

図3 ラセン神経節組織図 (HE染色)

生食を投与したコントロールでは、著明なラセン神経節細胞の変性を認めるが、BDNFをハイドロゲルにて投与するとラセン神経節細胞が温存されている。

ルと機能および組織を比較した。ラセン神経節の機能評価には、電気刺激聴性脳幹反応を用いた。この方法は、人工内耳と同様に直接蝸牛を電気刺激し、脳幹の反応を脳波で測定する方法であり、人工内耳の有効性を反映する方法である。結果、ハイドロゲルによるBDNF投与により、電気刺激聴性脳幹反応の閾値上昇は有意に抑制されることが明らかとなった⁴⁾。また、ラセン神経節細胞密度を解析したところ、BDNF投与した蝸牛では、有意に高い細胞密度が認められた (図3)。すなわち、ハイドロゲルによって蝸牛内に投与されたBDNFは、電気生理学的、組織学的にラセン神経節細胞を保護する生物学的活性を維持していたこととなる。

III 治療の意義や利点・課題・展望

有毛細胞喪失により聾となった症例では、ラセン神経節細胞の生存促進は人工内耳による聴覚獲得という観点から、非常に重要な意義をもつ。近年、BDNFは単に神経細胞などの保護だけでなく、神経伝達にも重要な役割を果たしていることが示唆されている。したがって、BDNFは、人工内耳の有効性を維持するのみではなく、さらに良好な反応をもたらす可能性があるといえる。老人性難聴は、今後の高齢化社会を考慮した場合、重要な社会的問題の一つとなることが予想される。ヒト側頭骨病理の解析から、ラセン神経節細胞の喪失が老人性難聴の病因の一つであることが示唆されている⁵⁾。また、老化モデル動物の解析でも、加齢による聴覚障害とラセン神経節細胞の減少の関係が指摘されている。したがって、老人性難聴の進行防止においても、BDNFによるラセン神経節細胞保護が有効である可能性がある。今後、老人性難聴モデル動物での有効性の検証が待たれる。

本治療法の最大の利点は、低侵襲性と安全性の高さである。現在までに臨床的に使用されて

きた方法は、二つに大別できる。一つは、埋め込み型ポンプを用いる方法で、投与量の調節性に優れるが、通常の中耳手術に近い手術侵襲を要してデバイスを埋め込む必要があり、広く普及するに至らず、現在、臨床的に使用できるポンプは存在しない。いくつかのモデルの有効性が検討されている段階である。反復経鼓膜注入はシンプルな方法であるが、薬物の内耳への到達性が安定しないことに加えて、頻回の投与を要するという問題点がある。ハイドロゲルによる投与では、1回の注入で約2週間の徐放が期待できることから、継続的な投与を行う場合でも少ない投与回数で対応できる。当然ながら、デバイスの埋め込みは不要である。したがって、現在、臨床供給可能な方法の中では最も優れた投与方法と考えられる。

今後の展望であるが、ヒト臨床試験にBDNFが使用可能となれば、直ちにヒト臨床試験を行うことができる。また、近年、BDNFのさまざまな生物学的な効果が明らかにされつつあり、ラセン神経節細胞以外の蝸牛の組織に対する保護効果についても基礎的に追加研究する必要がある。これらの中には内耳障害治療に応用可能なものも多々あり、さらなる研究展開が期待できる。

●文 献

- 1) Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, et al : Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 1657-1660, 2002
- 2) Nakaizumi T, Kawamoto K, Minoda R, et al : Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects spiral ganglion neurons from ototoxic damage. Audiol Neurootol 9 : 135-143, 2004
- 3) Tabata Y, Miyao M, Ozeki M, et al : Controlled release of vascular endothelial growth factor by use of collagen hydrogels. J Biomater Sci Polym Ed 11 : 915-930, 2000
- 4) Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al : A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. Laryngoscope (in print)
- 5) Schuknecht HF : Pathology of the ear. Cambridge, MA, Harvard university press, 1974

●参考：海外の研究施設

- ・蝸牛におけるBDNFの役割. ドイツ・チュービンゲン大学 聴覚研究所
- ・内耳遺伝子および薬物導入による蝸牛保護. 米国ミシガン大学 クレスキ聴覚研究所

5. 体性幹細胞による内耳再生

中川隆之, 伊藤壽一

聴覚と平衡覚の受容器である内耳は、哺乳類ではきわめて限られた再生能力しかもたない。しかし、近年、哺乳類内耳にも多分化能をもつ細胞が生後も維持されていることが示唆され、内耳にも組織幹細胞が存在する可能性が注目されている。胎生期の内耳からは、自己複製能と多分化能をもつ細胞株が樹立されている。一方、再生能力の低い内耳で再生を誘導する目的で、内耳細胞移植についての研究が行われている。これまでに、神経幹細胞、骨髄由来細胞の内耳への移植が行われ、内耳を構成する細胞に分化しうることが示されており、今後の機能再生が期待される。

はじめに

内耳は、聴覚の受容器である蝸牛と平衡覚に関連する2つの耳石器と3つの半規管からなる。それぞれに感覚上皮と感覚上皮が受容した刺激を中枢に伝える神経節が存在する。感覚上皮は、音刺激などの物理的刺激を神経信号に変換する有毛細胞とその周囲に存在する支持細胞からなる(図1)。神経節細胞は、末梢側では有毛細胞とシナプスを形成する神経突起を、中枢側では脳幹の神経核につながる神経突起を有する。蝸牛および前庭感覚上皮は、それぞれ特徴的な有毛細胞^{※1}を2種類ずつ有しており、蝸牛有毛細胞は、高い周波数の振動刺激を選択的に受容する高度に分化した形態をもち、前庭有毛細胞は低い振動刺激を的確に受容す

るシステムをもつ。蝸牛、前庭ともに、有毛細胞の興奮を制御するシステムをもち、高度に分化した感覚受容器といえる。

一般に、これら内耳の感覚器は、いったん障害されると機能回復しないと考えられてきた。しかし、1980年代に、鳥類では機能的に再生することが示されたことから¹⁾、哺乳類における可能性が注目され、ごくわずかではあるが、前庭感覚上皮には再生能力があることが'90年代の後半に示された²⁾。しかしながら、ごく最近まで、哺乳類蝸牛で再生を誘導することは不可能であるというコンセンサスが得られていた。しかし、内耳領域での分子生物学的な研究手法の進歩、遺伝子導入技術開発、幹細胞医学の発展により、もはや哺乳類蝸牛でも感覚上皮や神経節細胞の再生は不可能な課

【キーワード】

内耳 (inner ear)、有毛細胞 (hair cell)、ラセン神経節 (spiral ganglion neuron)、神経幹細胞 (neural stem cell)、骨髄間葉系細胞 (bone marrow-derived stromal cell)

※1 有毛細胞

内耳の蝸牛および前庭の感覚上皮に存在する。細胞の頂部にそれぞれ特徴的な感覚毛を有し、振動刺激による感覚毛の変位により、脱分極し、神経伝達物質を放出する。

Inner ear regeneration using somatic stem cells

Takayuki Nakagawa/Juichi Ito : Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine (京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科)

