatment of inner ear damage, because bioactive molecules usually require a certain duration for their pharmacological actions.

Neurotrophic factors or some other chemicals protect inner ear hair cells and spiral ganglion neurons (SGNs) from ototoxic drugs and aging [1, 2]. However, no viable way to apply drugs to the inner ear is established [3]. There are some reports describing the use of an osmotic mini-pump, but it requires middle and inner ear surgery. The use of virus vectors for drug application is also an effective way, however, the risk of virus toxicity is still a major problem for clinical use.

KARGER

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

© 2005 S. Karger AG, Basel
0301-1569/05/0675-0272\$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/orl

Juichi Ito, MD
Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery
Graduate School of Medicine, Kyoto University
Sakyo-ku, Kyoto 606-8507 (Japan)
Tel. +81 75 721 3850, E-Mail ito@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

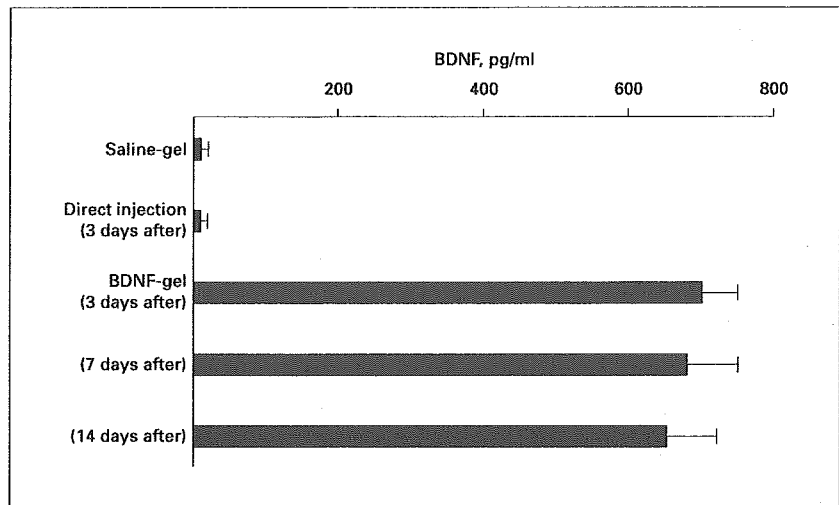


Fig. 1. Concentrations of BDNF in the perilymph.

The purpose of this study is to establish an effective drug delivery system for the inner ear. In this study we used biodegradable hydrogel as a carrier of therapeutic drugs [4]. Biodegradable hydrogel is made from ordinary hydro-gelatin. Biodegradable hydrogel is made from porcine skin type I collagen and is cationized by ethylenediamine and carbodiimide hydrochloride salt. Biodegradable hydrogel is harmless and the velocity of drug release as well as the drug concentration can easily be controlled. As there is no need for an extracorporeal device, it is already clinically used in the fields of bone regeneration and cartilage regeneration [5].

The aim of this study is to confirm the permeability of a neurotrophic factor (in this study we used brain-derived neurotrophic factor, BDNF) using biodegradable hydrogel through the round window membrane (RWM) and to estimate the protective effect of BDNF to the inner ear against ototoxic treatments using biodegradable hydrogel.

Materials and Methods

Experiment 1: Assessment of the Permeability of BDNF Using Biodegradable Hydrogel through RWM

Adult guinea pigs served as experimental animals. They were divided into three experimental groups. In the BDNF-hydrogel group, a piece of biodegradable hydrogel immersed in 84 µg BDNF was placed on the RWM. In another group, the same amount of BDNF was directly injected into the perilymph through the RWM. In the control group hydrogel immersed in physiologic saline was placed on the RWM. Three or 7 days postoperatively, BDNF concentration in the perilymph was measured by ELISA.

Experiment 2: Assessment of SGN-Protective Effect of Biodegradable Hydrogel Immersed in BDNF

Adult guinea pigs deafened by kanamycin (400 mg/kg, i.m.) and ethacrynic acid (25 mg/kg, i.v.) were used as experimental animals. Protective effects of SGNs against ototoxic treatments were investigated histologically and functionally. Histological analysis was performed by counting the number of SGNs in mid-modiolus frozen sections. Functional assessment was performed using electrically stimulated auditory brain stem response (EABR). On day 0, ototoxic drugs were applied. On day 18, hydrogel with BDNF was placed on the RWM. EABR was measured on days 21 and 24.

