

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-一般-009)

内耳有毛細胞の再生による難聴の治療

平成 18 年度総括研究報告書

平成 19 年 3 月

主任研究者 伊藤 壽一

(京都大学大学医学研究科)

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	1
伊藤 壽一	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 12

III. 研究成果の刊行物 15

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遂行した。

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ちうる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、PLGA 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) セクレターゼ阻害薬は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。

平成 18 年には、トランスジェニックマウスから得た蝸牛器官培養を用いてノッチ情報伝達系が内耳発生において重要な役割をしていることとセクレターゼ阻害薬で確かにノッチ伝達系が操作されていることを確認した。In vitro での詳細な解析により、ノッチ情報伝達系が

内耳有毛細胞発生において複雑な役割を果たしていることが明らかになった。in vivo 蝸牛投与では、投与薬剤と投与スケジュールの最適化を行った。さらに人への応用の前段階として、霊長類であるサルを用いて実験を進めるための内耳傷害モデルを作成し、内耳傷害の程度を定量的に評価した。ヒトにおいて安全・簡便に行えるようにするため、ヒト側頭骨標本を用いて、経鼓膜的に極細径中耳内視鏡で正円窓窩・正円窓膜を操作する方法と、乳突削開・後鼓室解放によって内耳にアプローチする方法を比較した。また、成人で経鼓膜的に極細径中耳内視鏡を用いてどの程度操作できるかを検討した。

分担研究者

中川 隆之

小島 憲

(京都大学医学部附属病院)

Raj Ladher

(理化学研究所 発生・再生科学総合
研究センター)

中村 一

(大津赤十字病院)

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歳以上人口の約半数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) 蝸牛におけるノッチ情報伝達系の役割・セクレターゼ阻害薬の効果

Hes1/Hes5 レポーターマウスは、それぞれノッチの下流分子である Hes1 または Hes5 の発現に伴って短時間分解型の EGFP を発現するトランスジェニックマウス (pHes1-d2EGFP、pHes5-d2EGFP) である。これらを用いて、胎生及び生後のマウス内耳における Hes1/Hes5 の分子の発現を経時的に調べた。また、トランスジェニックマウスの生後の内耳の器官培養を用いて、セクレターゼ阻害薬の作用を解析した。

ノッチ情報伝達系を含め、様々な分子が有毛細胞の正常発生に関与しているが、これを明らかにすることのできる蝸牛器官培養の無血清培養を確立した。胎生 14.5 日、または 17.5 日の正常マウスの蝸牛器官培養に対して時間特異的にセクレターゼ阻害薬を用いることで、ノッチ情報伝達系が蝸牛有毛細胞・支持細胞の分化と増殖

に対してどのような役割を果たしているかを調べた。

2) in vivo でのセクレターゼ阻害薬投与の最適化

モルモットを実験動物とし、セクレターゼ阻害薬 DAPT と MDL28170 を内リンパ腔への 1 回投与、外リンパ腔 (鼓室階) への 1 回投与、外リンパ腔への 7 日間持続投与という 3 つの方法で投与し、支持細胞から有毛細胞への転換効率を比較検討した。実験に使用したモルモットは、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って有毛細胞障害を起こすことで聾とした。外リンパ腔への持続投与に際しては、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ことで確実な持続投与ができるように工夫した。結果は聴性脳幹反応 (ABR) による機能評価と組織学的検査で解析した。カナマイシン・エタクリン酸投与前後でのノッチとそのリガンドの発現は免疫組織化学染色で調べた。

3) 霊長類での内耳傷害モデル

本学の動物倫理委員会への申請を行った上で、サルを用いた再生実験を開始した。まず内耳傷害モデルを作成した。通常ヒトで人工内耳挿入時などに行う後鼓室解放術の手技で正円窓窩にアプローチし、正円窓膜上に内耳毒薬剤であるシスプラチンを浸潤させたジェルフォームを留置した。4 週間後の聴性脳幹反応 (ABR) の閾値上昇と組織学的検査によって内耳傷害の程度を評価した。

4) ヒト側頭骨標本を用いたヒトでの投与方法の評価

ヒトにおいてこれらの治療を行う場合、可能な限り低侵襲で蝸牛内腔に薬剤を投与す

る経路を検討する必要がある。ここでは、極細径中耳内視鏡を用いて経鼓膜的に正円窓窩にアプローチする方法と乳突削開によるアプローチについて、側頭骨標本 (20 耳) を用いて解剖学的検討を行った。また他疾患で鼓膜切開の必要のあった患者 (2 例) について、同内視鏡を用いて実際に経鼓膜的に正円窓窩と正円窓膜が観察でき、操作できるかどうかを調べた。

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・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) 蝸牛におけるノッチ情報伝達系の役割・セクレターゼ阻害薬の効果

Hes5 レポーターマウスを用いて Hes5 の発現をマウス蝸牛について経時的に調べたところ、Hes5 は胎生 16.5 日頃には支持細胞に強く発現しており、生後 3 日頃には支持細胞とコルチ器内側の greater epithelial ridge に発現していたが、その後減弱した。Hes1 は生後直後までに弱く発現するのみであった。また、生後 3 日の Hes5 レポーターマウスの蝸牛器官培養に対してセクレターゼ阻害薬 DAPT を用いたところ、12 時間以内に Hes5 の発現は抑制された。これらによって、蝸牛において Hes5 はノッチ下流の分子として主要な働きをしており、セクレターゼ阻害薬によってノッチによるシグナルを阻害したことが確認された。しかし、このデータからはその効果は生後時間がたつと期待しにくいことも予想され、実際の臨床応用については注意を要することが分かった。

他に、内耳前庭器の卵形囊では生後 60 日

まで、ラセン神経節では生後3日までHes1、Hes5とも発現が見られ、器官培養でDAPIがそれぞれの発現を抑制した。よって、ノッチ情報伝達系の抑制による有毛細胞再生が蝸牛だけでなく、前庭器やラセン神経節でも行える可能性があることが示された。