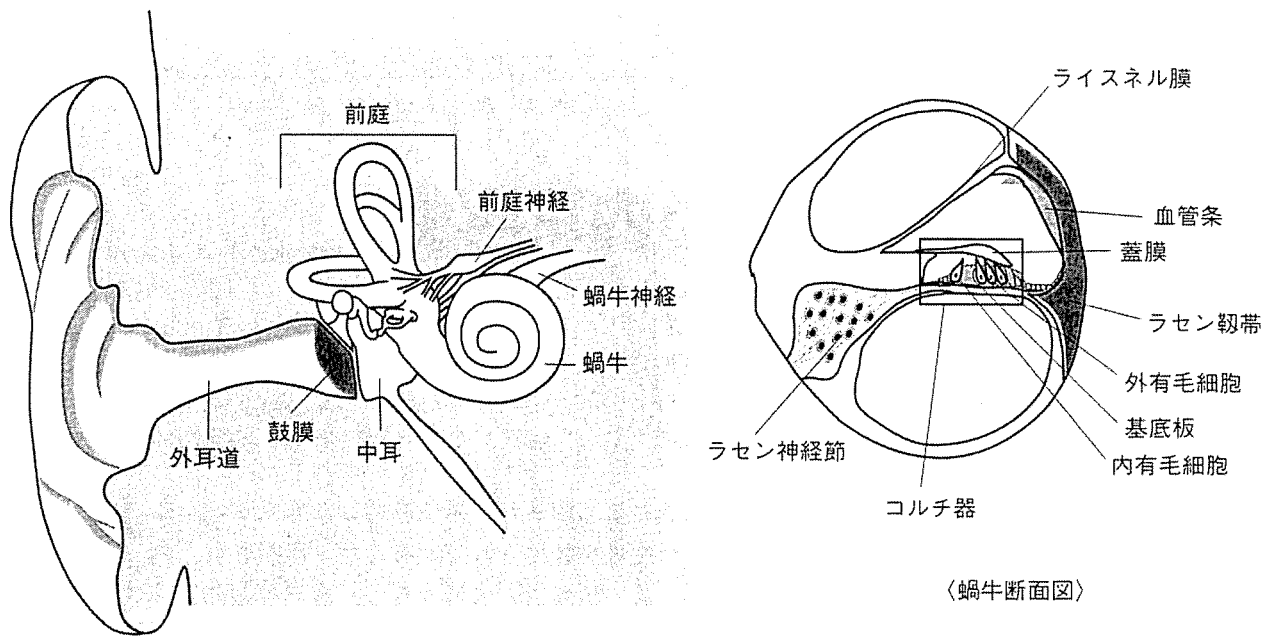


図1 内耳と蝸牛断面図

題ではなくなりつつある。本稿では、内耳再生に関する研究成果の中での体性幹細胞の位置づけについて、2つの角度から論じたいと思う。1つは、内耳における組織特異的幹細胞について、もう1つは、体性幹細胞の移植による内耳再生医療の可能性について、それぞれ最近の知見を紹介する。

1 内耳に組織幹細胞は存在するのか

哺乳類の内耳の再生能力は、きわめて限られており、いったん成熟した後に細胞増殖はほとんど認められない³⁾。これが、内耳障害、特に感音難聴が不可逆である主因であるとされている。哺乳類の内耳感覚上皮での再生実験で認められた再生有毛細胞もほとんどが有毛細胞の周囲に存在する支持細胞からの分化転換により得られた細胞であり、細胞増殖によって喪失細胞が補充されることはほとんどない⁴⁾。したがって、いったん成熟した内耳には、幹細胞は存在しないと考えられてきた。しかし、近年、成熟後の内耳感覚上皮からも、多分化能を有する細胞が分離できることが示され⁵⁾、内耳にも幹細胞様の性質を持つ細胞が存在し、この細胞を刺激することにより、内耳感覚上皮を再生できる可能性が注目されている。これまでの報告では、蝸牛⁶⁾、前庭⁵⁾ともに、幹細胞様の能力を持つ細胞が存在することが示唆されている。

しかしながら、成熟した内耳感覚上皮から、多分化能を持つ細胞を分離・培養し、細胞株化することに成功した報告はない。不死化遺伝子の導入を行わなければ、単一のクローンからなる細胞株を得ることはできていない。したがって、成熟した内耳に存在する多分化能をもつ細胞の自己複製能力はきわめて弱いと考えられる。種々の幹細胞マーカータンパク質の内耳での発現が研究されているが^{7) 8)}、内耳のどの部位に多分化能をもつ細胞が存在するのかは不明である。

一方、胎生期の比較的早い段階からは、多分化能を持つ細胞株を樹立することができる。ラット胎生12日の耳胞から分散培養法を用いて、単一のクローンからなる細胞株を樹立できることが報告されている⁹⁾。この細胞は、有毛細胞、支持細胞、神経細胞に分化することができ、自己複製能をもつ。特に、特別な分化誘導のための工夫を要せずに、有毛細胞のマーカータンパク質陽性の細胞を多数得ることができる。発達段階のマウス内耳における細胞増殖活性を解析すると、ラット胎生12日に相当するマウス胎生10日までは、内耳全体で活発な細胞増殖が認められる¹⁰⁾。この時期までは、WNT情報伝達系と関連がある接着結合タンパク質である β カテニンの細胞核への集積が認められている¹⁰⁾。この後急速に分化が進むとともに、感覚上皮に相当する部位では、急速に細胞増殖活性が失われて

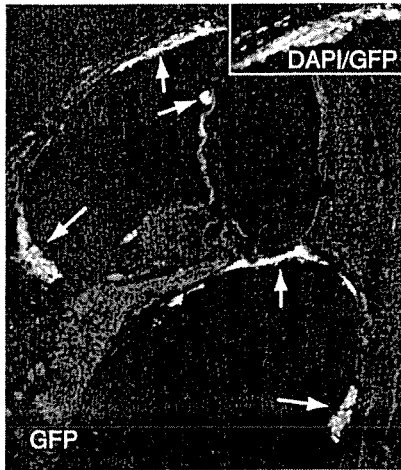


図2 正常蝸牛に移植された神経幹細胞
(巻頭写真16参照)

緑色の蛍光タンパク質 (green fluorescence protein : GFP) で標識された移植細胞が蝸牛内に認められる (矢印). 核染色 (DAPI) 陽性であることから, 移植細胞は生着していると考えられる (右上囲み)

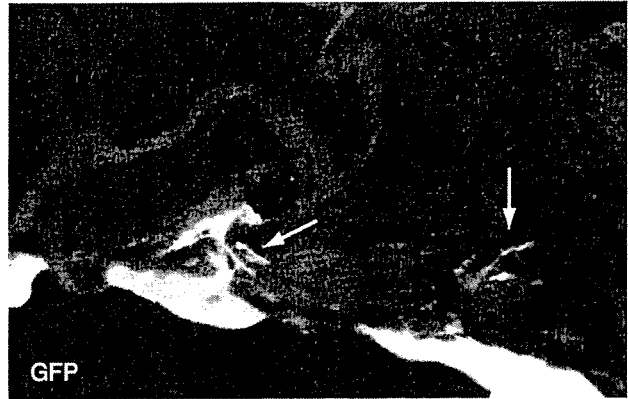


図3 障害蝸牛に移植された神経幹細胞
(巻頭写真17参照)

耳毒性薬物で障害された蝸牛では, 緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識された移植細胞が蝸牛組織内に侵入している (矢印)

いく. このような細胞増殖活性の違いが細胞株化の成否に関与していることが推察できる. 胎生期内耳から樹立された細胞株と成熟した内耳から得られる多分化能を有する細胞との間にどのような差異があるか, 非常に興味深いところである. この差異についての分子生物学的な解析を行うことにより, 成熟した内耳での細胞増殖誘導の鍵となる分子が明らかとなる可能性がある.