Results

Experiment 1: Assessment of the Permeability of BDNF Using Biodegradable Hydrogel through RWM

BDNF concentrations in the perilymph of BDNF-hydrogel animals 3 and 7 days after drug application, of animals receiving a single BDNF injection and of non-treated animals are shown in figure 1. High concentrations of BDNF in the perilymph were detected in the BDNF-hydrogel group, whereas very little BDNF was detected in the direct injection or control groups. Differences in BDNF concentrations of the perilymph between control and hydrogel groups, and between direct injection and hydrogel groups are significant. Biodegradable hydrogel permits the sustained delivery of BDNF into the inner ear.

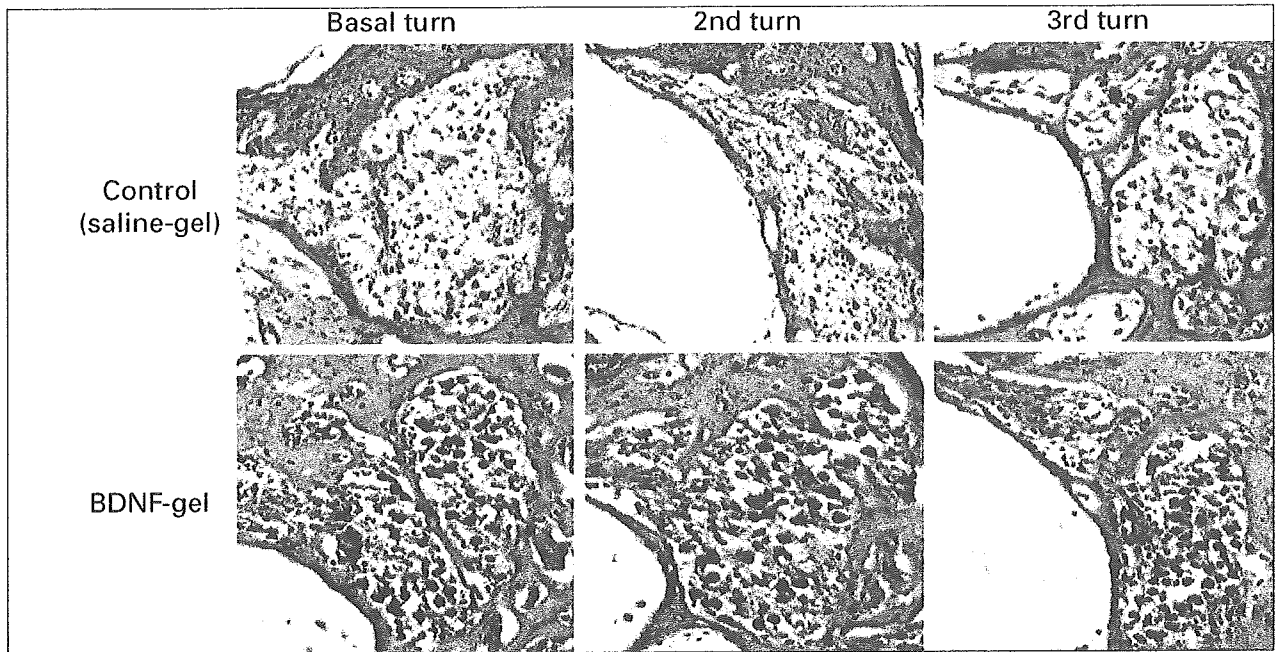


Fig. 2. Histological evaluation of the degeneration of SGNs in each turn of the cochlea 7 days after treatment with a hydrogel immersed in a BDNF solution or physiological saline alone. Hematoxylin-eosin staining.

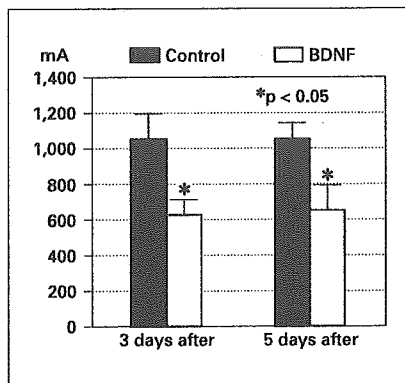


Fig. 3. Functional assessment of protective effects of BDNF application by hydrogel using EABR. The difference in alteration of EABR thresholds between BDNF and saline groups is significant 3 and 5 days after BDNF application.