マウスの未分化な内耳（耳胞）を不確定因子である血清を入れることなく長期培養して有毛細胞まで発生させることができたことが分かった。この培養系で胎生17.5日の蝸牛をDAPTを加えて6日間培養すると、有毛細胞の数が増加し、支持細胞の数が減少した。胎生14.5日の蝸牛を2日間DAPTを加えて培養すると細胞増殖を示すBrdUを取り込んだ細胞が増加した。これをさらに12日目まで培養すると、DAPTを加え続けるとBrdU陽性の有毛細胞が見られ、DAPTを洗い流すとBrdU陽性の支持細胞が見られた。セクレターゼ阻害薬によって、初期には細胞増殖が誘導され、その後有毛細胞への分化を促すという2相の役割があることが分かった。言い換えれば、セクレターゼ阻害薬によってノッチ情報伝達系を阻害することによって、内耳前駆細胞の増殖と支持細胞から有毛細胞への分化誘導・転換という2つの経路での内耳有毛細胞の再生が期待されることが分かった。

2) in vivoでのセクレターゼ阻害薬投与の最適化

モルモットにカナマイシンとエタクリン酸を全身投与することによって、4日後には蝸牛外有毛細胞はほとんど脱落し、内有毛細胞は一部が脱落した。ABRの結果でも聴力が著しく悪化していることが確認された。組織

学的にも機能的にもこの効果に左右差はなく、実験モデルとして安定していることも確認された。免疫組織化学染色の結果からは、Notch1とそのリガンドであるJagged1は正常モルモット胚の蝸牛支持細胞とgreater epithelial ridgeに発現が見られ、カナマイシン・エタクリン酸投与後もしばらくは維持されるが、7日後には消失することが分かった。

2種類のセクレターゼ阻害薬それぞれの3種類の投与方法のうち、MDL28370を外リンパ腔へ7日間持続投与したものにおいては、蝸牛に異所性に有毛細胞が誘導されたが、その数は少なかった。そのほかの組み合わせについては、有毛細胞の増殖や異所性の有毛細胞の出現も検出されなかった。ABRによる聴覚改善は見られなかった。昨年報告において、in vitroではDAPTの単回投与がもっとも効果的であったのと異なる結果となった。また、誘導できた有毛細胞も限定的であり、機能改善も見られていないことから、さらなる条件検討が必要と考えられた。

3) 霊長類での再生実験

後鼓室解放術によって正円窓窩にアプローチし、正円窓膜上にシスプラチンを浸潤させたジェルフォームを留置した。4週間後にはABRの閾値が著しく上昇しており、聴力低下が起こっていることが確認された。組織学的には有毛細胞の障害とラセン神経節の脱落が見られ、永続する有毛細胞障害とラセン神経障害が引き起こされた。以上より、本実験系は内耳有毛細胞とラセン神経節細胞の障害モデルとして使用でき、ABRを反復して測定することによって聴覚の回復を評価できることが示された。

4) ヒト側頭骨標本を用いたヒトでの投与方法の評価

ヒト側頭骨 (20 耳) を用いて、正円窓窩・正円窓膜を確認・操作できるかを検討した。まず、別に開発した極細径中耳内視鏡を用いた方法を検討した。鼓膜切開を置き、ここから極細径中耳内視鏡を挿入して正円窓窩を確認したところ、すべての側頭骨で容易に正円窓窩を確認できることが分かった。しかし、正円窓膜を視認するには極細径中耳内視鏡の解像度が十分ではなく、またこの視野でゲルを留置するなどの操作を行うためには、これを目的とした器具を開発する必要があることも分かった。乳突削開を行って後鼓室解放によって正円窓窩にアプローチする場合は、手術侵襲は大きいですが、確実に正円窓窩を明視下に置き、正円窓膜上の操作ができることを確認した。

患者に同意を得た上で、成人症例 (2 例) で他の疾患のために鼓膜切開をおいたときに、極細径中耳内視鏡を用いて正円窓窩を確認したところ、この場合も正円窓窩の確認は容易であったが、正円窓膜の確認は困難であった。

以上より、経鼓膜的に低侵襲で正円窓窩を確認することは容易であるが、正円窓膜を操作することは必ずしも容易ではないことが分かった。また、その場合も乳突削開と後鼓室解放を行えば正円窓膜上の操作ができることも確認した。ターゲットとなる難聴の程度に応じて、軽度のものであれば低侵襲な方法での薬物投与を、重篤なもので手術侵襲が受け入れられるような場合は乳突削開・後鼓室解放によって確実な投与を行うという、段階的なアプローチが妥当と考えられる。

D. 考察

ノッチ情報伝達系が有毛細胞の増殖・分化にどのような役割を果たしているのかを詳細に検討し、セクレターゼ阻害薬が確かにノッチ情報伝達系を介して有毛細胞に働いていることを確認した。しかし、ノッチ情報伝達系が機能しているのは生後しばらくの間であり、その後関連分子の発現が低下することも明らかになった。in vitro の実験では十分な濃度があれば短時間の暴露でセクレターゼ阻害薬が多数の有毛細胞を生じさせるのに対し、in vivo の成獣を用いた実験では 1 種類のセクレターゼ阻害薬で、長期間持続投与をしてわずかな異所性有毛細胞が確認されたという結果の違いについては、関連分子の発現低下についても考慮する必要があると考えられる。セクレターゼ阻害薬は他にも多種存在し、また投与方法も様々なドラッグデリバリーシステムが考案され、実際に用いることができるので、今後改善の余地があると考えられる。他に、セクレターゼ阻害薬によるノッチ情報伝達系の抑制が、前庭感覚上皮やラセン神経節の再生にも応用できる可能性が示唆された。

臨床応用のためにはヒトにおいてこれらの治療を実行できるかどうか、効果があるかどうかを検討しなければならないが、その前段階としてのサルを用いた実験モデル動物を作成した。有毛細胞とラセン神経節に関して、安定した障害モデルを作成し、最終的な組織学的評価に加えて、経時的な機能評価が行える環境が整った。また、臨床例での薬物投与経路についても検討し、ターゲットとなる疾患に応じて、段階的なアプローチ方法を検討する必要があることが分かった。

E. 結論

セクレターゼ阻害薬が確かにノッチ情報伝達系を抑制していることが確認された。in vivo モデルでは検討した範囲内では有毛細胞の再生は限定的ではあるが検出できた。今後、さらなる最適化が必要である。サルを用いた再生実験を行うための障害モデル動物とその評価系を確立した。ヒト側頭骨と症例を用いて正円窓窩・正円窓膜への薬物投与のためのアプローチに方法を開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