内耳有毛細胞再生を目的とした移植細胞開発という観点からも, 胎生期内耳から樹立した細胞株は, 重要な意義をもつ. この細胞の移植実験から, 有毛細胞再生のソースとなりうることを示唆されている^{11) 12)}. この細胞株の性質を決定づける遺伝子が解明できれば, 他のソース, 例えばES細胞から内耳組織幹細胞を誘導できる可能性があり, 細胞移植による内耳再生に最も有力な細胞として期待できる.

2 内耳への神経幹細胞移植

内耳には再生能力をもつ細胞, すなわち幹細胞様の性質をもつ細胞が存在してもごくわずかなため, 再生能力が低いとの観点から, われわれは, 外部から内耳の細胞に分化する可能性がある細胞を移植し, 再生を誘導するという試みを行ってきた¹³⁾. 最初に用いた移植細胞は, 神経幹細胞であった. 神経幹細胞を用いた

理由として, 内耳が発生的に神経細胞と同じ外胚葉由来であること, 網膜への移植実験で網膜での生着が認められていたことがあげられる. 神経幹細胞は, 成獣からも採取できるが, より高い分化能を期待し, 胎仔由来の神経幹細胞を用いた. 障害を受けていないマウス内耳に神経幹細胞を移植したところ, 多くの細胞の生着を認めることができたが, 内耳の組織内に侵入する細胞は, ほとんど認められなかった (図2)¹¹⁾. 移植された神経幹細胞は, グリア系の細胞に分化し, 一部が神経細胞へと分化しており, 他組織に移植された場合と同様の分化傾向を示した.

次に, 耳毒性薬物であらかじめ障害を誘導したマウス内耳に神経幹細胞を移植したところ, 感覚上皮や神経節に侵入する細胞が認められた (図3)¹⁵⁾. 注目すべき結果として, 感覚上皮内に生着した細胞で, 有毛細胞に特徴的とされるタンパク質の一つであるmyosin VIIaの発現が認められた. この結果は, 神経幹細胞が内耳有毛細胞へ分化転換する可能性があることを示唆するものであるが, このような生着, 分化のパターンを示す細胞は, ごくわずかであり, 機能的な側面は評価されていない. 培養系で神経幹細胞の分化誘導を行った場合にも, 同様の細胞が出現することから¹⁶⁾, 神経幹細胞は内耳有毛細胞へ分化する潜在能力をもつ細胞と考えられる. 神経幹細胞は, 内耳の神経組織再生

目的の移植細胞として用いることも想定される。そこで、蝸牛感覚上皮の一次ニューロン（ラセン神経節^{※2}）が存在する蝸牛軸に神経幹細胞の移植を行ったところ、神経細胞に分化した細胞も認められたが、多くはグリア系の細胞に分化する傾向を示した¹⁷⁾。したがって、ラセン神経節再生を目的とした場合、神経方向への特異的な分化誘導を行った後に移植するなどの工夫が必要と考えられる。

3 骨髄由来幹細胞移植の内耳への応用

内耳再生を目的とした移植細胞のソースとして、最も高い潜在能力を持ち、霊長類でも供給可能な細胞は、おそらく胚性幹細胞（ES細胞）であろう。すでに、ES細胞から内耳有毛細胞などの内耳の細胞への分化誘導が可能であることが報告されている¹⁸⁾。また、内耳の神経細胞再生の観点からみれば、ES細胞では多くの神経への誘導方法が確立されている点も大きな利点である。このようにES細胞は、他の臓器・器官と同様に内耳においても有力な細胞治療のソースであるが、一方で臨床応用という観点からは、倫理的な問題を含め、解決すべき問題が多いのも事実である。内耳再生医療の臨床応用の早期実現を考えた場合、直ちに臨床応用可能な細胞ソースを用いた内耳再生に関する研究も重要な課題となる。われわれは、このような観点から、骨髄由来細胞をソースとした内耳への細胞移植治療の可能性についての検討を行っている。

骨髄由来細胞を用いる最大の利点は、自己由来細胞を用いることができることである。自己由来細胞は、最も臨床応用しやすい細胞であることから、骨髄由来細胞は最も臨床応用に近い細胞といえる。骨髄由来細胞の中では、造血幹細胞と間葉系幹細胞が再生医療のソースとして、広く注目されている。これらの細胞から、神経系の細胞に分化誘導可能であることがすでに報告されており¹⁹⁾、神経幹細胞と同様の能力のもつ細胞が得られれば、神経幹細胞の内耳移植と同様の結果が期待できる。さらに、内耳の神経組織の再生ソースにもなりうる。内耳再生研究では、有毛細胞を中心とした感覚上皮、人工内耳^{※3}の効果をj得るために不可欠なラセン神経節細胞が主な研究の対象とされてきたが、近年、蝸牛の側壁に存在するラセン靱帯^{※4}と血管条^{※5}の再生が注目されつつある。ラセン靱帯は主に線維細胞から構成されており、蝸牛でのカリウムイ

オンの輸送に重要な役割を果たしている。血管条は、内、中、外胚葉由来の細胞から構成されており、蝸牛機能に不可欠な内リンパ電位の生成に重要な役割を果たしている。骨髄由来細胞がこれらの組織再生のソースとなる可能性もある。

GFPで標識した造血幹細胞を全身投与されたマウスの内耳を調べると、相当な数のGFP陽性細胞が内耳組織内に検出できる（投稿中）。この所見は、造血幹細胞由来の細胞が内耳組織内に存在することを示唆しているが、これら造血幹細胞由来細胞が内耳でどのような役割を果たしているのかは不明である。造血幹細胞由来細胞の局在が多く認められた部位では、加齢に伴い細胞密度が低下する部位でもあることから²⁰⁾、蝸牛の加齢に伴う変性と造血幹細胞とも何らかの関係がある可能性がある。

4 骨髄由来間葉系細胞

骨髄からは、造血幹細胞の他に付着系の細胞として、間葉系細胞を分離・培養することができる。この間葉系細胞からは、種々の細胞が分化誘導されることが明らかにされている。内耳再生との関係からみれば、神経細胞への分化誘導が最も注目されるところである。内耳の求心神経系の神経伝達物質であるグルタミン酸作動性の神経の分化誘導が可能であることが報告されている²¹⁾。この報告では、内耳との共培養が分化傾向に影響を与えることが示唆されており、内耳への移植により、何らかの分化誘導を受ける可能性があると考えられる。骨髄由来細胞による細胞移植治療は、自己由来細胞を用いることができる可能性があり、最も臨