Experiment 2: Assessment of Protective Effect on SGNs against Ototoxic Treatments Using Biodegradable Hydrogel through RWM

Figure 2 shows the histological evaluation of SGN degeneration in each turn of the cochlea 7 days after treatment with a hydrogel immersed in BDNF solution or physiological saline alone. There are significant differences in the number of surviving SGNs between control (saline) and BDNF groups in each turn. Degeneration of cells in Rosenthal's canal is apparent in control specimens compared with BDNF specimens. Figure 3 shows the numbers of surviving SGNs per unit area. There are significant differences between both groups. However, in the basal turn, the differences between both groups are very small.

Functional assessment of protective effects of BDNF application by the hydrogel against consecutive degeneration of SGNs was estimated by EABR. The difference in alteration in EABR thresholds between the BDNF and control (saline) groups is significant.

Discussion

Efforts to reduce inner ear damage, especially to inner ear hair cells and SGNs, will result in the recovery from sensorineural hearing disturbance and balance disorders. How to deliver drugs to the inner ear has been a major problem in the development of treatments for inner ear degeneration. The systemic application of drugs may be associated with side effects. The blood-inner ear barrier inhibits the transport of drugs from the serum to the inner ear [3]. The inner ear tissues are isolated from the surrounding organs by a bony construction, which makes drug application to the inner ear difficult. The inner ear is connected to the middle ear cavity by the RWM, and drug application through the RWM has therefore been considered as a possible route of drug application.

Some neurotrophic factors have been reported to protect against inner ear damage [1, 3]. To apply these chemicals to the inner ear an osmotic mini-pump [6] or a gene transfer method [7] by virus vectors was used. An osmot-

ic mini-pump is an effective drug application system, but it sometimes causes middle or inner ear injuries. Recent studies using virus vectors have shown no significant toxicity of these vectors; however, the risk of virus toxicity is still a major problem for clinical use. Compared to those methods, application by a biodegradable hydrogel requires only placing a hydrogel with effective drugs on the RWM and biodegradable hydrogel has no toxic effects, which is a great advantage for clinical application. In this study the protective effects of BDNF delivered by biodegradable hydrogel were also confirmed. The results of the present study indicate the successful development of a novel strategy for drug application to the inner ear and it is expected to develop into future clinical use.

Acknowledgment

This study was supported by Health and Labor Sciences Research Grants in Japan (Research on Measures for Intractable Diseases).

References

- ▶1 Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, et al: Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1657–1660.
- ▶2 Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, et al: Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuroreport* 2003;20:77–80.
- ▶3 Juhn SK, Rybak LP: Labyrinthine barriers and cochlear homeostasis. *Acta Otolaryngol* 1981; 91:529–534.
- ▶4 Tabata Y, Nagano A, Ikada Y: Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 1999;5:127–131.
- ▶5 Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y: Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 2003;24: 4375–4383.
- ▶6 Ylikoski J, Pirvola U, Suvanto J, et al: Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived neurotrophic factor from degeneration after noise trauma. *Hear Res* 1998;124: 17–26.
- ▶7 Yagi M, Magal E, Sheng Z, et al: Hair cell protection from aminoglycoside ototoxicity by adenovirus-mediated overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Hum Gene Ther* 1999;10:813–823.

内耳再生へ向けての 幹細胞・前駆細胞の応用

Potential therapeutic application of otic stem/progenitor cells for the damaged inner ear

Keywords

内耳幹(前駆)細胞
上皮成長因子
細胞移植
機能置換
再生医療

小島 憲

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
京都大学医学部附属病院 21世紀COE

Summary

The inner ear is composed of several types of cells, e.g. hair cells and ganglion neurons. Severe damages induce loss of hair cells and ganglion neurons, resulting in permanent hearing disorders, because in the mature mammalian inner ear sensory epithelia, regeneration of hair cells or ganglion neurons can not occur spontaneously. To access potentials of cell transplantation therapy for the damaged inner ear, we examined immunophenotypes of fetal rat otocyst cells that were cultured with inner ear sensory epithelia damaged by gentamicin. Immunohistological analyses showed that the damaged sensory epithelia induced the otocyst cells to express calretinin, one of hair cell markers, indicating that damaged sensory epithelia have potentials of induction of differentiation of the otocyst cells to the hair cell *in vitro*. The cell transplantation therapy may be a potential therapeutic approach for neural repair of the damaged inner ear.

