

厚生労働科学研究研究費補助金

内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川郁

平成19（2007）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築に関する研究	-----1
総括研究者 小川郁	
II. 分担研究報告	
1. 内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築に関する研究	----- 4
分担研究者 梅澤 明弘	
2. 内耳ドラッグデリバリーシステムに関する研究	
内耳細胞分裂に関する研究	----- 7
分担研究者 神崎 晶	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 9
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 14

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  
内耳性難聴に対する幹細胞移植システムの構築

### 研究要旨

内耳への骨髄幹細胞移植を行い、聴覚機能や形態学的解析を行った。さらに、本研究遂行のために臨床応用に向けた内耳ドラッグデリバリーシステムについて検討した。本研究の結果、内耳障害において再生に適した環境に関する知見を得ることができた。また、細胞移植に関しては、*in vitro*下では骨髄幹細胞から神経幹細胞転化させることは可能であったが、生体内の内耳で神経幹細胞が内耳幹細胞あるいは有毛細胞に分化させることが今後の課題と考えられた。

分担研究者 梅澤明弘 国立成育医療  
センター生殖医療研究部長  
分担研究者 神崎 晶 慶應義塾大学  
医学部耳鼻咽喉科助手

#### A. 研究目的

感音難聴の大部分を占める内耳性難聴は難治性であり、その病態を克服しうる内耳再生医療は根治的治療として重要な研究を行う。難治性である内耳性難聴の治療にむけて、間葉系幹細胞より分化した感覚細胞を内耳に投与することにより聴覚機能を回復させることを目的とする。さらに、本研究遂行のために、ヒト骨髄間質細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、細胞寿命の延長を行い、内耳移植モデルを用いた結果に基づき、臨床への探索的研究へ着手する。内耳性難聴は難治性であり人口の5%以上が内耳性難聴のためのコミュニケーション障害に悩んでいる。特に高齢者においては加齢変化により約34%が難聴者である。内耳性難聴の原因の80%は感覚細胞（有毛細胞）に障害がある。もし有毛細胞を生かせることが可能ならば、内耳性難聴の治療が期待できる。これらの聴力にかかわる社会的問題に対し、内耳機能の再生、維持は国民の健康、医療、福祉の向上、医療の観点からも急務であり、欠くことの出来ない問題となっている。

具体的には、1) 内耳障害における内耳微小環境を再生しやすい環境にすること、2) マウスやヒト間葉系幹細胞から分化させた神経幹細胞による内耳移植の検討をはじめ、3) 有毛細胞増殖と聴覚機能に関する研究、4) 再生を目的としたウイルスベクターによる遺伝子導入の解析、5) 臨床応用に向けた内耳内視鏡の開発研究を行うことを目的とする。特に下記2点である、

1) 内耳再生阻害因子と関連遺伝子に関する研究、2) 骨髄幹細胞移植について検討する。

脳・脊髄など神経領域では神経再生、軸索再生がIL-1、IL-6、TNF $\alpha$ など炎症性サイトカインによって阻害される。特に脊髄損傷においてIL-6阻害によって再生が促進されることが報告されており、内耳障害(音響障害)にも類似の変化が生じているのではないかと考えて検討する。また再生関連因子の発現についても検討した。

#### B. 研究方法

1) マウス内耳障害におけるサイトカインの発現をRT-PCR、western blottingなどによって検討する。

2) マウス音響障害難聴モデルに対して骨髄幹(KUSA-A1細胞)の内耳蝸牛へ直接投与を行い、有毛細胞の存在するコルチ器への生着を観察する。実験動物において間葉系幹細胞から分化させた内耳幹細胞を投与し、細胞の着床を含めたnetworkの形成と内耳の機能再生について検討する。ヒトあるいはマウス間葉系骨髄幹細胞を神経幹細胞に分化させてマウス内耳に移植する。

#### 倫理面への配慮

慶應義塾大学医学部及び国立成育医療センターにおいて倫理審査を受け、承認を受けている。(慶應義塾大学医学部承認受付番号12-22, 13-11)。

#### C. 研究結果

1) 内耳微小環境の変化の一部にIL-1, IL-6などのサイトカインの関与があった。さらに神経領域の知見なども含めて内耳再生を阻害している可能性が考えられた。また、同時に感音難聴における障害の程度を示すマーカーになりうる可能性も示唆している。

2) 骨髄幹細胞は生体外で神経幹細胞に分化

させた上で内耳に移植したところ、多くの細胞の生着を認めたが、一部骨に分化し、神経細胞へは分化していない。現在、生体外では骨髄幹細胞（KUSA-A1細胞）から神経細胞へ分化させる方法は確立しており、今後は生体内で神経系細胞へ分化させる因子の検討が必要である。

#### D. 考察

我々は有毛細胞の存在する内リンパ腔に骨髄幹細胞を投与したが、現時点では有毛細胞やらせん神経節の完全なる分化や再生には至っていない。しかしながら、これらを基盤に本研究を推進することにより、①有毛細胞が消失した部位に移植された幹細胞が着床することによる、聴力低下のある患者に対する自家ないし同種他家細胞を用いた内耳再生法の確立 ②ヒト骨髄間葉系細胞の寿命延長、増殖法の研究から得られる結果に基づくバイオインフォマティクスからの情報の蓄積、それらの方法の安全性、科学性、倫理性の確立を今後の課題としたい。分担研究者の神崎の報告のごとく、投与した細胞が分化あるいは再生しやすい環境についても検討を加えていく必要があるだろう。上記のシステムが確立されると同時に臨床応用が可能になるようにヒト内耳用内視鏡を開発に専心したい。

いままで内耳再生の視点で骨髄幹細胞の投与について論じたが、視点を変えてみると、中・内耳は骨で囲まれた組織であり、骨髄幹細胞が骨細胞に分化し、骨組織に変化することは内耳再生とは別に、慢性中耳炎や真珠腫性中耳炎などの中耳疾患に対するアプローチには有用であるかもしれない。この知見は中耳の再生医療として新たな選択肢になりうるかもしれない。

内耳に対する神経幹細胞移植が成功した。現在、どういう細胞に分化しているのか神経細胞系マーカーを用いて検討中である。

2) 内耳微小環境の変化の一部にIL-1, IL-6などのサイトカインの関与があった。

(1) さらに神経領域の知見なども含めて内耳再生を阻害している可能性が考えられた。また、同時に感音難聴における障害の程度を示すマーカーになりうる可能性をも示唆している。臨床応用に向けたヒト間葉系幹細胞から分化させた神経幹細胞を内耳に移植した。神経幹細胞の採取は、患者の脳神経からどのように細胞を採取すべきか、というドナーの問題がある。一方骨髄幹細胞は、すでに骨髄移植として臨床応用されている技術であり、その意味で実行性が高い。

(2) 内耳障害と微小環境の発見、内耳障害、再生を見据えた新しい創薬の開発に着手

できた。

(3) 内耳機能再生とは細胞レベルで再生させるだけではなく、組織学的から構造的に緻密な再生が必要であることを示すことができた。

(4) センダイウイルスベクターというRNAウイルスベクターというまた遺伝子毒性が低く、同時にヒトに対する感染性も低いにも関わらず、遺伝子導入効率は他のウイルスベクターと比較して高く、難聴に対する遺伝子治療にも有用であることを示すことができた。

(5) 内耳の特殊な解剖から考慮された内視鏡の形状やいかに明視できるかという点から解像度が考慮された。

#### E. 結論

基礎研究におけるマウス間葉系骨髄幹細胞の基礎的研究成果から、世界で初めてヒト間葉系骨髄幹細胞を神経幹細胞に分化させてマウス内耳へ移植を試すことができた。内耳再生医療を考える上で、いままで注目されていなかった再生阻害因子という概念を提唱した。