※ 2 ラセン神経節

蝸牛の渦巻きの軸に相当する部分に存在し、感覚上皮の有毛細胞が受容した刺激を脳幹の蝸牛神経核に伝える。

※ 3 人工内耳

蝸牛内に挿入する電極と音響刺激を電気刺激に変換する受信器からなる。蝸牛のラセン神経節を直接電気刺激することにより、聴覚刺激を中枢に伝える。

※ 4 ラセン靱帯

蝸牛の最外層に位置し、線維細胞からなり、ギャップ結合によるカリウム運搬のネットワークを形成している。

※ 5 血管条

蝸牛側壁の内リンパに接する部分に存在し、血液と内リンパとのイオン交換や水代謝に重要な役割を果たす。

床応用に近い細胞移植治療である。このような観点から、骨髄由来間葉系細胞の内耳再生医療への応用についての研究を行った。分化誘導を行っていない骨髄由来間葉系細胞の内耳への移植実験を行った。チンチラを用い、自身の大腿骨の骨髄から分離・培養した間葉系細胞を内耳へと移植した。実験動物には、あらかじめ耳毒性薬物にて高度障害を誘導し、蝸牛でラセン神経節細胞が著明に減少するタイミングで細胞移植を施行した。移植細胞は、蝸牛内のさまざまな部位に侵入、生着し、わずかであるが神経細胞のマーカータンパク質を発現する細胞が認められた²¹⁾。ただし、神経細胞に分化したと考えられる細胞は、ごくわずかであり、機能的再生に結びつくレベルには至っていない。ラセン神経節の機能的再生を目的とした場合、あらかじめ神経方向に誘導した細胞の移植が必要となると推察される。一方、移植された細胞は、蝸牛側壁にあるラセン靭帯、血管条にも侵入、生着し、特にラセン靭帯では、本来存在する線維細胞と同様の形態を呈しており、ラセン靭帯、血管条の再生のソースとして期待がもてる。

加齢や騒音暴露による感音難聴の病態で、ラセン靭帯での線維細胞の減少を聴力障害の主因の1つとする見解がある。今後、蝸牛に生着した骨髄由来間葉系細胞が機能的な再生に寄与することができるか否かが注目される。

まとめ

体性幹細胞と内耳再生の観点から、内耳組織幹細胞と体性幹細胞の内耳移植について、最近の知見を紹介した。現時点では、内耳における細胞移植治療は、基礎的レベルでの開発段階にある。高度に分化し、特殊な機能を持つ細胞群からなる内耳の再生は、非常に難しい課題である。しかし、内耳、ことに聴覚系では、他の神経系と比較して、より詳細な機能解析を動物レベルで行うことができる。また、内耳障害の中で最も問題となる高度感音難聴に対して、すでに人工内耳というエレクトロデバイスを埋め込む治療が確立されており、臨床応用に際しての手術的アプローチに関して

は、すでに開発されている。このような利点を生かして、内耳再生医療の研究開発を進めたい。

文献

- 1) Duckert, L. G. & Rubel, E. W. : J. Comp. Neurol., 331 : 75-96, 1993
- 2) Warchol, M. E. et al. : Science, 259 : 1619-1622, 1993
- 3) Oesterle, E. C. et al. : J. Comp. Neurol., 463 : 177-195, 2003
- 4) Zheng, J. L. et al. : J. Neurosci., 19 : 2161-2170, 1999
- 5) Li, H. et al. : Nat. Med., 9 : 1293-1299, 2003
- 6) Malgrange, B. et al. : Mech. Dev., 112 : 79-88, 2002
- 7) Kojima, K. et al. : Acta. Otolaryngol., Suppl. 551 : 14-17, 2004
- 8) Murata, J. et al. : Neurosci. Lett., 354 : 201-204, 2004
- 9) Kojima, K. et al. : Acta. Otorhinolaryngol. Belg., 56 : 290, 2002
- 10) Takebayashi, S. et al. : Neuroreport, 16 : 431-434, 2005
- 11) Kim, T. S. et al. : Acta. Otolaryngol., Suppl. 551 : 34-38, 2004
- 12) Kojima, K. et al. : Acta. Otolaryngol., Suppl. 551 : 53-55, 2004
- 13) Nakagawa, T. & Ito, J. : Curr. Pharm. Des., 11 : 1203-1207, 2005
- 14) Iguchi, F. et al. : Neuroreport, 14 : 77-80, 2003
- 15) Tateya, I. et al. : Neuroreport, 14 : 1677-1681, 2003
- 16) Kojima, K. et al. : Acta. Otolaryngol., Suppl. 551 : 26-30, 2004
- 17) Tamura, T. et al. : Acta. Otolaryngol., Suppl. 551 : 65-68, 2004
- 18) Li, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 13495-13500, 2003
- 19) Dezawa, M. et al. : J. Clin. Invest., 113 : 1701-1710, 2004
- 20) Kusunoki, T. et al. : Otolaryngol. Head Neck Surg., 131 : 897-903, 2004
- 21) Kondo, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 : 4789-4794, 2005
- 22) Naito, Y. et al. : Neuroreport, 15 : 1-4, 2004

<筆頭著者プロフィール>

中川隆之：1989年大阪市立大学医学部卒業，'95年同大学院医学研究科修了，内耳のアポトーシス研究を行い，医学博士取得。2001年より京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科助手。現在、内耳再生、特に新しい感音難聴治療方法の開発を目的として研究を行っている。

幹細胞・ES細胞—内耳幹細胞

連載

16

Stem cells • ES cells—inner ear stem cell

Keywords

内耳幹細胞／有毛細胞／らせん神経節細胞／再生医療／細胞移植

小島 憲 伊藤 壽一

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

Summary

The inner ear contributes to sense of hearing and balance, consisting of cochlea and vestibular systems. Each system is composed of a few thousand mechanosensory receptors, hair cells and ganglion neurons. The inner ear has not been thought to possess potentials to regenerate after loss of hair cells and neurons. However, recent studies showed existence of progenitor and pluripotent stem cells in the adult mammalian inner ear. These findings of the stem cells provide three strategies for functional regeneration of the inner ear after damages: 1. Transplantation of stem cells that possess potentials to differentiate to hair cells and spiral ganglion neurons, 2. Stimulation of asymmetrical cell division of inner ear stem cells, 3. Transdifferentiation of inner ear stem cells. This review highlights advances of inner ear stem cell researches and translational researches for a clinical application of the inner ear regenerative medicine.

Kojima, Ken / Ito, Juichi

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

ヒト内耳は再生しない？

内耳は聴覚・平衡感覚を司る器官であり、障害により難聴やめまいが引き起こされる。内耳は小さいながらも種類の細胞が整然と配列することで機能しているが、なかでも音や回転・重力といった物理的的刺激を化学的信号に変換し神経系に伝達する役割をもつ内耳有毛細胞と、その情報を電気的に中枢へ伝達する神経節細胞は必須の構成細胞である。その有毛細胞とらせん神経節細胞は過大な音響や薬物、加齢により容易に傷害を受け脱落してしまう。ヒトではこれらの細胞は再生しないか、または、再生するとしてもごく稀であると考えられている¹⁾。障害の結果として有毛細胞や神経節細胞が脱落してしまえば、その後一生、難聴・めまいなどの内耳機能障害に悩まされることになる。わが国では約30万人が高度難聴であるといわれている。

内耳の構造

内耳は聴覚を担当する蝸牛と平衡感覚を担う前庭に大別される。蝸牛と前庭はともに発生初期の耳板・耳胞と呼ばれるシンプルな組織に由来するが、発達するにつれてらせん構造をとる蝸牛と、3つの半規管と2つの膨大部を含む前庭が形成される(図1 A, B-a)。