著書

1. Ito J, Nakagawa T. Cell therapy for inner ear diseases. In Lim DJ ed. Proceeding of the 5th International Symposium Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disorders, 12-13, House Ear Institute, Los Angeles, CA, USA, 2006.
2. 中川隆之, 伊藤壽一: 1 2. BDNF 2) 内耳. 細胞増殖因子と再生医療. 松本邦夫, 田畑泰彦編, 346-350, メジカルレビュー社, 大阪, 2006.
3. 中川隆之, 伊藤壽一: 体性幹細胞による内耳再生 実験医学 24 増刊 2 ここまで進んだ幹細胞研究と再生医療 2006, 143-147, 羊土社, 東京, 2006.
4. 小島 憲: 幹細胞・ES 細胞—内耳幹細胞. 再生医療 11:5:4:65-71, メジカルレビュー社, 東京, 2006.

論文

1. Suzuki T, Nomoto Y, Nakagawa T, Kuwahata N, Ogawa H, Suzuki Y, Ito J, Omori K.

Age-dependent degeneration of the stria vascularis in human cochleae. Laryngoscope 2006;116:1846-1850.

2. Okano T, Nakagawa T, Kita T, Endo T, Ito J. Cell-gene delivery of brain-derived neurotrophic factor to the mouse inner ear. Mol Ther 2006;14:866-871.
3. Iwai K, Nakagawa T*, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim TS, Tabata Y, Ito J. Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. Laryngoscope 2006;116:526-533.
4. Kojima K, Takebayashi S, Matsumoto M, Nishida A, Ito J. Distribution of GFP expressing cells in the developing inner ear of pHes1- or pHes5-d2EGFP transgenic mouse. Neuroscience Res 2006;55:Suppl:143.
5. Sekiya T, Kojima K, Matsumoto M, Kim T-S, Tamura T, Ito J. Cell transplantation to the auditory nerve and cochlear duct. Exp Neurol 2006; 198:12-24.
6. Fujimoto Y, Hasegawa K, Suemori H, Ito J, Nakatsuji N. Molecular cloning and function of Oct-3 isoforms in cynomolgus monkey embryonic stem cells. Stem Cells Dev. 2006;15:566-574.
7. Hiraumi H, Tsuji J, Kanemaru S, Fujino K, Ito J. Non-organic hearing loss. Acta Oto-laryngologica, 2007;127:Suppl1557:3-7.
8. Tsuji J, Murai N, Naito Y, Ito J. c-Fos expression in the mouse brainstem after unilateral labyrinthectomy. Acta Oto-laryngologica, 2007;127:Suppl1557:

- 8-11.
9. Fujino K, Naito Y, Tsuji J, Endo T, Kanemaru S, Hiraumi H, Sekiya T, Miyamoto S, Ito J. Vertigo as the sole presenting symptom of cerebellopontine angle meningioma. *Acta Oto-laryngologica*, 2007;127:Suppl557:12-14.
 10. Ohno T, Iki T, Taniguchi A, Fujiki N, Ohta K, Ito J. A case of cochlear implant with internal mechanical failure. *Acta Oto-laryngologica*, 2007;127:Suppl557:15-16.
 11. Hiraumi H, Tsuji J, Kanemaru S, Fujino K, Ito J. Cochlear implants in post-lingually deafened patients. *Acta Oto-laryngologica*, 2007;127:Suppl557:17-21.
 12. Fujino K, Naito Y, Endo T, Kanemaru S, Hiraumi H, Tsuji J, Ito J. Clinical characteristics of delayed endolymphatic hydrops: long-term results of hearing and efficacy of hyperbaric oxygenation therapy. *Acta Oto-laryngologica*, 2007;127:Suppl557:22-25.
 13. Kojima K, Matsumoto M, Ito J. Severe acoustic trauma in adult rats induced by short duration high intensity sound. *Acta Oto-laryngologica*, 2007;127:Suppl557:26-29.
 14. Higashi T, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Sakamoto T, Ito J. Effects of bone morphogenetic protein 4 on differentiation of embryonic stem cells into myosin VIIa-positive cells. *Acta Oto-laryngologica*, 2007;127:Suppl557:36-40.
 15. Fujino K, Kanemaru S, Hiraumi H, Ito J. Bilateral congenital ossicular chain disruption mimicking otosclerosis. *Acta Oto-laryngologica*, 2007;127:Suppl557:41-43.
 16. Kanemaru S, Ito J, Tsuji J, Fujino K, Hiraumi H, Omori K. Stabilization technique for columella using trimmed autologous temporal fascia in type III and IV tympanoplasty - muffler method. *Acta Oto-laryngologica*, 2007;127:Suppl557:44-46.
 17. 伊藤壽一：側頭骨を用いた耳下手術トレーニングシステム. *耳鼻臨床* 99:1-6, 2006.
 18. 辻純, 平海晴一, 伊藤壽一：側頭骨手術解剖実習へのナビゲーション装置の応用. *耳鼻展* 49:289-291, 2006.
- 学会発表
1. Nakagawa T, Kim TS, Kita T, Takebayashi S, Matsumoto M, Kojima K, Sakamoto T, Ito J. Reorganization of neural networks in vestibular epithelia by embryonic stem cell-derived neurons. The 24th Bárány Society Meeting. Uppsala, Sweden. Jun 11-14, 2006.
 2. Takebayashi S, Yamamoto N, Yabe D, Fukuda H, Kojima K, Ito J, Honjo T. Notch signaling controls cochlear hair cell development. The 20th IUBMB and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. Jun 18-23, 2006.
 3. Ito J, Nakagawa T, Endo T. A novel method for treatment of inner ear using new drug delivery system. *Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae*