日本で開発され、動脈血栓閉塞症に対して治療が開始されつつあるセンダイウイルスベクターを用いて内耳遺伝子を検討することができた。内耳内視鏡を完成し、その可能性について試用することができた。

臨床応用にむけて予定した基礎研究の全てを達成することができた。骨髄間葉系幹細胞から分化させた神経幹細胞移植を中心に内耳再生、特に機能再生について述べた。再生阻害因子の研究をはじめ、内耳障害に関する新しい知見など周辺領域に派生する研究経過を得ることができた。

また、本研究成果を含めた市民講座を開催し200名以上の参加者に対して、感音難聴の現状を解説し啓蒙した。また、当研究室と患者さんとの会の取り組みは新聞にも紹介された。また、当該研究費受領期間において、分担研究者の一人である神崎が国際（耳科）学会であるPolitzer賞を受賞した。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表 論文発表

1. Kanzaki S, Shiotani A, Inoue M, Hasegawa M, Ogawa K, Sendai Virus Vector-Mediated Transgene Expression in the Cochlea in vivo. *Audiology and Neurotology* 2007;12:119-126
2. Kanzaki S, Ito M, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K. Hearing loss and ossicles

of osteoporosis in mice. *Bone* 2006 Aug;39(2):414-419

3. Kanzaki S, Araki Y, Okamoto Y, Kurita A, Ogawa K. Cholesterol granuloma surrounding the endolymphatic sac. *Auris Nasus Larynx* 2006 Aug 14 (in press)
4. Fujioka, M., Kanzaki, S., Okano, H. J., Masuda, M., Ogawa, K. and Okano, H., Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea, *J Neurosci Res*, 83 (2006) 575-83.
5. Masuda, M., Nagashima, R., Kanzaki, S., Fujioka, M., Ogita, K. and Ogawa, K., Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation, *Brain Res*, 1068 (2006) 237-47.
6. 神崎仁、佐藤美奈子、松永達雄、熊埜御堂浩、神崎晶、小川郁；突発性難聴の可逆性について 782-788 *Audiology Japan* 12月号、782-788、2006
7. 神崎晶、小川郁、音響外傷と遺伝子、音響外傷と薬物による影響特集JOHNS 7月号2006

## 2.学会発表

1. 水足邦雄, 藤岡正人, 藤井正人, 小川郁, 松永達雄, 急性内耳エネルギー不全による平衡機能障害と有毛細胞の微細構造変化 耳科学会 2006
2. 齊藤秀行(慶応義塾大学 医学部耳鼻咽喉科), 岡本康秀, 栗田昭宏, 松田明史, 佐

藤美奈子, 神崎晶, 小川郁 パルバの骨膜弁に皮質骨をつけた骨膜骨弁による外耳道再建, 耳科学会 2006

3. 瀧口洋一郎(北里研究所病院 耳鼻咽喉科), 松永達雄, 水足邦雄, 藤波義明, 藤井正人, 小川郁 急性内耳エネルギー不全による永久的聴力閾値上昇に対するアポトーシス阻害剤の聴力改善効果, 耳科学会 2006
4. 神崎晶, 小川郁, 骨粗鬆症モデル"opg欠損マウス"における耳小骨の形態と聴力に関する検討, 耳科学会 2006
5. 藤岡正人、藤波義明, 水足邦雄, 岡本康秀, 岡野James洋尚, 小川郁, 岡野栄之, 松永達雄、蝸牛外側壁において細胞内呼吸障害に続発する炎症反応・免疫応答の検討 耳科学会 2006
6. 新田清一, 栗田昭宏, 大石直樹, 田副真美, 佐藤美奈子, 斎藤秀行, 神崎晶, 弓削勇, 岡本康秀, 小川郁 カウンセリング用DVDを用いたTRTの治療効果 耳科学会 2006

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
  - 1) MR16-1における内耳障害の治療 (出願中)
  - 2) センダイウイルスベクターによる内耳遺伝子導入(予定)
  - 3) 薬剤投与用内耳内視鏡 (予定)
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築

分担研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部長

研究要旨：内耳性難聴は難治性であり特に高齢者においては加齢変化により約 34%が難聴者である。人口の 5%以上の人々が内耳性難聴によるコミュニケーション障害に悩んでいる。内耳性難聴の原因の 80%は感覚細胞（有毛細胞）に障害がある。もし有毛細胞を再生させることが可能ならば、内耳性難聴の治療が期待できる。これらの聴力にかかわる社会的問題に対し、内耳機能の再生、維持は国民の健康、医療、福祉の向上、政策医療の観点からも急務であり、欠くことの出来ない問題となっている。このような中で、本研究では難治性である内耳性難聴の治療にむけて、間葉系幹細胞から分化させた内耳幹細胞を投与し、細胞の生着を含めた network の形成と内耳の機能再生について分子レベルで検討し、内耳の聴覚機能を回復させることを目的とする。本研究の結果、音響障害難聴モデルマウスでの内耳関連遺伝子の動態を明らかにし、有毛細胞の障害と遺伝子発現との相関を示した。モデル動物への細胞移植では、*in vitro* 下では骨髄幹細胞から神経幹細胞に転化させることは可能であったが、生体内の内耳で神経幹細胞が内耳幹細胞あるいは有毛細胞に分化させることが今後の課題と考えられた。臨床応用可能な安全に移植した細胞の動態をモニターすることが Risovist®（鉄材）を用いることによって可能であることを示した。

### A. 研究目的

難治性である内耳性難聴の治療にむけて、間葉系幹細胞から分化させた内耳幹細胞を投与し、細胞の着床を含めた network の形成と内耳の機能再生について検討する。さらに、内耳性難聴モデルとして音響外傷マウスを作成し、内耳の有毛細胞や神経節細胞、支持細胞で再生に関連した遺伝子がどのような変化をおこしているかについて検討する。また本研究遂行のために、ヒト骨髄間質細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、細胞寿命の延長を行い、内耳移植モデルを用いた結果に基づき、臨床への探索的研究へ着手する。

### B. 研究方法

#### (1) 音響障害難聴マウスモデルにおける再生関連遺伝子の解析

マウスに音響暴露をおこなった後、内耳を摘出しそこから RNA を抽出した。えられた RNA より cDNA を合成し内耳関連および再生関連遺伝子の発現を PCR にて解析する。

#### (2) モデルマウスへの移植

マウス骨髄由来間葉系幹細胞 KUSA-A1 を同種マウス (C3H/He) 内耳に移植し、その生着を検討する。

マウス骨髄由来間葉系幹細胞 KUSA-A1 細胞を内

耳幹細胞へ分化誘導させた後、同種マウス (C3H/He) 内耳に移植し、その生着を検討する。

#### (3) 内耳機能の病理学的評価システム

移植後の内耳における病理組織学的な解析を推進する。光学顕微鏡レベルのみならず、免疫組織学的検討も同時に遂行中である。

#### 倫理面への配慮

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研

究を実施する(承認番号2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

## C. 研究結果

### (1) 音響障害難聴マウスモデルにおける再生関連遺伝子の解析

音響暴露によりマウスが難聴になっていることを聴性脳幹反応により確認した。音響障害3日後における内耳関連遺伝子の発現は低下が認められた。特に有毛細胞特異的な遺伝子の発現が音響暴露で半分以下と顕著な減少を示した。一方支持細胞特異的な遺伝子 *Hes1* の発現は軽微な低下であった。同じく支持細胞に発現し細胞周期停止を制御している *p27* 遺伝子の発現は約半分で、支持細胞中の幹細胞が増殖を引き起こしている可能性も考えられた。

### (2) モデルマウスへの移植

マウス骨髄間質細胞 (KUSA-A1細胞) を3日間神経分化誘導後、同系統マウスおよび音響外傷マウスへ移植したところ、移植細胞の生着を認めた。特に音響外傷により障害をうけた領域への移植細胞の生着が顕著であった。細胞注入(移植)は、正確に行うことが明らかとなった。生着した細胞は骨分化が認められた。