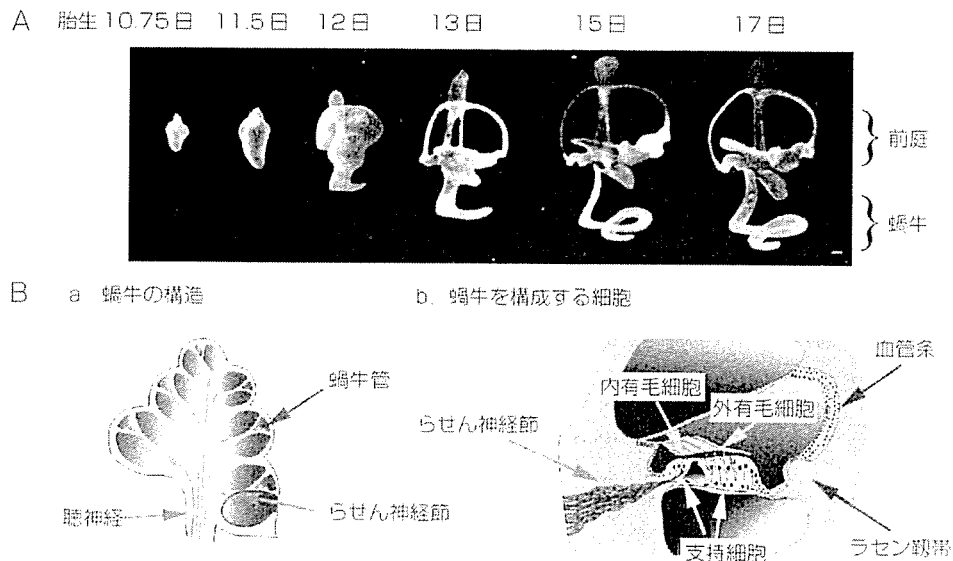


図1 内耳発達とその構造
A: マウス内耳の発達(文献26より引用改変), B: 蝸牛の構造と構成細胞

この小さいながらも非常に複雑な構造は、外界からの情報を効率よく受け取り、中枢神経に伝達するのに役立っている。内耳は多彩な機能をもつ多くの種類の細胞が整然と並ぶことにより成り立っている(図1 B-b)。有毛細胞は内側に1列、外側に3列並ぶ。外有毛細胞は内耳に伝えられた音振動を増幅し、内有毛細胞は外有毛細胞により増幅された音刺激を神経節細胞に伝達する。その情報はさらに神経節細胞から中枢神経に伝えられ、言葉や音楽として知覚される。支持細胞は有毛細胞を支えるだけでなく、内リンパ液のイオン平衡を保つ重要な役割を果たしていると考えられている。血管条やラセン鞏帯を構成する細胞も、内リンパ液の分泌や内リンパ電位の発生・維持など、有毛細胞が正常に機能するために必要な環境を維持する。

内耳を構成する細胞とその系譜(図2)

内耳を構成する細胞は発達初期の単純な構造の耳板から生み出される。この過程で内耳を構成するすべての細胞を生み出す内耳幹細胞が存在すると予想されて

いる。鳥類の内耳原器を構成する細胞にレトロウイルスで遺伝子マーキングを行ったFeketeらのグループは蝸牛・前庭それぞれの有毛細胞と支持細胞が、また、前庭の有毛細胞と神経節細胞が前駆細胞を共有することを示した¹⁾。しかしながら、この手技では蝸牛の有毛細胞と神経節細胞の共通の前駆細胞はまだ確認されていない。

内耳幹細胞(図3)

1993年成熟した哺乳動物においても前庭の有毛細胞がほんのわずかながらではあるが再生現象が認められるとの報告があり²⁾、成熟した内耳においても内耳幹細胞が存在する可能性が示された。また、レーザー照射法による有毛細胞脱落実験とタイムラプス・イメージングを組み合わせた方法で、Kellyらは有毛細胞に隣接した細胞が細胞分裂を経ることなく有毛細胞に変化することを示した³⁾。鳥類を用いた有毛細胞再生実験⁴⁾では支持細胞の一部が有毛細胞に分化する能力をもつことが示され、支持細胞の一部が内耳感覚

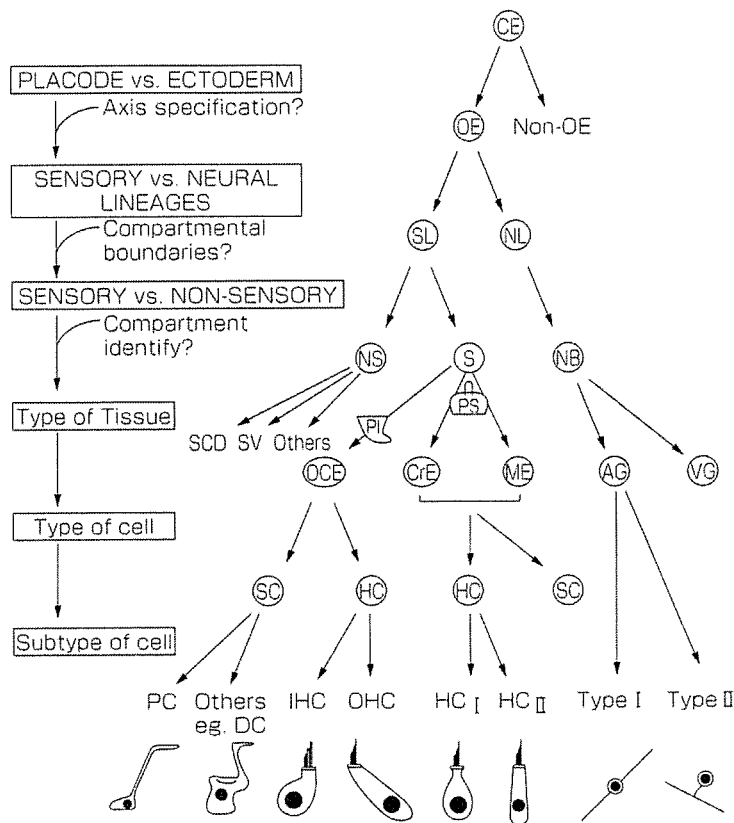


図2 内耳を構成する細胞の系譜

AG : auditory ganglion neurons. CE : cephalic ectoderm. CrE : crista epithelium. DC : Deiters' cells. HC : hair cell. HC_I : type I hair cell. HC_{II} : type II hair cell. IHC : inner hair cell. ME : macular epithelium. NB : neuroblasts. NL : neural lineage. NS : non-sensory cells. OCE : organ of Corti epithelium. OE : otic placode epithelium. OHC : outer hair cell. PC : pillar cell. PI : pars inferior. PS : pars superior. S : sensory cells. SC : support cell. SCD : semi-circular duct epithelium. SL : sensory lineage. SV : stria vascularis. VG : vestibular ganglion neurons
(文献27, 28より引用改変)

上皮の幹細胞ではないかと考えられるようになった。

2003年、Hellerらのグループは成熟したマウスの前庭感覚器官に多能性をもつ幹細胞が存在すると発表したり。彼らはインスリン様成長因子1 (Insulin-like growth factor-1 : IGF-1) と上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) を用いて成体マウスの内耳前庭器官の1つ、卵形嚢の平衡斑にある感覚上皮から sphere 状に増殖する細胞を得ることに成功した。内

耳前庭器官由来のこれらの細胞は、培養液中で長期間増殖することが可能なことから自己複製能をもつのではないかと考えられている。また、このような細胞塊を形成する細胞は神経幹細胞のマーカーの一種ネスチンを発現しており、未分化な状態であることが示唆された。この細胞は成長因子を除去し、半胎仔血清を加えることで内耳を構成する成熟した細胞のマーカー蛋白、すなわち有毛細胞マーカー (Math1, myosin VIIa,