はじめに

外界からの情報獲得の一つの手段として聴覚は非常に重要な役割を担う。高度の聴覚障害者は、わが国には数十万人存在するとされ、そのほとんどの症例は内耳が傷害された感音性難聴である。我々ヒトの内耳感覚細胞は一旦傷害されてしまうと中枢神経同様、再生することはないと言われている。そのため、一旦内耳感覚細胞が脱落してしまうと、その後一生難聴が続くことになる。

近年、さまざまな医療分野で再生医療の応用が期待されている。耳鼻科領域においても、内耳感覚細胞の分化に重要な遺伝子が同定されたり、成熟した哺乳類内耳での有毛細胞前駆細胞の存在が示され、将来再生医療により損傷内耳の機能修復が可能になるのではないかと期待されている。本稿では、内耳感覚細胞の前駆細胞に関しての最

Kojima, Ken

Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine
21st Century COE Program, Kyoto University Hospital
E-mail : kojimaken@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

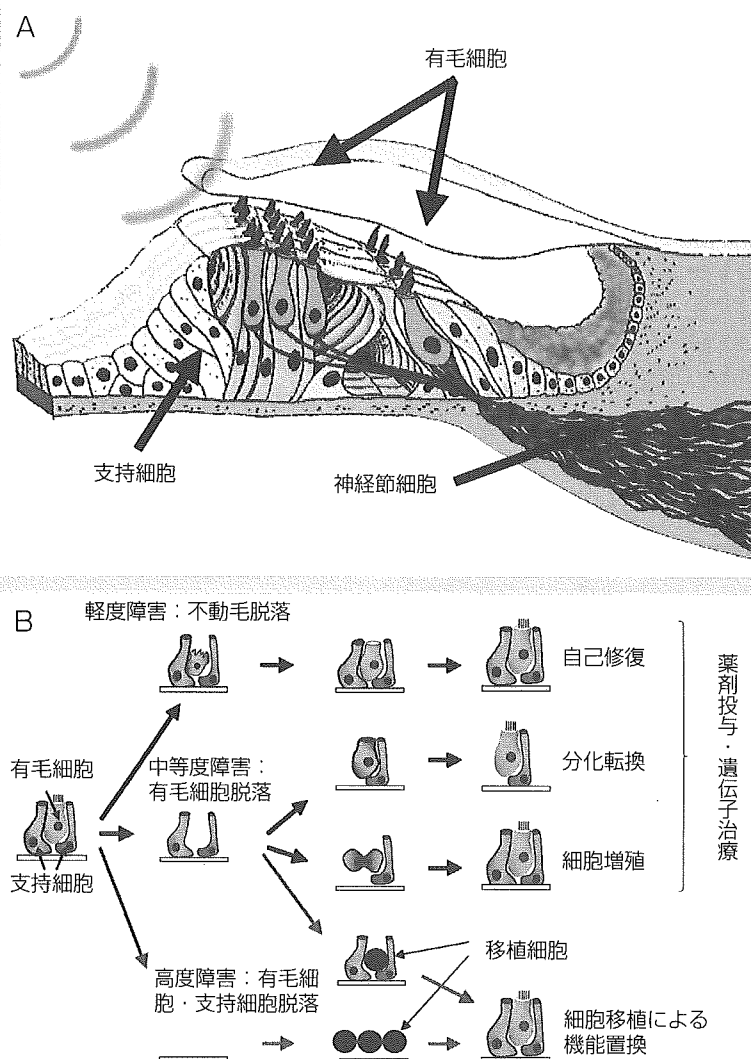
近の報告に我々の結果を交えて紹介する。

内耳修復に向けての戦略

声や音楽などの音情報は、外耳・中耳を経由し、内耳の蝸牛において電気

的・化学的な信号に変換され中枢に伝達される。最終的には大脳の聴覚野に至り音として認識される。蝸牛に存在する有毛細胞は音情報の電氣的・化学的信号への変換に、神経節細胞は変換された信号を中枢神経系への伝達に中心的な役割を果たす(図1 A)。内耳有毛細胞や神経節細胞は、薬剤や過大な音響、ウイルス感染により容易に脱落し、感音難聴をきたす。近年の人工内耳の発達により、ある程度らせん神経節細胞が残存している症例では聴覚の修復が期待されるようになった。しかしながら、いまだその効果も満足のものではないのが現状である。

我々ヒトと異なり、魚類や鳥類では内耳感覚器の再生が知られている。これらの動物からの知見よりヒトの内耳再生を目指して、3つの戦略が考えられている。すなわち、①支持細胞から有毛細胞への分化転換、②内耳感覚上皮細胞前駆細胞増殖・分化誘導、③移植細胞による機能置換である(図1 B)。2003年に、成熟したマウスの前庭器官に多能性をもつ幹細胞が存在するという発表があった¹⁾。蝸牛の障害後にもこのような細胞が残存していれば、①、②のような遺伝子導入や薬剤投与による聴覚再生が期待される。しかしながら、高度の障害を受けた内耳では、有毛細胞だけでなく支持細胞や前駆細胞も脱落するため、細胞機能を置換することのできる③の細胞移植療法が適応になると考えられる。この場合、内耳感覚上皮に分化する能力をもつ細胞(内耳幹細胞・前駆細胞)を豊富に確