### (3) 病理学的評価システム

マウス内耳に細胞を移植するにあたり、移植した細胞の局在を解析する必要がある。そこで造影剤として臨床応用されている Risovist® (鉄材) を細胞に貪食させる方法を考案した。内耳に幹細胞を移植したことを組織学的に検出できることが確認できた。

## D. 考察

有毛細胞に分化可能であるヒト細胞を探し出すことが肝要である。有毛細胞の形態を試験管内にとることがむずかしいとしても有毛細胞のマーカーを発現するような分化誘導系を確立できることは極めて重要な意義がある。

細胞移植を行う場合に動物モデル内耳で移植細胞 (donor cells) を明確にできるマーカーを明らかにする必要がある。今回用いた Risovist® はそれを貪食した細胞では色素を含んでいるため組織学的に移植細胞の動態が検出可能であることが示せた。本造影剤はすでに臨床で応用されている薬剤であるため安全性も高い。臨床を

考える上で常磁性体である鉄を含んでおり細胞が内耳に集積していた場合、幹細胞が内耳に移植後生着しているかどうかを MRI でも検出可能であることが期待される。

動物モデルで移植した細胞は生着が認められたが、骨分化していた。in vitroでの神経誘導には20日以上を有する。今回神経誘導期間が3日間と短期であったことから今後さらに移植前の分化誘導条件について検証をする必要がある。投与した細胞が分化あるいは再生しやすい環境について、検討を加えていく必要があるだろう。

音響障害モデルでは内耳特異的な遺伝子の発現低下が顕著に認められ、聴力機能と関連していた。細胞移植後これら遺伝子の発現をモニターすることによって聴力機能回復のための分子基盤を明らかにできることが示唆された。

## E. 結論

マウス骨髄間質細胞 (KUSA-A1細胞) および神経幹細胞へ分化誘導させた KUSA-A1細胞を同系統マウス、ならびに音響外傷マウスへ移植した系において、病理組織学的な解析を行い、正確な細胞移植モデルを作成可能であることを示せた。また、臨床応用可能な安全に移植した細胞の動態をモニターすることが Risovist® (鉄材) を用いることによって可能であることを示した。移植細胞として間葉系細胞から有毛細胞を再生させることが可能ならば、内耳性難聴の治療の細胞移植供給源として期待することができる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol. Biol. Cell*, in press. 2007
2. Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing *Csx/Nkx2.5* and *GATA4* undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res*. in press. 2007
3. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y,

- Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. J Cell Biochem. in press. 2007
4. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesencymal stemcells. Inflammation and Regeneration 27(1):28-36. 2007
  5. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. Stem Cells. 24(10):2270-8. 2006
  6. Tanaka T, Umezawa A, Tsutsumi H. [Abnormalities in the development of adrenal gland] Nippon Rinsho. 28:Suppl 1:756-9. 2006
  7. Migita O, Umezawa A. [Disorders of pituitary gland development] Nippon Rinsho. 28:Suppl 1:206-11. 2006
  8. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL)cells and colony-forming units in spleen(CFU-S)following de nove formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossificaion. J. Cellular Physiology 208:188-194. 2006
  9. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. Endocrinology. 147(9):4104-11. 2006
  10. Kato S, Matsubara M, Matsuo T, Mohri Y, Kazama I, Hatano R, Umezawa A, Nishimori K. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-4 (LGR4, Gpr48) is essential for renal development in mice. Nephron Exp Nephrol. 104(2):e63-75. 2006
- I. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 特許取得  
なし
  - 2) 実用新案登録  
なし
  - 3) その他  
なし



## 内耳性難聴に対する細胞移植システムの構築

分担研究者 神崎 晶 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科医長

### 研究要旨

- 1) 幹細胞、遺伝子を投与する上で内耳ドラッグデリバリーシステムの構築は重要である。センダイウイルスベクターを用いた内耳遺伝子治療について検討した。また人口染色体による遺伝性難聴について検討した。明視下に内耳蝸牛窓に薬剤を投与するためのチャンネル付き内耳内視鏡を開発した。
- 2) Cyclin dependent kinase inhibitorであるp27が欠損したノックアウトマウスを用いて検討したところ、有毛細胞や支持細胞が異常増殖していたが、機能再生はできなかった。以上から細胞が増殖させるだけでは機能再生は難しく、細胞の配列や神経ネットワークが重要であると考えられた。

### A. 研究目的

#### 1) 遺伝子導入の検討

センダイウイルスベクターを用いて内耳遺伝子導入を試みた。また、細菌性人工染色体を用いた遺伝性難聴の治療が可能かどうか検討を行った。

#### 2) p27ノックアウトマウスを用いた形態と機能解析を通じて細胞分裂増殖が

内耳再生と関連があるかどうかを調べる

#### 3) 内耳内視鏡の開発

明視下に投与することができるようにチャンネルとレンズを付帯した、細い内視鏡を開発する。

### B. 研究方法

#### 1) 遺伝子導入

・正円窓経路による検討 モルモットに対してセンダイウイルスベクターを投与し、その遺伝子発現効率を観察する

・受精卵に対する検討 遺伝性難聴マウスモデルの形態と機能が改善するかを調べる。

#### 2) p27ノックアウトマウスに対する ABR を用いた機能解析と形態解析について

3) 内耳正円窓を明視しながら薬剤などを投与できる内視鏡を開発し、屍体側頭骨にて検討した。

倫理面への配慮

特に倫理面に問題なし

### C. 研究結果

1) センダイウイルスベクターは、支持細胞の遺伝子導入できる可能性が高かった。支持細胞は有毛細胞の前駆細胞として考えられており、再生医療に応用できることが示唆された。従来

用いられているアデノウイルスベクターに比べても感染効率は高かった。本ウイルスベクターの安全性は従来のものよりも高いと考えられており、臨床応用しやすい遺伝子運搬体である。

2) P27ノックアウトマウスによって有毛細胞と支持細胞共に増殖したが、配列は乱れ、聴覚機能も低下した。したがって、有毛細胞がただ増殖あるいは再生するだけでは内耳機能の再生には結びつかず、規則的な配列を保ち、従来存在する部位に有毛細胞が再生することが内耳機能再生を考える上で重要であることを示した。

3) 内視鏡を開発し、明視下にチャンネルを通じて薬剤を投与するための注射針を備えていることが特徴的である。実際に屍体側頭骨を使用し、正円窓窩まで針先が届くこと、内視鏡モニターで明視できることを確認することができた。

### D. 考察

センダイウイルスベクターには以下の2つの大きな特徴がある。1)他のウイルスベクターと異なり、RNAウイルスを基礎に開発されているため、遺伝子毒性genotoxicityが少ないこと、2)ヒトへの感染の報告がない。具体的には内耳へ幹細胞を投与した後、遺伝子導入によってより有毛細胞に分化させるかなど融合した方法が期待される。人工染色体を用いた方法は倫理的な問題はあるが、確実に機能と形態を正常化させた。

2) 細胞分裂によって有毛細胞や支持細胞は増殖しても機能再生しなかった理由として、神経ネットワークが構築されていないこと、細胞配列の乱れが考えられた。また増殖した細胞が正常な機能を保持しているかも不明であり、細胞分裂させることが内耳機能再生に重要であるかどうか再検討の余地がある。

## 3) 内耳内視鏡

本内視鏡の使用目的は、正円窓上を覆う結合織膜によって薬剤が通過しない場合があり、明視した上で結合織を針によって通過し、正円窓上に薬剤を滴下することが可能である。この技術は、薬剤投与ばかりでなく、急性感音難聴の一つである「外リンパ瘻」と呼ばれるリンパ液が外部に漏出する疾患などにも内視鏡の利用が応用できるだろう。