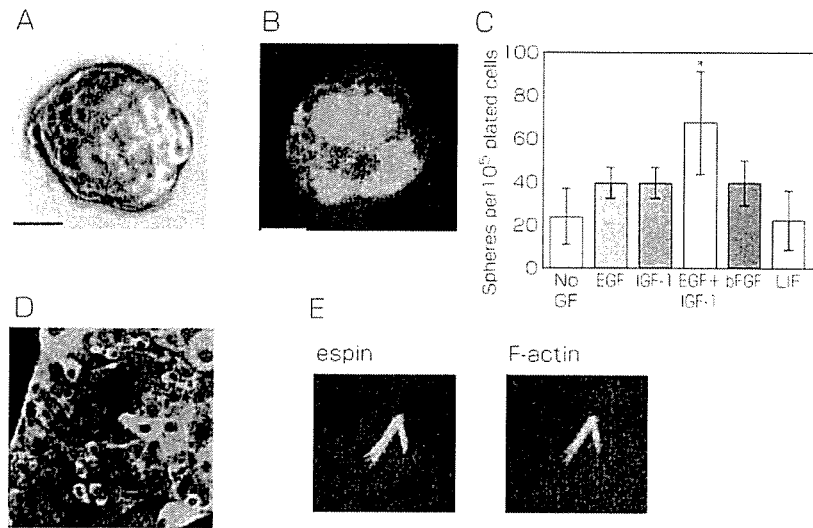


図3 成体内耳幹細胞 (→巻頭Color Gravure 参照)

- A: マウス前庭半嚔崗から培養された幹細胞
- B: 球状塊を形成する内耳幹細胞は未分化な細胞のマーカであるネスチンを発現する
- C: EGFおよびIGF-1を含んだ培養液で効率よく増殖する
- D: 支持細胞のマーカ-cytokeratinを発現する細胞で囲まれた有毛細胞のマーカ-espinを発現する細胞
- E: 有毛細胞のマーカ-espinとF-actinで染色される不動毛様構造

espin)、支持細胞マーカ (pan-cytokeratin)、神経細胞マーカ (Tuj1, neurofilament) を発現することが観察された。さらに、移植することにより、筋肉や肝臓のマーカ蛋白を発現したことから、さまざまな細胞に分化する能力 (多能性) をもつことも示唆された。

難聴治療のターゲットとしての内耳幹細胞 (図4)

以上紹介したように、成熟した哺乳類の内耳にも幹細胞が存在することが示唆された。このような細胞の発見は、今まで不可能とされた難聴治療法開発に向けての突破口となると期待されている。

現在のところ、内耳再生を目指し、幹細胞を利用した3つの戦略が考えられている。すなわち、①幹細胞移植による機能置換、②非対称分裂を経た内耳幹細胞から有毛細胞・支持細胞への分化誘導、③内耳幹細胞

から有毛細胞への分化転換、である。

内耳幹細胞は成熟した内耳においてもその存在が示唆されているが、存在してもごくわずかと考えられる。難聴を改善するには有毛細胞や神経節細胞の幹細胞・前駆細胞を増殖させるか、幹細胞を移植する必要がある。我々は高度難聴の治療には移植細胞による有毛細胞や神経節細胞の機能置換が有用であろうと考え、神経幹細胞を内耳へ移植した^{11,12)}。一部の細胞は蝸牛や前庭の感覚上皮や神経節中で生存し、有毛細胞や神経、グリアのマーカを発現する。また、神経細胞に誘導したES細胞や骨髄由来細胞をらせん神経節に移植することにより神経細胞やグリアのマーカを発現、有毛細胞の神経支配の可能性も示唆された^{13,14)}。移植細胞としては内耳由来の幹細胞が適当であると考えているが、内耳を構成する細胞はごく少数で、自己由来の細胞を採取することは不可能である。細胞供給源の視

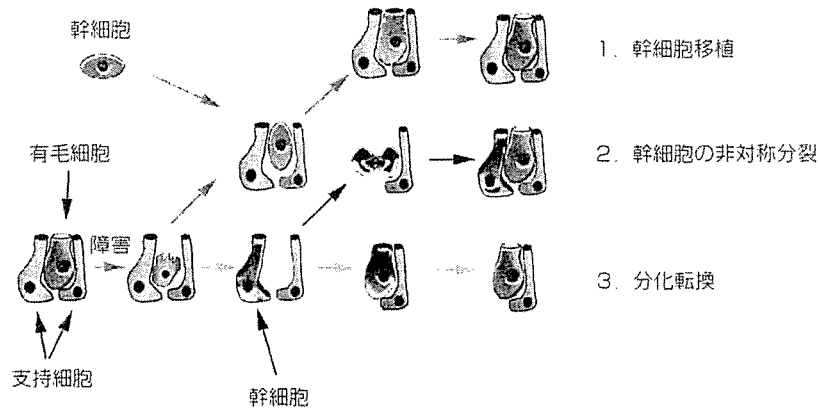


図4 内耳再生へ向けての戦略 (→巻頭 Color Gravure 参照!)

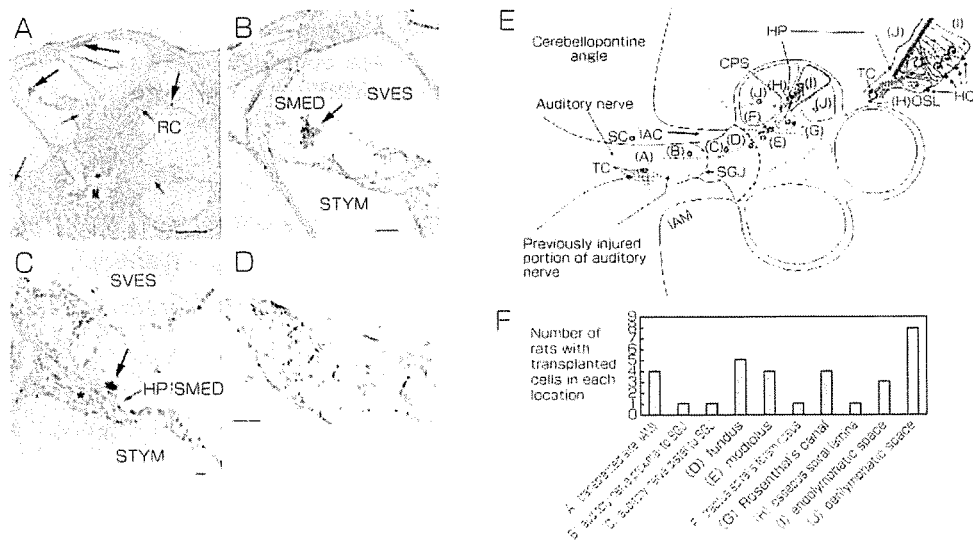


図5 内耳への細胞移植

A, B, C, D: 移植細胞の一部(矢印)は蝸牛管や神経節に存在
E, F: 想定された移植細胞の移動経路とその頻度

点から、胚性幹細胞や間葉系幹細胞など、旺盛な増殖能力をもつ他の組織由来細胞が候補として挙げられている。

胚性幹細胞や間葉系幹細胞からは内耳有毛細胞やらせん神経節細胞様細胞を分化誘導する方法が報告されている^{11, 12}。また、最近では成熟した哺乳類の皮膚線

維芽細胞からES細胞様細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)を作ること成功したとの報告があった¹³。このような細胞は患者本人の細胞から作製することができ、移植時の拒絶反応を回避できると期待される。また、ES細胞が直面する胚の破壊といった倫理的問題も避けることができる。iPS細