- Sacrum 2006. Moscow, Russia. Aug 27-30, 2006.
4. Nakagawa T, Kita T, Okano T, Kada S, Kojima K, Ito J. Distribution of hematopoietic stem cell-derived cells in mouse cochlea and their possible roles. The 43rd Inner Ear Biology Workshop. Montpellier, France. Sep 17-20, 2006.
 5. Kojima K, Sekiya T, Matsumoto M, Ito J. Cell transplantation to the auditory nerve and cochlea duct. The 43rd Inner Ear Biology Workshop. Montpellier, France. Sep 17-20, 2006.
 6. Takebayashi S, Yabe D, Yamamoto N, Kojima K, Ito J, Honjo T. Notch signaling inhibitors increase hair cells in embryonic organ culture. The 43rd Inner Ear Biology Workshop. Montpellier, France. Sep 17-20, 2006.
 7. Okano T, Nakagawa T, Kita T, Ito J. BDNF gene delivery into the mouse cochlea by cell transplantation. The 43rd Inner Ear Biology Workshop. Montpellier, France. Sep 17-20, 2006.
 8. Kada S, Nakagawa T, Ito J. A mouse model for selective degeneration of the spiral ligament due to local application of 3-nitropropionic acid. The 43rd Inner Ear Biology Workshop. Montpellier, France. Sep 17-20, 2006.
 9. Ito J. Mini-symposium MS-4. Regeneration of the inner ear and the retina cells. The 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics - Audition & Vision. Shanghai, China. Nov 3-7, 2006.
 10. Nakagawa T, Okano T, Endo T, Matsumoto M, Kada S, Ogita H, Hori R, Naito Y, Sakamoto T, Kita T, Kim TS, Lee KY, Iguchi F, Ito J. Cell therapy for inner ear diseases. The 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics - Audition & Vision. Shanghai, China. Nov 3-7, 2006.
 11. Takebayashi S, Yabe D, Yamamoto N, Kojima K, Ito J, Honjo T. Notch signaling has a stepwise role in cochlear hair cell development. The 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics - Audition & Vision. Shanghai, China. Nov 3-7, 2006.
 12. Matsumoto M. Innervation of embryonic stem cell-derived neurons into inner ear sensory epithelia of mice. The 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics - Audition & Vision. Shanghai, China. Nov 3-7, 2006.
 13. Ito J. Plenary Session - Protection of hearing in cochlear implantation - II. Stem cells within the Cochlea. The 7th International Academic Conference on Immunobiology in Otolaryngology. Melbourne, Australia. Nov 12-14, 2006.
 14. Nakagawa T, Lee KY, Okano T, Matsumoto M, Hiraumi H, Ono K, Tabata Y, Ito J. Therapeutic Effect of IGF-1-Hydrogel Therapy on Noise-Induced Hearing Loss in Guinea Pigs. The 30th Midwinter Meeting of Association for Research in

- Otolaryngology. Denver, CO, USA. Feb 10-15, 2007.
15. Kojima K, Sekiya T, Holley M, Matsumoto M, Nicholl A, Helyer R, Ito J. Transplantation of Conditionally Immortal Auditory Neuroblasts to the Auditory Nerve. The 30th Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Denver, CO, USA. Feb 10-15, 2007.
 16. Okano T, Nakagawa T, Kita T, Kada S, Ito J. Dynamic Mobilization of Microglia/Microphage in the Mouse Inner Ear. The 30th Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Denver, CO, USA. Feb 10-15, 2007.
 17. Hori R, Nakagawa T, Matsuoka Y, Kita T, Takebayashi S, Iwai K. Effects of MDL-28170, an Inhibitor of Notch Signaling Pathway, Into the Endolymphatic Cavity of Guinea Pig Cochlea After Severe Hair Cell Damage. The 30th Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Denver, CO, USA. Feb 10-15, 2007.
 18. Ogita H, Nakagawa T, Lee KY, Okano T, Ito J. New Approach for Preserving the Cochlea Function in Cell Transplantation to the Cochlear Modiolus of Guinea Pigs. The 30th Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Denver, CO, USA. Feb 10-15, 2007.
 19. Lee KY, Nakagawa T, Kada S, Fujimoto Y, Hiraumi H, Hori R, Ogita H, Matsumoto M, Okano T, Kojima K, Sakamoto T, Lee SH, Ito J. Engraftment of Primate ES Cell-Derived Neurons Into the Cochlear Modiolus of Deafened Macaques. The 30th Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Denver, CO, USA. Feb 10-15, 2007.
 20. 伊藤壽一:幹細胞を用いた内耳の再生. 第5回日本再生医療学会市民公開講座. 平成18年3月9日. 岡山.
 21. 伊藤壽一:内耳の再生. 第2回熊本眼疾患研究会. 平成18年3月10日. 熊本.
 22. 岡野高之, 中川隆之, 伊藤 壽一:細胞移植によるマウス内耳への遺伝子導入の試み. 第93回日耳鼻京滋合同地方部会. 平成18年3月25日. 滋賀.
 23. 松本昌宏, 中川隆之, 小島憲, 伊藤壽一:新しい蝸牛感覚上皮器官培養法の開発. 第93回日耳鼻京滋合同地方部会. 平成18年3月25日. 滋賀.
 24. 伊藤壽一:内耳再生医療. 平成17年度福岡県地方部会総会および福耳会総会・講演会. 平成18年4月8日. 福岡.
 25. 坂本達則, 伊藤壽一, Raj Ladher:コラーゲン滴を用いた耳プラコード・耳胞の組織培養. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 平成18年5月11~13日. 東京.
 26. 小島 憲, 竹林慎治, 松本昌宏, 西田明子, 伊藤壽一:発達・成熟期内耳における Hes プロモーター制御レポーター・タンパク発現細胞の分布変化. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 平成18年5月11~13日. 東京.
 27. 竹林慎治, 山本典生, 小島 憲, 伊藤壽一:Notch シグナル阻害薬は、マウス胎仔蝸牛の有毛細胞を増加させる. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 平成18年5月11