## E. 結論

遺伝子導入法または機能解析について検討した。国産のセンダイウイルスベクターは遺伝毒性が低い遺伝子担体である上に高率に遺伝子発現することが確認された。細胞分裂は内耳再生のために必要であるかどうか再検討する必要がある。臨床応用に向けて内耳投与用内視鏡を考案し、屍体を用いてその有効性を確認した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

## 論文発表

1. Kanzaki S, Shiotani A, Inoue M, Hasegawa M, Ogawa K, Sendai Virus Vector-Mediated Transgene Expression in the Cochlea in vivo. *Audiology and Neurotology* 2007;12:119-126
2. Kanzaki S, Ito M, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K. Hearing loss and ossicles of osteoporosis in mice. *Bone* 2006 Aug; 39(2):414-419
3. Kanzaki S, Araki Y, Okamoto Y, Kurita A, Ogawa K. Cholesterol granuloma surrounding the endolymphatic sac. *Auris Nasus Larynx* 2007 95-100
4. Kanzaki S, Beyer L, Karolyi IJ, Dolan D F, Probst FJ, Camper SA, Raphael Y. Transgene correction maintains normal cochlear structure and function in 6 month old *Myo15a* mutant mice. *Hear Res.* 2006 Apr;214(1-2):37-44.
5. Kanzaki S, Beyer LA, Swiderski DL, Izu mikawa M, Stover T, Kawamoto K, Raphael Y. p27 kipl deficiency causes organ of Corti pathology and hearing loss. *Hear Res.* 2006 Apr;214(1-2):28-36.
6. Fujioka M, Kanzaki S, Okano JH, Ogawa K, Okano H, Cytokine up-regulation mechanism of inner ear after noise exposure. *J neuroscience research* 2006;83(4):575-83.
7. Masuda M, Nagashima R, Kanzaki S, Ogita K, Ogawa K, Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation. *Brain res.* 2006 Jan 12;1068(1):23

## 書籍

Degeneration and regeneration in auditory system, Degeneration and regeneration in neuron. Kanzaki S, Signpost eds Yoneda Y. and Ogita K. Research Signpost, Kerala, India, 2006

## 学会発表

1. Kanzaki S, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K; Bisphosphonate Therapy Ameliorates Hearing Loss Due to Osteopenia in Mice Lacking Osteoprotegerin. 2007 ARO MidWinter Meeting, USA, Feb12, 2007
2. Kanzaki S, Shiotani A, Inoue M, Hasegawa M, Ogawa K; Sendai virus vector mediated transgene expression in the cochlea in vivo. 2006 ARO MidWinter Meeting, USA, 75, Feb 6, 2006
3. Kanzaki S, Ito M, Ogawa K, Matsuo K; Hearing loss and osteoporosis of auditory ossicles in mice. 25<sup>th</sup> Politzer meeting (Korea) 2005 Politzer Award 受賞
4. 神崎晶, 小川郁, 骨粗鬆症モデル“opg 欠損マウス”における耳小骨の形態と聴力に関する検討, 耳科学会 2006

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

## 特許申請

- 1) MR16-1における内耳障害の治療 (出願中)
- 2) センダイウイルスベクターによる内耳遺伝子導入 (予定)
- 3) 薬剤投与用内耳内視鏡 (予定)

- |           |    |
|-----------|----|
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

## 小川郁

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Kanzaki S, Shiotani A, noue M, Hasegawa M, <b>Ogawa K</b>	Sendai Virus Vector-Mediated Transgene Expression in the Cochlea in vivo.	Audiology and Neurotology	12(1)	119-126	2007
Kanzaki S, Araki Y, Okamoto Y, Kurita A, <b>Ogawa K</b>	Cholesterol granuloma surrounding the endolymphatic sac.	Auris Nasus larynx	34(1)	95-100	2007
Kanzaki S, Ito M, Takada Y, <b>Ogawa K</b> , Matsuo K.	Hearing loss and ossicles of osteoporosis in mice.	Bone	Aug;39(2)	414-419	2006
Okamoto Y, Matsunaga T, <b>Ogawa K</b> et al	Permanent threshold shift caused by acute cochlear mitochondrial dysfunction is primarily mediated by degeneration of the lateral wall of the cochlea.	Audiol Neurotol	10(4)	220-233.	2005
Fujioka M, Kanzaki S, Okano JH, <b>Ogawa K</b> , Okano H	Cytokine up-regulation mechanism of inner ear after noise exposure.	J.neurosci res	83(4)	575-583	2006
Masuda M, Nagashima R, Kanzaki S, Ogita K, <b>Ogawa K</b>	Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation.	Brain res	1068(1)	237-247	2006
Kanzaki S, Ito M, Takada Y, <b>Ogawa K</b> , Matsuo K.	Hearing loss and ossicles of osteoporosis in mice.	Bone	39(2)	414-419	2006
新田清一、栗田昭宏、小川郁	カウンセリング用DVDを用いたTRTの治療効果	Audiol Japan	49(5)	585-586	2006
弓削 勇、佐藤美奈子、新田清一、神崎 晶、齋藤秀行、岡本康秀、栗田明宏、小川 郁	TRT早期における音響療法での治療法別効果比較	Audiol Japan	49(2)	167-171	2006
小川郁	耳鳴治療の最前線－耳鳴と自律神経	ENTON I	49	12-15	2006
小川郁	診断の指針 治療の指針 耳鳴治療の最前線(解説)	総合臨床	56巻 1号	159-160	2007

小川郁	耳鳴診療のすべて 耳鳴診療の歴史 (解説/特集)	JOHNS	23巻1号	99-103	2007
小川郁	音響性難聴の要因と予防(Q&A)	日本医事新報	4298号	95-96	2006
小川郁	【高齢者の感覚器疾患 耳鳴り,難聴,めまいなどを中心に】 耳鳴り 高齢者の耳鳴り(解説/特集)	Geriatric Medicine	44巻6号	741-746	2006
新田清一, 小川郁	【耳鼻咽喉科・頭頸部外科 症候群事典】 Fechtner syndrome(解説/特集)	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	78巻5号	107	2006
新田清一, 小川郁	耳鼻咽喉科・頭頸部外科 症候群事典】 Eyring-Eisenberg syndrome(解説/特集)	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	78巻5号	106	2006
小川郁	【耳科画像診断マニュアル】 耳硬化症(解説/特集/抄録あり)	ENTON I	61	38-45	2006
小川郁	耳鼻咽喉科学 耳鳴の新しい治療 TRT(解説)	医学のあゆみ	216巻4号	315-316	2006
小川郁	進化する人工中耳・人工内耳(解説)	日本医事新報	4273号	28-32	2006

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小川郁	最新めまい・耳鳴り・難聴		最新めまい・耳鳴り・難聴	主婦の友社	東京	2006	37-52

## 梅澤明弘

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and <b>Umezawa A</b>	Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells	Mol. Biol. Cell,			2007 in press.
Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, <b>Umezawa A.</b>	Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells.	Exp Cell Res.			2007 in press.
Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, <b>Umezawa A.</b>	Hyaline cartilage formation and endochondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts.	J Cell Biochem.			2007 in press.
<b>Umezawa A</b> , Toyoda M.	MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells.	Inflammation and Regeneration	27(1)	28-36.	2007
Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, <b>Umezawa A</b> , Young MJ.	A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells.	Stem Cells.	24(10)	2270-8	2006
Tanaka T, <b>Umezawa A</b> , Tsutsumi H.	[Abnormalities in the development of adrenal gland]	Nippon Rinsho.	28;Suppl 1	756-9.	2006
Migita O, <b>Umezawa A.</b>	[Disorders of pituitary gland development]	Nippon Rinsho.	28;Suppl 1	206-11.	2006
Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and <b>Umezawa A</b>	Increased mobilization of c-kit <sup>+</sup> Sca-1 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> (KSL) cells and colony-forming units in spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification.	J. Cellular Physiology	208	188-194.	2006
Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, <b>Umezawa A</b> , Miyamoto K.	Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells.	Endocrinology.	147(9)	4104-11.	2006
Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuo K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, <b>Umezawa A</b> , Okano H, Takahashi T, Okuyama T.	Histopathological and behavioral improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intracerebral transplantation of neural stem cells.	Mol Ther.	13(3)	548-55.	2006
Kato S, Matsubara M, Matsuo T, Mohri Y, Kazama I, Hatano R, <b>Umezawa A</b> , Nishimori K.	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-4 (LGR4, Gpr48) is essential for renal development in mice.	Nephron Exp Nephrol.	104(2)	63-75.	2006