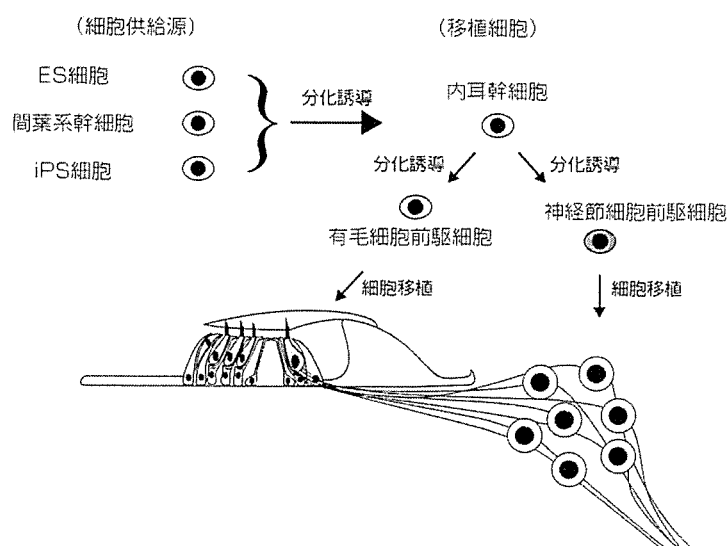


図6 幹細胞を用いた内耳再生への戦略

旺盛な増殖能をもつES細胞や自己由来の間葉系幹細胞およびiPS細胞から効率よく内耳の幹細胞・前駆細胞を誘導できれば内耳細胞移植療法の有力な細胞供給源となる。

胞は細胞供給の問題点を解決する切り札となる可能性を秘めており、このような細胞から内耳幹細胞への誘導法開発が期待される。

移植療法は内耳再生の大きな可能性を秘めているが、移植手術により内耳が損傷されてしまう危険性が存在する。我々は手術手技の開発にも取り組み、経頭蓋底的に移植することにより、内耳の膜迷路を破壊することなく蝸牛管まで細胞を導入できることを見出した²⁰⁾。今後、安全性の問題など臨床応用を目指したさらなる改善が期待される。

細胞移植以外にも、内耳における増殖・分化のメカニズムの解析^{21) 22)}を応用し、内在する幹細胞前駆細胞の有毛細胞・神経節細胞への分化誘導・分化転換をねらった研究がなされている。山本らは薬剤投与により有毛細胞を分化誘導することに成功している²³⁾。

幹細胞や前駆細胞が有毛細胞に分化誘導されても再生した動毛・不動毛が機能しなければ内耳の機能的再生は期待できない。田浦らは再生した動毛・不動毛が

機能するか否かを検討した²⁴⁾。前庭平衡斑を薬剤で傷害し、動毛・不動毛を一旦脱落させ、その後再生した動毛・不動毛が機能するか否か、カルシウムイメージング法を用いて観察したところ、再生毛を刺激することにより細胞内カルシウムが上昇し、機械的刺激を再生毛が正常と同じように受容できることが示唆された。

まとめ

内耳における幹細胞様細胞の発見およびES細胞や間葉系幹細胞、iPS細胞など多能性をもつ細胞など、内耳再生医療のツールが近年格段に増え、今まで不可能とされた内耳機能の再生へ近づいた感がある(図6)。臨床応用に向け、さらなる進展が望まれる。

●文献

- 1) Forge A, Li L, Corwin JT, et al: Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear.

- Science **259** : 1616-1619, 1993
- 2) Warchol ME, Lambert PR, Goldstein BJ, et al : Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. Science **259** : 1619-1622, 1993
- 3) Lang H, Fekete DM : Lineage analysis in the chicken inner ear shows differences in clonal dispersion for epithelial, neuronal, and mesenchymal cells. Dev Biol **234** : 120-137, 2001
- 4) Satoh T, Fekete DM : Clonal analysis of the relationships between mechanosensory cells and the neurons that innervate them in the chicken ear. Development **132** : 1687-1697, 2005
- 5) Kelley MW, Talreja DR, Corwin JT : Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of corti from embryonic and neonatal mice. J Neurosci **15** : 3013-3026, 1995
- 6) Girod DA, Duckert LG, Rubel EW : Possible precursors of regenerated hair cells in the avian cochlea following acoustic trauma. Hear Res **42** : 175-194, 1989
- 7) Li H, Liu H, Heller S : Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. Nat Med **9** : 1293-1299, 2003
- 8) Ito J, Kojima K, Kawaguchi S : Survival of neural stem cells in the cochlea. Acta Otolaryngol **121** : 140-142, 2001
- 9) Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, et al : Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. Neuroreport **14** : 1677-1681, 2003
- 10) Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, et al : Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. Acta Otolaryngol Suppl : 65-68, 2004
- 11) Okano T, Nakagawa T, Endo T, et al : Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. Neuroreport **16** : 1919-1922, 2005
- 12) Matsumoto M, Nakagawa T, Higashi T, et al : Innervation of stem cell-derived neurons into auditory epithelia of mice. Neuroreport **16** : 787-790, 2005
- 13) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, et al : Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. Neuroreport **15** : 1-4, 2004
- 14) Li H, Roblin G, Liu H, et al : Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A **100** : 13495-13500, 2003
- 15) Rivolta MN, Li H, Heller S : Generation of inner ear cell types from embryonic stem cells. Methods Mol Biol **330** : 71-92, 2006
- 16) Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, et al : Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A **102** : 4789-4794, 2005
- 17) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell **126** : 1-14, 2006
- 18) Sekiya T, Kojima K, Matsumoto M, et al : Cell transplantation to the auditory nerve and cochlear duct. Exp Neurol **198** : 12-24, 2006
- 19) Zine A, de Ribaupierre F : Notch/Notch ligands and Math1 expression patterns in the organ of Corti of wild-type and Hes1 and Hes5 mutant mice. Hear Res **170** : 22-31, 2002
- 20) Zine A, Aubert A, Qiu J, et al : Hes1 and Hes5 activities are required for the normal development of the hair cells in the mammalian inner ear. J Neurosci **21** : 4712-4720, 2001
- 21) Zheng JL, Shou J, Guillemot F, et al : Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. Development **127** : 4551-4560, 2000
- 22) White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, et al : Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. Nature **441** : 984-987, 2006
- 23) Lowenheim H, Furness D, Kil J, et al : Gene disruption of p27 (Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. Proc Natl Acad Sci U S A **96** : 4084-4088, 1999
- 24) Yamamoto N, Tanigaki K, Tsuji M, et al : Inhibition of Notch/RBP-J signaling induces hair cell formation in neonate mouse cochleas. J Mol Med **84** : 37-45, 2006
- 25) Taura A, Kojima K, Ito J, et al : Recovery of hair cell function after damage induced by gentamicin in organ culture of rat vestibular maculae. Brain Res **1098** : 33-48, 2006
- 26) Morsli H, Choo D, Ryan A, et al : Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. J Neurosci **18** : 3327-3335, 1998
- 27) Fekete DM, Wu DK : Revisiting cell fate specification in the inner ear. Curr Opin Neurobiol **12** : 35-42, 2002
- 28) Van De Water TR, Kojima K, Tateya I, et al : Stem cell biology of the inner ear and potential therapeutic applications. in Adult Stem Cell (ed. K. Turksen) 269-288, Humana Press, Totowa, NJ, 2004