A: 聴覚をつかさどる内耳感覚器(蝸牛)の仕組み, B: 内耳感覚細胞は再生しない→内耳機能再生へ向けての戦略

図1 内耳の音情報伝達にかかわる感覚器官である蝸牛を構成する細胞群

保しなければならない。

内耳幹細胞・前駆細胞

血球系だけでなく中枢神経系など、さまざまな臓器に多分化能をもつ幹細胞や前駆細胞が発見され、すでに一部では細胞移植療法として臨床応用されている。内耳では、厳密に幹細胞といえる細胞はいまだに同定されていない。その理由の一つには、内耳は構成する細胞数が少なく、同時に細胞の増殖能力が低いことから、細胞を分散し培養系を樹立することすら困難であったことが挙げられる。この問題を克服するために、不死化遺伝子を導入したマウスなどの内耳から有毛細胞前駆細胞の培養細胞系を樹立する試みがなされた²⁾⁻⁷⁾。

Holleyら³⁾は、温度感受性T抗原(DNA型癌ウイルスの初期遺伝子がコードする蛋白質)遺伝子の組み込まれたマウスの卵形囊から、Baraldら²⁾はウズラとマウスの耳胞から、Kalinecら⁶⁾は蝸牛から不死化した細胞を取り出した。これらの細胞は培養温度を変化することにより温度感受性T抗原の発現をコントロールし、細胞の分裂や分化を制御することが可能である。これらグループによると分化誘導することにより、不死化細胞から神経細胞の特徴をもつ細胞が出現した。この結果は内耳感覚上皮に神経系の前駆細胞が存在することを示唆する。一方、Rivoltaら⁴⁾が蝸牛から、Lawlorら⁷⁾、Zhengら⁵⁾は卵形囊から有毛細胞

に分化する能力をもつ細胞を得ている。このうち、Lawlorらの得た細胞は、後に有毛細胞とともに支持細胞に分化する能力をもつことが示され⁸⁾、内耳有毛細胞と支持細胞は共通の前駆細胞をもつことが示唆されている。これらの結果は、耳胞・耳板から内耳有毛細胞と支持細胞、神経細胞が発生する組織学的なアプローチから得られた知見やレトロウイルスを用いた細胞トレースの研究結果と一致する⁹⁾⁻¹¹⁾。一方、第8脳神経節を構成するグリアのほとんどは神経堤から発生するとされているが、前述のKalinecらは蝸牛の感覚上皮から有毛細胞の特徴をもつ細胞とともに、グリアの特徴をもつ細胞も得ている。この結果は、耳胞がわずかながらでも神経節に存在するグリアの形成にかかわっている可能性をうかがわせる。これらの研究から、有毛細胞・支持細胞・神経節細胞が前駆細胞を共有することが示唆されていた。