神崎晶

Kanzaki S, Araki Y, Okamoto Y, Kurita A, Ogawa K.	Cholesterol granuloma surrounding the endolymphatic sac.	Auris Nasus larynx	34(1)	95-100	2007
Kanzaki S, Shiotani A, Inoue M, Hasegawa M, Ogawa K	Sendai Virus Vector-Mediated Transgene Expression in the Cochlea in vivo.	Audiol and Neurotol	12(1)	119-126	2007
Kanzaki S, Ito M, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K.	Hearing loss and ossicles of osteoporosis in mice.	Bone	39(2)	414-419	2006
Kanzaki S, Beyer L, Karolyi IJ, Dolan DF, Probst FJ, Camper SA, Raphael Y	Transgene correction maintains normal cochlear structure and function in 6 month old <i>Myo15a</i> mutant mice.	Hear Res	214 (12)	37-44	2006
Kanzaki S, Beyer LA, Swiderski DL, Izumikawa M, Stover T, Kawamoto K, Raphael Y..	p27 kip1 deficiency causes organ of Corti pathology and hearing loss	Hear Res.	214 (12).	28-36	2006
Fujioka M, Kanzaki S, Okano JH, Ogawa K, Okano H	Cytokine up-regulation mechanism of inner ear after noise exposure.	J.neuroscires	83 (4)	575-83	2006
Masuda M, Nagashima R, Kanzaki S, Ogita K, Ogawa K	Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation	Brain res	1068 (1)	237-247	2006
Kanzaki S and Sakamoto M. Feb;120(2):e11. 08 Mar 2006	Ethmoid Sinolith	J.Laryngology and Otology	online version	-	2006
神崎 晶	耳硬化症（ここまでわかった遺伝子異常特集）	JOHNS 12月号	12月号	1701-1704	2006
神崎 晶、小川 郁	音響外傷と遺伝子、音響外傷と薬物による影響特集	JOHNS 7月号	7月号	1005-1007	2006
神崎 晶、小川 郁	EMG syndrome	耳鼻咽喉科頭頸部外科症候群事典	78(5)	104	2006
神崎 晶、小川 郁	Epstein syndrome	耳鼻咽喉科頭頸部外科症候群事典	78(5)	105	2006
神崎 晶	内リンパ嚢腫瘍に関するトピックス（最近のトピックス）	Equilibrium Research	65(1)	57-58	2006
神崎 晶	外耳道湿疹に対する治療	鼻アレルギーフロンティア	1月号	71-74	2006
弓削 勇、神崎 晶、小川 郁	先天性奇形に伴い両側顔面神経走行異常を認めた1症例	JOHNS	6月号	907-911	2006

弓削 勇、佐藤美奈子、 新田清一、神崎 晶、 齋藤秀行、岡本康秀、 栗田明宏、小川 郁	TRT早期療法における音響療法での治 療法別効果比較	Audiol. Japan	49巻 2号	167- 171	2006
--	-------------------------------	------------------	-----------	-------------	------

書籍

著者氏名	論文タイトル 名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kanzaki S	Degeneration and regeneration in auditory system	Yoneda Y. and Ogita K	Degeneration and regeneration in neuron	Signpost Research	India	2006	37-52
神崎 晶	外耳道湿疹の治 療のコツ	神崎 仁	耳疾患の診療 のコツ	中山書店	東京	2006	80-81
神崎 晶	MRI診断で初め て診断する側 頭骨病変につい て	神崎 仁	耳疾患の診療 のコツ	中山書店	東京	2006	116-117



Research paper

# p27<sup>Kip1</sup> deficiency causes organ of Corti pathology and hearing loss

Sho Kanzaki<sup>b</sup>, Lisa A. Beyer<sup>a</sup>, Donald L. Swiderski<sup>a</sup>, Masahiko Izumikawa<sup>a</sup>,  
Timo Stöver<sup>c</sup>, Kohei Kawamoto<sup>d</sup>, Yehoash Raphael<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Kresge Hearing Research Institute, The University of Michigan Medical School, MSRB III Room-9303, 1150 West Medical Center Drive, Ann Arbor, MI 48109-0648, USA

<sup>b</sup> Department of Otolaryngology, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-0016, Japan

<sup>c</sup> Department of Otolaryngology, Hannover University, Germany

<sup>d</sup> Department of Otolaryngology, Kansai Medical University, Osaka, Japan

Received 30 June 2005; received in revised form 30 December 2005; accepted 18 January 2006

Available online 2 March 2006

## Abstract

p27<sup>Kip1</sup> (p27) has been shown to inhibit several cyclin-dependent kinase molecules and to play a central role in regulating entry into the cell cycle. Once hair cells in the cochlea are formed, p27 is expressed in non-sensory cells of the organ of Corti and prevents their re-entry into the cell cycle. In one line of p27 deficient mice (p27<sup>-/-</sup>), cell division in the organ of Corti continues past its normal embryonic time, leading to continual production of cells in the organ of Corti. Here we report on the structure and function of the inner ear in another line of p27 deficient mice originating from the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. The deficiency in p27 expression of these mice is incomplete, as they retain expression of amino acids 52–197. We determined that mice homozygote for this mutation had severe hearing loss and their organ of Corti exhibited an increase in the number of inner and outer hair cells. There also was a marked increase in the number of supporting cells, with severe pathologies in pillar cells. These data show similarities between this p27<sup>Kip1</sup> mutation and another, previously reported null allele of this gene, and suggest that reducing the inhibition on the cell cycle in the organ of Corti leads to pathology and dysfunction. Manipulations to regulate the time and place of p27 inhibition will be necessary for inducing functionally useful hair cell regeneration.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Hair cell; Cell cycle; Deafness; p27<sup>Kip1</sup>; Mouse

## 1. Introduction

During embryonic development of the mouse cochlea, the transition from the proliferative stage to the period of hair cell differentiation starts around embryonic day (E) 13 (Chen and Segil, 1999; Lumpkin et al., 2003; Ruben, 1967; Woods et al., 2004). In normal mice, no new cells are added to the sensory epithelium after embryonic day 15. Several cell-cycle regulating proteins have been shown to participate in the transition from proliferation to differentiation. The genes encoding these proteins include p27<sup>Kip1</sup>

(p27), a member of the Cip–Kip family of cyclin-dependent kinases (Chen and Segil, 1999; Lowenheim et al., 1999), Ink4d (Chen et al., 2003) and the retinoblastoma gene Rb1, a tumor suppressor gene (Sage et al., 2005). Other genes that have not yet been identified may also be involved. Better understanding of the gene expression cascade leading to cell-cycle quiescence in the organ of Corti may be instrumental in finding ways to manipulate the cell cycle in this organ and design ways to induce generation of new hair cells to repopulate the deafened organ of Corti.

A previous study found that p27 is an important regulator of progenitor cell proliferation during development of the brain, retina and other tissues (Assoian, 2004). p27 was found to be upregulated during the late G2 or early G1 phase of the cell cycle (Koff and Polyak, 1995). Over-expression of

\* Corresponding author. Tel.: +1 734 936 9386; fax: +1 734 615 8111/647 2563.