- ～13日．東京．
28. 岡野高之，中川隆之，伊藤壽一：細胞移植によるマウス内耳への遺伝子導入の試み．第107回日本耳鼻咽喉科学会．平成18年5月11～13日．東京．
 29. 松本昌宏，中川隆之，金泰秀，小島憲，坂本達則，伊藤壽一：蝸牛有毛細胞と胚性幹細胞由来神経細胞のシナプス結合．第107回日本耳鼻咽喉科学会．平成18年5月11～13日．東京．
 30. 嘉田真平，中川隆之，岡野高之，松本昌宏，大野恒久，伊藤壽一：マウスラセン靭帯障害モデルの検討．第107回日本耳鼻咽喉科学会．平成18年5月11～13日．東京．
 31. 小島憲，関谷徹治，松本昌宏，伊藤壽一：聴神経および蝸牛管への細胞移植．第21回再生移植研究会．平成18年5月27日．東京．
 32. 三浦誠，山藤勇：ヒト側頭骨連続切片標本を用いた小児蝸牛ラセン神経節細胞数の評価．第94回日耳鼻京滋合同地方部会．平成18年6月3日．京都．
 33. 伊藤壽一：内耳再生．第48回日本老年医学会シンポジウム Aging Science Forum 高齢医学における未来医療．平成18年6月7日．石川．
 34. 小島憲，西田明子，竹林慎治，伊藤壽一：pHes1⁻，pHes5-EGFP トランスジェニックマウス発達内耳における GFP 発現細胞の分布．第29回神経科学大会．平成18年7月19日～21日．京都．
 35. Takebayashi S, Yabe D, Yamamoto N, Kojima K, Ito J, Honjo T. : Notch signaling has a stepwise role in cochlear hair cell (HC) development. COE 老化コロキウム．平成18年9月2日．
 - 京都．
 36. 伊藤壽一：臨床セミナー2：人工内耳と聴性脳幹インプラントの聴覚医学的問題．人工内耳の聴覚医学的問題．第51回日本聴覚医学会．平成18年9月29日．山形．
 37. 三浦誠，平海晴一，金丸眞一，石丸満，山口忍，西岡奈美江，内藤泰，伊藤壽一：術中NRT反応が得られなかった人工内耳症例の術後経過．第51回日本聴覚医学会．平成18年9月29日．山形．
 38. 伊藤壽一：内耳の再生医療．第89回札幌市耳鼻咽喉科医会学術研修会．平成18年9月30日．札幌．
 39. 三浦誠，山藤勇，折田頼尚：Noonan 症候群の側頭骨病理所見．第16回日本耳科学会．平成18年10月19日～21日．青森．
 40. 中川隆之，喜多知子，岡野高之，嘉田真平，松本昌宏，伊藤壽一：蝸牛における骨髄由来細胞の局在と役割．第16回日本耳科学会．平成18年10月19日～21日．青森．
 41. 坂本達則，伊藤壽一：コラーゲン滴を用いた耳プラコード・耳胞の組織培養．第16回日本耳科学会．平成18年10月19日～21日．青森．
 42. 小島憲，松本昌宏，藤本康子，中川隆之，伊藤壽一：ES細胞から内耳幹細胞誘導を目的とした網羅的遺伝子解析のころみ．第16回日本耳科学会．平成18年10月19日～21日．青森．
 43. 藤本康子，松本昌宏，小島憲，中川隆之，伊藤壽一：カニクイザル胚性幹細胞（ES細胞）から内耳前駆細胞への分化誘導のころみ．第16回日本耳科学会．平成18年10月19日～21日．青森．
 44. 岡野高之，中川隆之，喜多知子，伊藤壽一：遺伝子改変細胞の移植によるマウ

- ス内耳への遺伝子導入. 第 16 回日本耳科学会. 平成 18 年 10 月 19 日～21 日. 青森.
45. 嘉田真平, 中川隆之, 伊藤壽一: 3-nitro propionic acid(3-NP)によるマウス内耳障害. 第 16 回日本耳科学会. 平成 18 年 10 月 19 日～21 日. 青森.
46. 堀 龍介, 中川隆之, 竹林慎治, 小島 憲, 山本典生, 岡野高之, 松本昌宏, 嘉田真平, 伊藤壽一: ノッチ情報伝達系の抑制による有毛細胞再生. 第 16 回日本耳科学会. 平成 18 年 10 月 19 日～21 日. 青森.
47. 松本昌宏, 関谷徹治, 小島 憲, 金泰秀, 田村哲也, 伊藤壽一: 聴神経及び蝸牛管への細胞移植. 第 16 回日本耳科学会. 平成 18 年 10 月 19 日～21 日. 青森.
48. 中川隆之, 松本昌宏, 小島 憲, 岡野高之, 伊藤壽一: 遺伝子導入を目的とした前庭感覚上皮器官培養システム開発の試み. 第 65 回日本めまい平衡医学会. 平成 18 年 11 月 15～17 日. 東京.
49. 岡野高之, 中川隆之, 嘉田真平, 伊藤壽一: 成体マウス前庭における骨髄由来細胞の免疫組織学的解析. 第 65 回日本めまい平衡医学会. 平成 18 年 11 月 15～17 日. 東京.
50. 嘉田真平, 中川隆之, 伊藤壽一: マウスラセン靭帯障害モデルにおける前庭障害. 第 65 回日本めまい平衡医学会. 平成 18 年 11 月 15～17 日. 東京.
- G. 知的所有権の取得状況
- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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, Nakagawa T	Cell therapy for inner ear diseases.	Proceeding of the 5th International Symposium Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disorders. In Lim DJ ed.	12-13	House Ear Institute	Los Angels, CA, USA	2006
中川隆之, 伊藤壽一	1 2 . BDNF 2) 内耳.	細胞増殖因子と再生医 療. 松本邦夫, 田畑泰 彦編	346-350	メジカル レビュー 社	大阪	2006
中川隆之, 伊藤壽一	体性幹細胞に よる内耳再生.	実験医学 24 : 増刊 2 こ こまで進んだ幹細胞研 究と再生医療 2006.	143-147	羊土社	東京	2006
小島 憲	幹細胞・ES 細 胞ー内耳幹細 胞.	再生医療 11:5:4	65-71	メジカル レビュー 社	東京	2006