上皮成長因子(EGF)応答性胎仔耳胞細胞

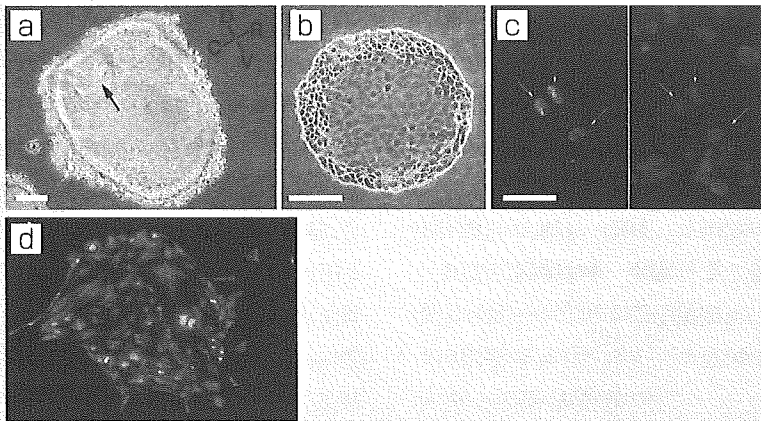
温度感受性不死化遺伝子を用いて内耳から得た細胞は、温度変化により増殖分化を制御することが可能であり、細胞の系譜の解析や発現遺伝子の解析などに有用なツールである。しかしながら、正常と同じ分裂・分化のメカニズムが働いているわけではないため、成長因子や細胞外マトリクスなど環境の影響を解析するには不向きと考えられるうえ、移植治療に用いるドナー細胞

としての応用は困難ではないかと思われる。この問題を解決するため、成長因子を用いて内耳から細胞を取り出す試みがされている。Malgrangeらは上皮成長因子(epidermal growth factor: EGF)または線維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor: FGF) 2を用いて新生仔ラット蝸牛から有毛細胞と支持細胞に分化する細胞を¹²⁾、Zhaoは皮膚のケラチノサイトを培養する方法を用いて、成熟したモルモットの蝸牛から有毛細胞に分化する細胞を得ている¹³⁾。

一方、我々はEGFを含んだ無血清培地を用いて、ラット胎仔(胎生12日)の耳胞から長期培養が可能な培養系を確立した(図2 a, b)¹⁴⁾。胎生12日の耳胞では蝸牛管の形成は認められず、未分化な細胞が豊富に含まれていると考えられる。我々はこの培養細胞(EGF応答性胎仔耳胞細胞)を用いて、①長期間培養系で未分化な性質を保つことができるのか、②どのような細胞に分化する能力をもつのか、以上2点について調べた。

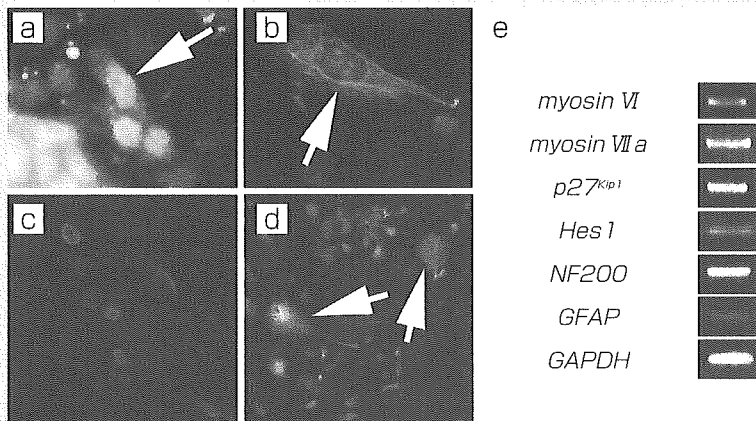
胎仔耳胞から得た細胞を3ヵ月間以上培養した後、分裂能を反映する核へのBrdUの取り込みを調べたところ、一部の細胞でBrdUの取り込みが観察された(図2 c)。また、大部分の細胞で神経幹細胞のマーカー蛋白であるネスチンの発現が認められた(図2 d)。これらの結果から、我々の用いた培養環境では、耳胞細胞は未分化な性質を維持できることが示された。