E-mail address: [yoash@umich.edu](mailto:yoash@umich.edu) (Y. Raphael).



p27 in progenitor cells leads to their premature exit from the cell cycle (Tarui et al., 2005). A complete deletion of the gene leads to gigantism and excess proliferation in several tissues including hematopoietic, pituitary and ovarian cells (Fero et al., 1996). In the cochlea of mice lacking one or both alleles of p27, the proportion of mitotic cells in the cochlea is increased (Chen and Segil, 1999; Lowenheim et al., 1999). These mice exhibit excessive number of cells in the organ of Corti (Chen and Segil, 1999; Lowenheim et al., 1999) and impaired hearing (Lowenheim et al., 1999).

The deletion studies mentioned above examined the effects of a complete deletion of the gene (Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996). In this study, we examine the effects of a less severe mutation generated at the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Kiyokawa et al., 1996). This mutation is a partial deletion eliminating the first 51 amino acids, resulting in a hypomorphic allele with reduced ability to inhibit cyclin-dependent kinase activity (Kiyokawa et al., 1996). Our goal was to characterize the inner ear phenotype of transgenic mice with this incomplete p27 deficiency. Using acoustic brainstem response (ABR) audiometry, we determined that their hearing is severely impaired. Using SEM, TEM and cytochemistry, we determined that the sensory epithelium has pathological changes in both hair cells and supporting cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and genotype analysis

p27 deficient mice (Kiyokawa et al., 1996) were kindly provided by Dr. Koff (The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY). The genetic background of these mice was hybrid 129SvJ with C57Bl/6. The three different genotypes used were p27<sup>+/+</sup> (wild-type, normal control  $N = 4$ ), p27<sup>+/-</sup> (heterozygous  $N = 5$ ) and p27<sup>-/-</sup> (homozygous for the p27 deficiency  $N = 5$ ). Animal care and handling were approved by the University of Michigan Institutional Committee on the Use and Care of Animals and were performed using accepted veterinary standards. Mice were sacrificed at the age of 21 days (P21) and genotyped by PCR using tail DNA as previously reported (Kiyokawa et al., 1996), with the following DNA fragments: 294, 61 (bp) for p27<sup>-/-</sup>, 294, 223, 71, 61 (bp) for p27<sup>+/-</sup>, 223, 71 (bp) for wild-types.

### 2.2. ABR analysis

To assess ABR thresholds, mice (p27<sup>-/-</sup>  $N = 3$ ; p27<sup>+/-</sup>  $N = 3$ , and p27<sup>+/+</sup>  $N = 2$ ) were tested at 4, 10 and 20 kHz. Animals were anesthetized with mixture of xylazine (1.25 mg/g) and ketamine (62.5 mg/g). An active needle electrode was subdermally inserted at the vertex, along the dorsal midline of the scalp between the external auditory canals. The reference electrode was placed below the pinna of the left ear and the ground electrode was inserted below the contralateral ear.

The sound stimulus consisted of a 15 ms tone burst with rise–fall time of 1 ms. The sound stimuli were delivered from an encased, shielded Beyer earphone through a 13 mm tube into the ear canal. Response waveforms (100,000 gain, filtered from 0.3 to 3 kHz) were averaged (1024 epochs) using a Tucker Davis data acquisition system. The response threshold was defined as the interpolated value between the last level in which a response was presented and 5 dB lower where no response was observed.

We performed ANOVA to test for differences in ABR thresholds among the three genotypes at each frequency. Because three frequencies were tested, we used a Bonferroni-adjusted critical  $p$ -value of 0.015. When the ANOVA found a significant difference, unpaired  $t$ -tests were used to determine which genotypes were significantly different, again using a Bonferroni-adjusted critical  $p$ -value of 0.015.

### 2.3. Scanning electron microscopy (SEM)

We used two 21-day old animals from each genotype (p27<sup>-/-</sup>, p27<sup>+/-</sup> and p27<sup>+/+</sup>). Animals were anesthetized and perfused with 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.15 M cacodylate. Cochleae were removed and fixed in the same fixative overnight. Tissues were then incubated in 1% osmium tetroxide for 60 min. Samples were dehydrated in ethanol and critical point dried with CO<sub>2</sub> in a SamDri 790 (Tousimis, Rockville, MD). Samples were mounted on stubs, sputter coated with gold using Polaron 5100 (Polaron Equipment Limited, Watford Hertfordshire, UK) and examined on a Phillips FEI XL30FEG SEM. The entire cochlear length was analyzed and the images presented are from the lower apical turn.

### 2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

Cochleae from two mice of each phenotype (p27<sup>-/-</sup>, p27<sup>+/-</sup> and p27<sup>+/+</sup>) were used. Animals were anesthetized and perfused with 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.15M cacodylate. Cochleae were removed, osmicated (as above) and decalcified until soft (approximately one week). Tissues were stained with aqueous uranyl acetate, dehydrated in ethanol followed by propylene oxide, and embedded in Embed 812 epoxy resin (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). Epon blocks were sectioned using a Leica Ultracut R ultramicrotome using a diamond knife (slice thickness; 80 nm). Sections from the lower apical turn were collected on grids (Electron Microscopy Sciences, 200 Hex mesh T/B). The grids were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined on a Phillips CM 100 TEM.

### 2.5. Whole-mount analysis

We used a phalloidin stain to label F-actin in the tissue in order to enhance identification of cell types and their organization in the sensory epithelium (Raphael et al.,

1994b) and Hoechst to stain DNA and visualize nuclei (Raphael, 1993). Animals (three from each genotype) were deeply anesthetized, decapitated, and their temporal bones were removed. The cochleae were excised, the bony capsule removed and tissues were fixed in 4% paraformaldehyde for 2 h. Further dissection was performed to remove the lateral wall tissues and the tectorial membrane. The samples were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 5 min, and incubated for 30 min in rhodamine conjugated phalloidin (Jackson Immunoresearch, West grove, PA) diluted 1:100 in PBS. Stained whole-mount of the apical turn were mounted on microscope slides with Crystal/Mount (Biomedica, Foster City, CA), and examined with a laser scanning confocal microscope (BioRad MRC600) with a  $63\times$  N/A 1.4 objective attached to Nikon Diaphot microscope. Z-series images ( $1\ \mu\text{m}$  interval) were taken at the lower apical turn, starting from the apical luminal aspect of the sensory epithelium, spanning the entire epithelial layer and terminating at the extracellular matrix beneath the epithelium. Files were converted and stored as TIFF files. The Z-series stack was then converted to individual image files using NIH Image.

Two ears of each genotype were also stained with Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) and photographed with epi-fluorescence (Leica DMRB upright photomicroscope) at several focal planes. Images at the UV wavelength were obtained from the lower apical turn with a digital monochrome Spot camera (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI). The number of nuclei in the outer hair cell area was counted in all focal planes of the epithelium.

### 2.6. Image processing

We used Adobe Photoshop for adjustment of image contrast, insert symbols and letters for labels and crop images for preparation of figure panels.