論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
Suzuki T, Nomoto Y, Nakagawa T, Kuwahata N, Ogawa H, Suzuki Y, Ito J, Omori K.	Age-dependent degeneration of the stria vascularis in human cochleae.	Laryngoscope	2006;116:1846-1850.
Okano T, Nakagawa T, Kita T, Endo T, Ito J.	Cell-gene delivery of brain-derived neurotrophic factor to the mouse inner ear.	Mol Ther	2006;14:866-871.
Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim TS, Tabata Y, Ito J.	Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel.	Laryngoscope	2006;116:526-533.
Kojima K, Takebayashi S, Matsumoto M, Nishida A, Ito J.	Distribution of GFP expressing cells in the developing inner ear of pHes1- or pHes5-d2EGFP transgenic mouse.	Neuroscience Res	2006;55:Suppl:143.
Sekiya T, Kojima K, Matsumoto M, Kim T-S, Tamura T, Ito J.	Cell transplantation to the auditory nerve and cochlear duct.	Exp Neurol	2006;198:12-24.
Fujimoto Y, Hasegawa K, Suemori H, Ito J, Nakatsuji N.	Molecular cloning and function of Oct-3 isoforms in cynomolgus monkey embryonic stem cells.	Stem Cells Dev	2006;15:566-574.
Hiraumi H, Tsuji J, Kanemaru S, Fujino K, Ito J.	Non-organic hearing loss.	Acta Otolaryngologica	2007;127:Suppl1557:3-7.
Tsuji J, Murai N, Naito Y, Ito J.	c-Fos expression in the mouse brainstem after unilateral labyrinthectomy.	Acta Otolaryngologica	2007;127:Suppl1557:8-11.
Fujino K, Naito Y, Tsuji J, Endo T, Kanemaru S, Hiraumi H, Sekiya T, Miyamoto S, Ito J.	Vertigo as the sole presenting symptom of cerebellopontine angle meningioma.	Acta Otolaryngologica	2007;127:Suppl1557:12-14.
Ohno T, Iki T, Taniguchi A, Fujiki N, Ohta K, Ito J.	A case of cochlear implant with internal mechanical failure.	Acta Otolaryngologica	2007;127:Suppl1557:15-16.

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
Hiraumi H, Tsuji J, Kanemaru S, Fujino K, Ito J.	Cochlear implants in post-lingually deafened patients.	Acta Oto-laryngologica	2007;127:Suppl557:17-21.
Fujino K, Naito Y, Endo T, Kanemaru S, Hiraumi H, Tsuji J, Ito J.	Clinical characteristics of delayed endolymphatic hydrops: long-term results of hearing and efficacy of hyperbaric oxygenation therapy.	Acta Oto-laryngologica	2007;127:Suppl557:22-25.
Kojima K, Matsumoto M, Ito J.	Severe acoustic trauma in adult rats induced by short duration high intensity sound.	Acta Oto-laryngologica	2007;127:Suppl557:26-29.
Higashi T, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Sakamoto T, Ito J.	Effects of bone morphogenetic protein 4 on differentiation of embryonic stem cells into myosin VIIa-positive cells.	Acta Oto-laryngologica	2007;127:Suppl557:36-40.
Fujino K, Kanemaru S, Hiraumi H, Ito J.	Bilateral congenital ossicular chain disruption mimicking otosclerosis.	Acta Oto-laryngologica	2007;127:Suppl557:41-43.
Kanemaru S, Ito J, Tsuji J, Fujino K, Hiraumi H, Omori K.	Stabilization technique for columella using trimmed autologous temporal fascia in type III and IV tympanoplasty - muffler method.	Acta Oto-laryngologica	2007;127:Suppl557:44-46.
伊藤壽一	側頭骨を用いた耳下手術トレーニ ングシステム.	耳鼻臨床	99:1-6, 2006.

Cell Therapy for Inner Ear Diseases

Juichi Ito*, Takayuki Nakagawa

Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

*Corresponding author: ito@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

Meniere's disease and delayed endolymphatic hydrops sometimes cause severe hearing impairment, which is sometimes irreversible. Irreversible hearing loss due to endolymphatic hydrops is caused by degeneration of hair cells and/or the cochlear lateral wall including the stria vascularis and spiral ligament.¹ The cochlear lateral wall is a critical component for maintenance of cochlear fluid homeostasis. Therefore, degeneration of the cochlear lateral wall can be a reason for production of endolymphatic hydrops. Progression of endolymphatic hydrops sometimes causes degeneration of cochlear hair cells, and the loss of cochlear hair cells leads to degeneration of spiral ganglion neurons (SGNs). Protection of SGNs from cell death secondary to hair cell loss is, consequently, important for maintaining the hearing benefits provided by cochlear implants (CIs). Cell therapy has been reported to be a strategy for application of neurotrophins, which are also effective for protection of hair cells and SGNs,^{2, 3} in the central nervous system^{4, 5}. It might therefore be possible for neurotrophins to be administered into the inner ear by cell therapy.

The aim of the present study was to examine the potential of cell therapy for the treatment of degenerative inner ear disease including Meniere's disease. We examined the potential of autologous bone marrow stromal cells (MSCs) for restoration of the cells in the cochlear lateral wall, and the ability of neural stem cells (NSCs) for production of neurotrophins after transplantation into the inner ear.

Materials and Methods

MSC transplantation

We used five adult chinchillas weighing 450 to 540 g. The bone marrow was collected from the right femur, and MSCs were prepared as described previously.⁶ Two weeks after harvesting the bone marrow, the chinchillas were injected with a single concurrent dose of gentamicin sulfate (GM: 125 mg/kg, i.m.) and ethacrynic acid (EA: 40 mg/kg, i.v.). At 4 weeks after GM-EA treatment, the cultured autologous MSCs were collected, and labeled with DiI (Molecular Probes, Eugene, OR). The cell suspension (10^5 cells in 20 μ L of DMEM-LG) was injected into the cochlea through the round window toward the direction of the cochlear modiolus using a 30 gauge needle.

The temporal bones were collected and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) for histological examination at 3 weeks after MSC injection. After decalcification with 5% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) in PBS, 10- μ m sections were prepared using a cryostat. Specimens were stained with 4'-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (2 μ g/ml PBS, Molecular Probes, Eugene, OR) to demonstrate nuclear chromatin. The specimens were viewed with a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) to determine the location that MSCs settled in the cochlea. Three sections, at intervals of 120 μ m, were selected from each cochlea, and cells that exhibited positive DiI with a distinct nucleus identified by DAPI were judged to be transplant-derived cells and counted. The numbers of transplant-derived cells were counted in five anatomical sub-regions of the cochlea: the scala vestibuli; scala media; lateral wall; scala tympani and modiolus.