次いで、免疫染色およびRT-PCR法



a : 胎生 12 日ラット耳胞, Bar = 100μm, b : 増殖する耳胞細胞, Bar = 100μm, c : 緑 : BrdU を取り込んだ耳胞細胞の核, 青 : DAPI で対比染色された核, Bar = 50μm, d : ネスチン(赤)を発現する耳胞細胞, 青 : DAPI で対比染色された核 (文献 14 より引用改変)

図 2 耳胞細胞培養系を樹立(→巻頭 Color Gravure 参照)



a : 有毛細胞のマーカ myosin VII a(赤)を発現する細胞(矢印), b : 支持細胞マーカである cytokeratin(緑)と p27^{Kip1}(赤)を共発現する細胞(矢印), c : neuron specific enolase(神経のマーカ)を発現する細胞, d : 支持細胞マーカである GFAP が陽性の細胞(矢印), e : RT-PCR はそれぞれの細胞マーカが発現していることを示す。

図 3 耳胞細胞の分化誘導(→巻頭 Color Gravure 参照)

を用いて耳胞細胞の分化能力を調べた。内耳有毛細胞のマーカとして myosin VI と myosin VII a を, 支持細胞のマーカとして cytokeratin と p27^{Kip1}, Hes1 を, 神経細胞のマーカとして neurofilament 200kD (NF200) を, グリアのマーカとして glial fibrillary acidic protein (GFAP) を用いた。EGF 応答性胎仔耳胞細胞は, 培養密度を高くすることにより細胞分裂が抑制されて分化傾向になり, さまざまな特徴をもつ細胞が出現した。免疫組織では, 円柱状で核の遍在が認められた細胞では有毛細胞のマーカ myosin VII a の強い発現が(図 3 a), 扁平で多角形の細胞は 2 種類の支持細胞のマーカ cytokeratin と p27^{Kip1} の共発現が認められた(図 3 b)。また, 双極性の細胞では神経細胞のマーカ neuron specific enolase の発現を認め(図 3 c), グリアや支持細胞のマーカである GFAP が陽性の細胞(図 3 d) もみられた。RT-PCR では, 有毛細胞 (myosin VI, myosin VII a), 支持細胞 (Hes1, p27^{Kip1}, GFAP), 神経細胞 (NF200) の各マーカの遺伝子発現がみられた(図 3 e)。内耳は発生中期に外胚葉組織の肥厚したシンプルな耳板から複雑な膜迷路を形成する。内耳有毛細胞や支持細胞, らせん神経節細胞はいずれも耳板に由来し, 共通の前駆細胞(内耳幹細胞)が存在するのではないかと考えられている(図 4)。EGF 応答性胎仔耳胞細胞は, 高密度培養により内耳有毛細胞や支持細胞, 神経細胞への分化が誘導されたと考えられる。結果的に有毛

細胞，支持細胞，神経細胞の前駆細胞がこの培養系に含まれることが示されるとともに，内耳幹細胞が含まれている可能性もある。

障害内耳感覚器と耳胞の共培養

障害内耳のEGF応答性胎仔耳胞細胞への影響を観察するため，ゲンタマイシン処理した卵形嚢と共培養を行った。卵形嚢は生後3日目のラット前庭器官から得，ゲンタマイシンを含む培地で3日間培養することにより有毛細胞をあらかじめ傷害し脱落させた。耳胞細胞はEGFP遺伝子でラベルされており，蛍光により同定が可能である。共培養開始後14日目に培養卵形嚢を固定し，耳胞細胞が有毛細胞のマーカの一つであるカルレチニンを発現するか否か，免疫染色法を用いて検討した。ゲンタマイシン処理後の卵形嚢ではほとんどの有毛細胞は脱落していたが，共培養を行った卵形嚢ではEGF応答性胎仔耳胞細胞の一部が有毛細胞層内で生存し，カルレチニンを発現していた(図5)¹⁵⁾。耳胞細胞単独での培養ではカルレチニンの発現は認めなかったことから，障害内耳感覚器はEGF応答性胎仔耳胞細胞を有毛細胞様細胞へ分化誘導した可能性を示唆する。