### 3. Results

Confocal microscopy images of phalloidin stained whole-mounts of the organ of Corti reveals that the homozygous mutant mouse ( $p27^{-/-}$ ) has hair cells and supporting cells, but that their organization and appearance are abnormal (Fig. 1A). In several locations along the cochlear duct, two rows of inner hair cells and four rows of outer hair cells were observed, rather than the normal one and three rows, respectively. The morphology of the supporting cells in  $p27^{-/-}$  is also abnormal. This is most evident in the pillar cells, where the thick actin filaments near the apical surfaces of the cells are disorganized. In heterozygotes ( $p27^{+/-}$ , Fig. 1B), the organization of the mosaic of the auditory epithelium is much closer to that seen in the wild-type ( $p27^{+/+}$ , Fig. 1C). The  $p27^{+/-}$  mice display a nearly normal organization of hair cells, but the junctional actin in supporting cells is slightly altered, especially in pillar cells. In wild-type animals (Fig. 1C) the organization of

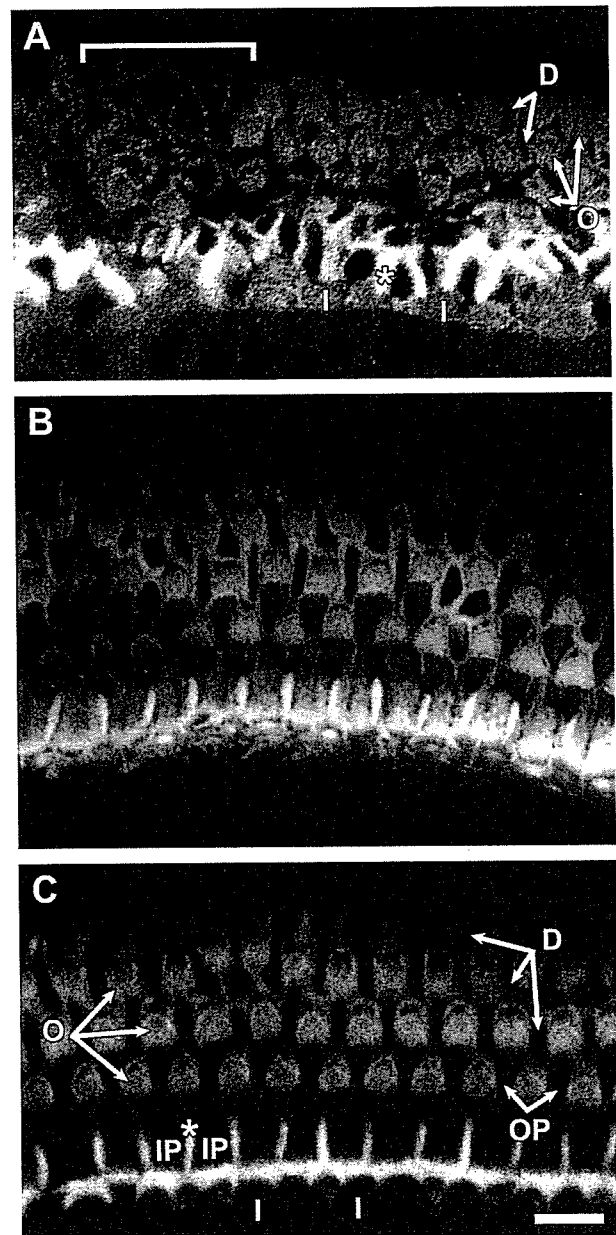


Fig. 1. Confocal microscopic images of phalloidin stained whole-mounts of the organ of Corti from  $p27^{-/-}$  homozygous mutant (A),  $p27^{+/-}$  heterozygous (B) and  $p27^{+/+}$  wild-type (C) mice. A: Several outer hair cells are missing (bracket). Remaining outer hair cells (O arrows point to outer hair cell rows 1–3) are in disarray. The actin bundles which represent intercellular junctions between inner pillar cells reveal disorganization of the apical portions of pillar cells (asterisk). The typical dumbbell shape of the Deiters cell apical surface is abnormal (D arrows). I denotes inner hair cells. B: Outer hair cell and pillar cells are closer to normal but their organization is imperfect. C: Actin bundles depict the typical normal organization of hair cells and supporting cells of the organ of Corti. D arrows point to three rows of Deiters cells, O arrows point to three rows of outer hair cells, OP point to outer pillar cells, IP denotes inner pillar, asterisk points to the junctional actin between inner pillar cells, I marks inner hair cell. Scale bar:  $10\ \mu\text{m}$ .

the pillar cells and the rows of hair cells is regular and the number of cells in each row is usually constant, with one row of inner hair cells and three rows of outer hair cells.

The nuclei of the auditory epithelium were analyzed in whole-mounts of the organ of Corti of wild-type and  $p27^{-/-}$  animals. Nuclei in the outer hair cell area of the normal organ of Corti are round and arranged in clear and distinctive three rows, visible beneath the luminal surface (Fig. 2). Immediately beneath the three rows of outer hair cell nuclei, are the Deiters cell nuclei. Moving further towards the basilar membrane reveals a dense aggregation of spindle-shaped nuclei representing mesothelial cells residing underneath the epithelium, lining the scala tympani (Fig. 2D). Thus, two distinct rows of nuclei are observed above the mesothelial layer in the outer hair cell area of the normal cochlea. In the  $p27^{-/-}$  mutant ears (Fig. 3), hair cell nuclei were seen in three rows of that were somewhat less well organized than in the normal ear (Fig. 3B, compare to Fig. 2B). The contour of the nuclei was nearly round but many nuclei showed slightly distorted shape (Fig. 3B). When observing lower focal planes (towards the basilar membrane), the  $p27^{-/-}$  ear contained numerous nuclei at all focal planes under the luminal surface (Fig. 3C–E). Thus, nuclei in the Deiters

cell area appeared to be present at more than one focal plane.

Nuclei were counted in an area measuring  $50 \times 50 \mu\text{m}$  in the outer hair cell region. Counts in three such areas averaged a total of 43 nuclei in the wild-type animals versus 68 nuclei in  $p27^{-/-}$  animals, representing an increase of more than 50%. Because some hair cell loss is already apparent at this age, we infer that the increase in the number of nuclei represents mostly an increase in the number of supporting cells (Fig. 1A).

SEM confirms the presence of supernumerary hair cells and disorganized apical surface of supporting cells (Fig. 4). In the  $p27^{-/-}$  ears, the normal organization of pillar and Deiters cells could not be observed (Fig. 4A). The  $p27^{+/-}$  ears (Fig. 4B) exhibited an intermediate phenotype between the wild-type and the  $p27^{-/-}$  ears. Individual hair cells did not appear perfectly normal in the mutant animals (Fig. 5) but the differences between normal wild-type ears and mutants was not as marked as that seen in supporting cells.

In cross sections, no tunnel of Corti or Nuel space are observed (Fig. 6). Instead, numerous cells occupy these