NSC transplantation

As a source of NSCs, we used enhanced green fluorescent protein (EGFP)-transgenic mice. The neuroepithelium of the dorsal telencephalon of embryonic mice at embryonic day 11.5 was transferred into the neurosphere culture medium.⁷ Secondary spheres were collected for transplantation, dissociated and suspended at a density of 1×10^3 cells/ μ l in the neurosphere culture medium. We injected 10 μ l of the medium including NSCs into the inner ear of 5 adult C57/BL6 mice at 6 weeks of age. Animals were anaesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg). We made a small hole in each of the lateral and posterior semicircular canals of the left ear. A glass needle was inserted into the lateral semicircular canal, and the medium containing NSCs was injected using a micro-infusion pump.

Four weeks later, the temporal bones were collected, and immersed in 4% paraformaldehyde in PBS. After decalcification with 0.1M EDTA, cryostat sections of the temporal bones were prepared at 10 μ m in thickness. Mid-modiolus sections from each animal were provided for histological analysis. The cell fate of transplant-derived cells was determined by immunohistochemistry for microtubule-associated protein 2 (MAP2), a cell marker of neural cells, and glial fibrillary acidic protein (GFAP), a cell marker for glial cells. The ability for production of neurotrophins was examined by immunohistochemistry for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Anti-MAP2 mouse monoclonal antibody (1:500; Sigma), anti-GFAP rabbit monoclonal antibody (1:200; DAKO, Carpinteria, CA), anti-GDNF rabbit polyclonal antibody (1:200; Santa Cruz, Santa Cruz, CA) and anti-BDNF rabbit polyclonal antibody (1:200; Santa Cruz) were used as primary antibodies, followed by incubation with secondary antibodies. Rhodamine-conjugated anti-rabbit goat IgG (1:200; Chemicon, Temecula, CA) or Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse goat IgG (1:200; Molecular Probes) was used as secondary antibodies.

All experimental protocols were approved by the Animal Research Committee, Graduate School of Medicine, Kyoto

Results

MSC transplantation

We confirmed robust survival of the injected MSCs in multiple regions in the cochlea. Transplant-derived cells were found in every turn of the cochlea, including its apical end, in all animals. The mean number of surviving transplanted cells in the basal end of the basal turn was 130.7 cells/section. Transplant-derived cells were predominantly located in the perilymphatic space or modiolus of the cochlea. However, transplant-derived cells were also identified in the cochlear lateral wall including the spiral ligament and stria vascularis. The transplanted cells in the perilymphatic space of the scala vestibuli appeared pyramidal or polygonal, while those in the spiral ganglion and the cochlear nerve were oval or spindle shaped. The transplanted cells in the lateral wall were thin or spindle shaped, and their locations were continuous with those in the scala vestibuli.

12. BDNF

内 耳

中川隆之 NAKAGAWA Takayuki

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

伊藤壽一 ITO Juichi

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

I 背景（疾患など）

感音難聴は65歳以上人口の約6割に認められ、75歳以上人口の実に1/4が日常生活に支障をきたすレベルの難聴を有することが知られている。さらに、先天的難聴は1,000人に1人に認められる最も頻度の高い先天的機能障害である。また、厚生労働省で班研究の対象である突発性難聴やメニエール病といった難治疾患も、人口10万人あたり約30人の発症が認められている。これらの難治疾患を含め、感音難聴症例では、ほとんどが音刺激を受容する蝸牛の障害によるものである。現在、有効性が認められている治療法として、ステロイドの全身投与が存在するが、急性期のみが対象となり、有効性も必ずしも満足できるものではない。さらに、ステロイド投与が無効であった場合の二次的な治療法として、高気圧酸素療法などが施行されているが、有効性はきわめて限られているのが現状である。これらの背景から、耳鼻咽喉科領域において、感音難聴治療法の開発は急務とされている。

蝸牛は、渦巻き状の形態をした管腔構造をしており、この管は鼓室階、中央階、前庭階と呼ばれる液体で満たされた3つの空間に分離されている（図1）。音刺激を受容し、神経信号に変換する有毛細胞は、中央階に存在する。有毛細胞が受容した刺激を中枢に伝えるラセン神経節は、渦巻きの軸の部分に存在し、有毛細胞とシナプス結合をもつ。蝸牛では、中央階と呼ばれる空間に満たされている液体（内リンパ液）のみが高カリウムであり、他の空間とのカリウム濃度勾配が内リンパ電位を生成する。内リンパ電位は、有毛細胞の脱分極に不可欠であり、内リンパ電位の形成に不可欠な組織が、蝸牛の側壁に存在する血管条とラセン靱帯である。