内耳前駆細胞による移植治療の可能性と問題点

以上の結果から，EGF応答性胎仔耳胞細胞は傷害された内耳感覚器の影

響を受けて分化したと考えられる。神経幹細胞の移植による研究から，移植された神経幹細胞は移植先である中枢

神経組織内で神経細胞層に遊走し，分化することが知られている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。これらの結果は中枢神経同様，自発的には

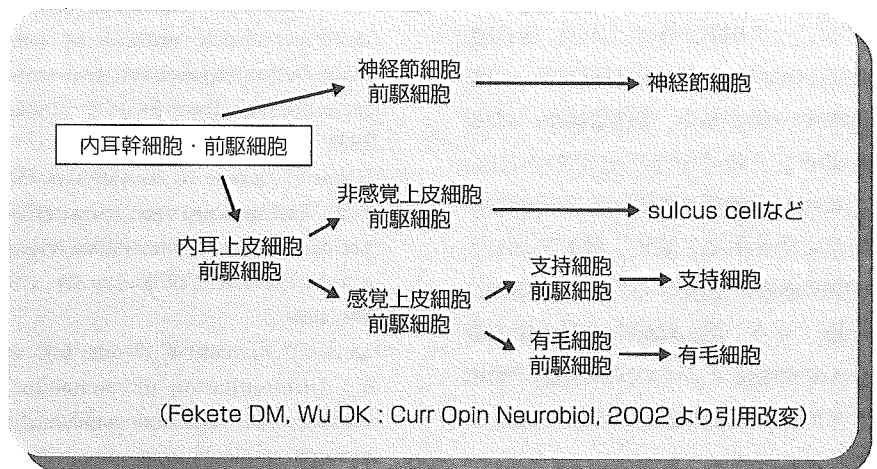


図4 内耳を構成する細胞の系譜

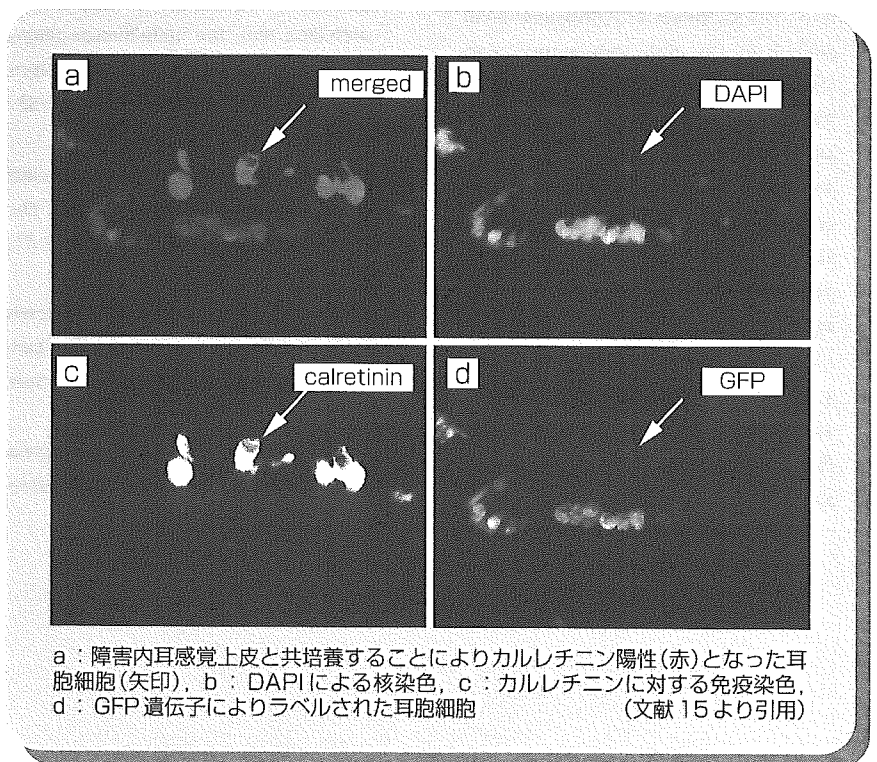


図5 EGF応答性耳胞細胞と障害内耳感覚上皮の共培養(→巻頭Color Gravure参照)