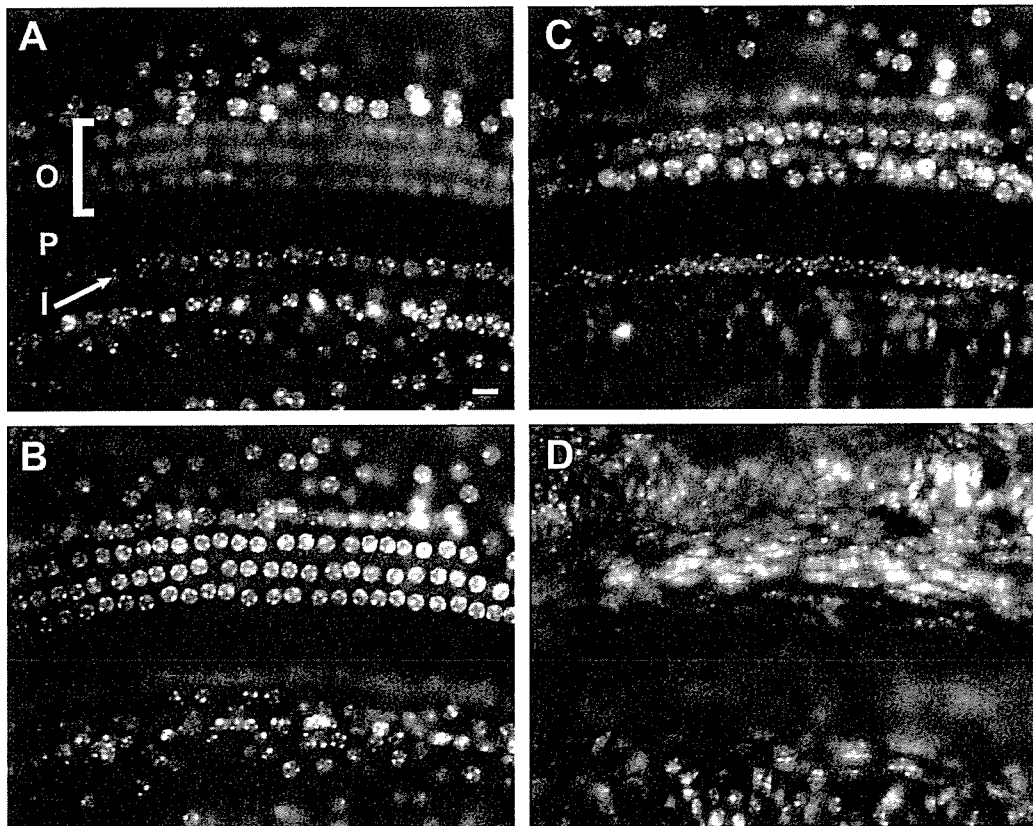


Fig. 2. The normal organ of Corti contains two distinctive planes of nuclei in the outer hair cell area. Whole-mounts of the organ of Corti of a wild-type  $p27^{+/+}$  mouse stained with Hoechst and photographed at four focal planes starting above the nuclei of outer hair cells (A) and descending towards the area under the basilar membrane (D). A: nuclei of inner hair cells (I) and Hensen cells (at upper end of bracket) flank the outer hair cell area above the focal plane of outer hair cell nuclei (P shows area of pillar cell heads). B: Outer hair cell nuclei are arranged in three distinctive and well organized rows. The perimeter of outer hair cell nuclei is round and smooth. C: At a lower focal plane, nuclei of Deiters cells (supporting cell) are clearly identified. Nuclei of these cells are slightly larger than outer hair cell nuclei. D: The next set of nuclei visible under the Deiters cell nuclei are spindle-shaped nuclei of mesothelial cells residing under the basilar membrane. Scale bar (in A, for A–D):  $10 \mu\text{m}$ .

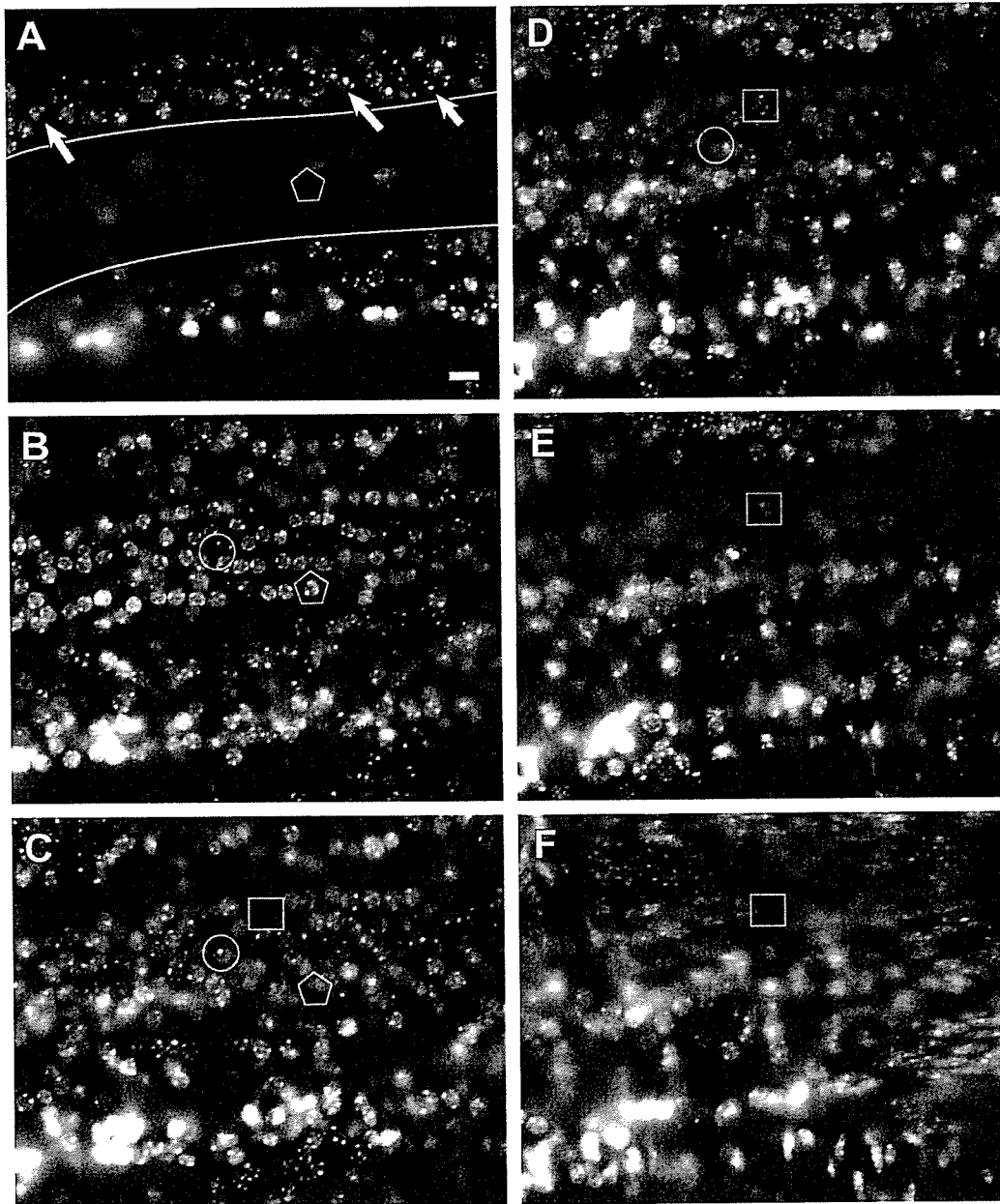


Fig. 3. In the outer hair cell area of  $p27^{-/-}$  mice the nuclei are spread throughout the epithelium at all focal planes, as depicted by Hoechst stained whole-mount photographed at six different planes (A–F) from just under the luminal surface (A) to under the basilar membrane (F). A: Immediately beneath the luminal surface there are no visible nuclei in the outer hair cell area (between the border lines) but Hensen cell nuclei are seen in the lateral aspect of the organ of Corti (arrows) and inner hair cell nuclei are in the medial side. The pentagon is a selected area with no nucleus, corresponding the nucleus present in B. B: Outer hair cell nuclei appear at a lower focal plane. The perimeter of the nuclei is slightly rough and the spherical shape is less well defined than in normal mice (compare to Fig. 2B). The circle depicts an area with no nucleus, corresponding to the area in C where a nucleus appears. C: Numerous supporting cell nuclei are visible under the level of the outer hair cell nuclei. Supporting cell nuclei are slightly larger than outer hair cell nuclei. The square introduces an area devoid of a nucleus, in which a lower focal plane will contain a nucleus (in D). D: Many additional supporting cell nuclei are seen in a lower focal plane. E: A lower focal plane in which most nuclei shown in D disappear, and others appear. This is the lowest focal plane in the epithelium, immediately above the basilar membrane. F: Spindle shape nuclei (mesothelial cell nuclei) appear at a lower focal plane just beneath the basilar membrane. Scale bar (in A, for A–F): 10  $\mu$ m.

fluid spaces (Fig. 6A). These cells could be pillar cells and Deiters cells and/or progenitor cells that are in the process of differentiating or dividing. The morphology of outer hair cells is pathological (Fig. 6A) but inner hair cells appear relatively normal (Fig. 6A and B). Supporting cell nuclei

are not restricted to a single focal plane below the row of outer hair cell nuclei, but instead, they are observed in multiple levels in the epithelium (Fig. 6A, compare to Fig. 3C–E). Some of the supporting cell nuclei reside in the basal region of the epithelium, adjacent to the basilar