これまでの研究成果から、感音難聴の病態には、いくつかの病態が存在することがわかって

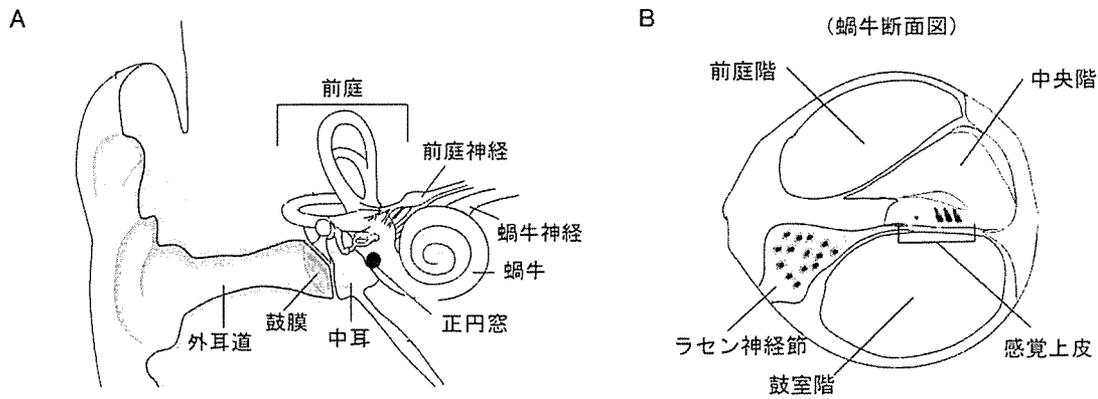


図1 内耳の局在と蝸牛断面図

A：内耳（蝸牛、前庭）は、中耳のさらに深部の骨に存在する。正円窓で膜を介して、中耳と内耳は交通する。

B：蝸牛断面図；蝸牛は前庭階、中央階、鼓室階の3つに分かれる。ラセン神経節は軸に相当する部分に存在する。

いる。有毛細胞障害型、ラセン神経節障害型、血管条およびラセン靭帯障害型と、これらが混在するタイプが存在する。それぞれに特徴的な聴力障害のパターンを示すことが明らかにされており、臨床的にある程度障害部位を推測することが可能である。近年、これらの蝸牛の重要な細胞、組織の再生の可能性が呈示されているが、機能回復を伴う再生医療の臨床応用にはいまだ時間を要するのが現状である。したがって、臨床への応用の観点からは、蝸牛の細胞を不可逆的な変化、すなわち細胞死から保護する方法を開発することが急務といえる。これまでに、本稿で取り上げる脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor：BDNF）などの神経栄養因子、活性酸素除去剤などの有効性が基礎的に明らかにされている^{1) 2)}。これらの薬物は、全身投与により蝸牛で効果を発揮することは困難であり、内耳への局所投与にて、その有効性が認められている。したがって、臨床で使用できる安全かつ確実に内耳に薬物を投与する方法が確立されれば、新しい感音難聴治療が臨床に供される可能性がある。

我々は、このような背景から、京都大学再生医科学研究所・生体組織工学研究部門（生体材料学分野：主任教授 田畑泰彦）が薬物徐放システムとして開発したブタ・コラーゲン由来ゼラチンハイドロゲル（以下ハイドロゲル）³⁾に着目し、本システムを内耳薬物投与システムとして応用するための基礎研究を行った。治療目的の標的は、蝸牛の一次神経節細胞であるラセン神経節細胞の保護とした。その根拠として、ラセン神経節細胞は有毛細胞に比較して、変性や喪失に至る過程が緩やかであるため、実際に保護する機会が臨床的にも想定できること、ラセン神経節細胞が人工内耳の有効性に不可欠なことがあげられる。ここで、人工内耳について、簡単に説明する。人工内耳は、現在、高度感音難聴に対する唯一の治療法であり、音響を電気刺激に変換し、直接ラセン神経節細胞を刺激することにより、聴覚を得る方法である。すなわち、ラセン神経節細胞がある程度残存していなければ、人工内耳を埋め込んでも聴覚を獲得することはできない。投与薬物としてはBDNFを選択した。この背景としては、すでにBDNFのラセン神経節細胞保護作用が知られていること^{1) 2)}、BDNFが他分野での臨床治験に用いられていることがあげられる。

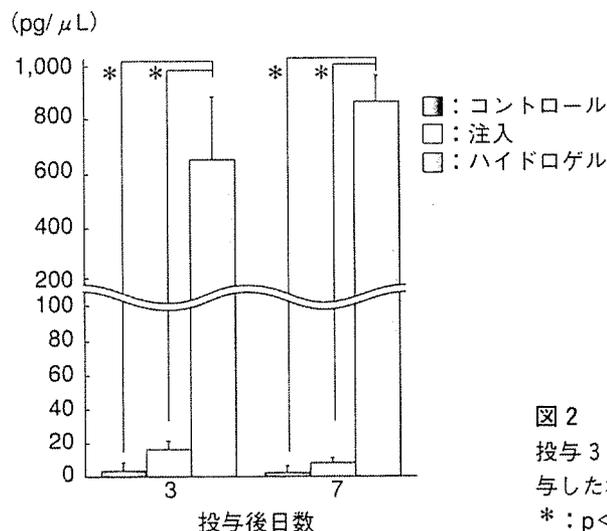


図2 蝸牛外リンパ液中BDNF濃度

投与3日後、7日後ともに、ハイドロゲルを用いてBDNFを投与した場合に有意に高いBDNF濃度が認められた。

* : $p < 0.01$

(文献4より引用)

II 研究の結果

まず、ハイドロゲルにより、蝸牛内にBDNFを適切に投与することができるのかを確認した。BDNFを浸透させたハイドロゲルをモルモット中耳の正円窓膜上に留置し、蝸牛外リンパ液中のBDNF濃度を経時的にELISA法を用いて計測した。正円窓は、蝸牛の中耳への2つの開窓部の一つであり、この部分だけが骨で覆われておらず、3層構造をなす膜となっている。内耳への薬物投与経路として、最も広く用いられている方法が正円窓膜上への薬物投与である。臨床的に、正円窓にアプローチすることは、さほど困難ではなく、少々工夫すれば、経鼓膜的にハイドロゲルを注入することも可能である。投与3、7日後に蝸牛外リンパ液を採取した。対照として、無処置蝸牛から採取したサンプル、同様量のBDNFを正円窓から注入した後に採取したサンプルを使用した。結果、ハイドロゲルを用いた群では、直接注入した場合に比して、3日後で約40倍、7日後では約100倍の濃度のBDNFが外リンパ液中に認められた⁴⁾ (図2)。すなわち、ハイドロゲルは、経正円窓膜的にBDNFを蝸牛内に持続的に投与することができるシステムであることが確認された。この結果は、ハイドロゲルによるBDNFの蝸牛内投与の有効性を示すだけでなく、他の栄養因子や細胞増殖因子などのペプチドを蝸牛内に投与するシステムとして応用可能であることを示唆するものといえる。

次に、ハイドロゲルを用いて投与したBDNFが実際にその生物学的な効果を発起するのかを、ラセン神経節障害動物モデルを用いて検証した。ラセン神経節細胞の障害は、種々の要因で惹起することができるが、実験的には、薬物による直接的な障害モデルと有毛細胞喪失に伴う二次的障害モデルがよく用いられている。本実験では、比較的臨床に即していることから、モルモットの二次的障害モデルを使用した。耳毒性薬物であるカナマイシンとエタクリン酸を全身投与し、投与7~14日後に聴力の評価を行い、聾となっている動物のみを使用し、ラセン神経節細胞の変性が出現しはじめる耳毒性処置18日後からBDNFの局所投与を行い、生食を投与したコントロー