Age-Dependent Degeneration of the Stria Vascularis in Human Cochleae

Teruhisa Suzuki, MD; Yukio Nomoto, MD; Takayuki Nakagawa, MD, PhD; Naofumi Kuwahata, MD; Hiroshi Ogawa, MD, PhD; Yukie Suzuki, MD, PhD; Juichi Ito, MD, PhD; Koichi Omori, MD, PhD

Objective: Aging is a common cause of acquired hearing impairments. This study investigated age-related morphologic changes in human cochleae, with a particular focus on degeneration of the stria vascularis (SV) and the spiral ganglion (SG). **Study Design:** Retrospective case review. **Methods:** The study group comprised 91 temporal bones from individuals aged 10 to 85 years who had no history or audiometric findings suggestive of specific causes of cochlear degeneration. We quantified the SV and SG atrophy at each cochlear turn using morphometric measurements. Correlations of the SV and SG atrophy with age, audiometric patterns of hearing loss, and auditory thresholds were statistically investigated. **Result:** The SV and the SG both showed a tendency for progressive atrophy to develop with age. However, statistically significant correlations were observed between aging and SV atrophy only in the apical and basal cochlear turns. These findings were consistent with those reported previously in gerbils. No significant correlations were detected between SV or SG atrophy and audiometric findings. **Conclusion:** SV atrophy appears to be the most prominent anatomic characteristic of aged human cochleae. **Key Words:** Aging, atrophy, cochlea, human, pathology, spiral ganglion, stria vascularis.

Laryngoscope, 116:1846–1850, 2006

INTRODUCTION

Age-related degenerative hearing loss (HL) is known as presbycusis and is the most common cause of hearing impairments in adults. As human populations age, this condition is expected to become more prevalent. At present, the therapeutic options for presbycusis are limited to the use of hearing aids. Until recently, mammals were thought to be unable to regenerate cochlear elements; however, recent medical advances have highlighted the potential for the regeneration of cochlear elements through gene or cell therapy.^{1,2} In addition, animal experiments have identified various molecules that might be applied therapeutically to protect cochlear cells.^{3–5} Although these experimental findings have not yet been applied clinically, they could help to establish novel therapeutic strategies for presbycusis.

It is crucial to determine the cells or tissues in aged cochleae that should be targeted by future therapies. Several animal experiments have indicated that degeneration of the stria vascularis (SV) or the spiral ganglion (SG) is a prominent pathologic, age-related cochlear change.^{6–12} However, studies on human temporal bones will be necessary to confirm the precise targets for therapeutic strategies. Previous research has demonstrated several age-related histopathologic changes in human cochleae.^{13–18} However, the general features of aged cochleae have not yet been established for humans. This is partly because the subjects of previous studies have tended to include patients with ear diseases or profound hearing impairments. In such cases, cochlear degeneration might be caused by ototoxic pathogens or an ototoxic internal environment, which makes it difficult to distinguish the specific abnormalities caused by aging. Recently, two articles^{19,20} carefully excluded temporal bones of subjects with a history of ear diseases. However, previous authors have examined insufficient numbers of human temporal bones to allow the general histopathologic characteristics of aged cochleae to be determined. To address these issues, we conducted a quantitative analysis of age-related histopathologic changes of the SV and SG using a large sample of human temporal bones.

From the Department of Otolaryngology (T.S., Y.N., N.K., H.O., Y.S., K.O.), Fukushima Medical University, School of Medicine, Fukushima, and the Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery (T.N., J.I.), Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication June 14, 2006.

This study was supported by Health and Labour Science Research Grants for Research on Sensory and Communicative Disorders from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.

Send correspondence to Dr. Koichi Omori, Department of Otolaryngology, Fukushima Medical University, School of Medicine, Hikarigaoka 1, Fukushima 960-1295, Japan. E-mail: omori@fmu.ac.jp; or Dr. Takayuki Nakagawa, Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, 606-8507 Kyoto, Japan. E-mail: tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

DOI: 10.1097/01.mlg.0000234940.33569.39

MATERIALS AND METHODS

Subjects

In total, 91 temporal bones from a collection of 1,278 specimens held at the Department of Otolaryngology, Fukushima Medical University, Japan, were selected for morphometric analyses. We used unilateral temporal bones from 91 different patients. We excluded subjects with history of ear diseases or ototoxic drug use by reviewing their medical records. Pure-tone audiometry had been performed within 24 months of death for all of the selected subjects. Individuals with audiograms showing a characteristic 4,000 Hz dip (that is, thresholds greater than 25 dB at 2 and 8 kHz), which indicates noise-induced HL, were excluded from the study. The subjects ranged in age from 10 to 85 years, with a mean and standard deviation of 59.7 and 16.8 years, respectively.

For all of the chosen subjects, the temporal bones had been removed within 48 hours of death and were fixed with 10% formalin. After decalcification, the temporal bones were embedded in celloidin and serially sectioned in a horizontal plane at a thickness of 20 μm . Every 10th section was stained with hematoxylin-eosin. The adjacent two mid-modiolus sections were subjected to morphometric assessments. In all the specimens used in this study, we found no postmortem degeneration in the SG and SV.

Audiometric Classification

The audiometric hearing-loss patterns were determined based on the air-conductance thresholds at frequencies of 250, 500, 1,000, 2,000, 4,000, and 8,000 Hz. All audiometric patterns with a threshold less than 25 dB were considered to be normal. A flat pattern was defined as HL with a threshold greater than 25 dB and a maximum threshold difference of 20 dB between frequencies of 250 and 8,000 Hz. A high-tone-loss pattern was defined as HL with a threshold greater than 25 dB at 4,000 and 8,000 Hz and a difference in thresholds between 2,000 and 4,000 Hz with an increase of more than 20 dB. A descending pattern was defined as HL with a threshold greater than 25 dB at 2,000, 4,000, and 8,000 Hz and a difference in thresholds between 2,000 and 4,000 Hz with an increase of less than 20 dB. In addition to the audiometric hearing-loss patterns, the average bone-conductance thresholds were determined at the following five

frequencies: 250, 500, 1,000, 2,000, and 4,000 Hz. This measure was used as an audiometric parameter.

Morphometric Assessments

Morphometric assessments of the SV and the SG were performed for each cochlear turn at the mid-modiolar level. Images were acquired with a charged-coupling device camera connected to a personal computer. The areas of the SV, Rosenthal's canal, and cochlear turn were quantified by measuring their cut surfaces using Image/J software (<http://www.nist.gov/lispix/imlab/prelim/dnld.html>) (Fig. 1A). The total number of nuclei in Rosenthal's canal was counted for each cochlear turn. The ratio of the SV area (SV ratio) and the cell density of the SG (SG density) were used to reduce the variance caused by differences in cutting directions among the cochlear specimens. The SV ratio was determined by dividing the SV area by that of the cochlear turn. The SG density was determined by dividing the number of nuclei in Rosenthal's canal by its area.

Statistics

The Pearson's correlation coefficient with Fisher's z transformation was used to examine the relationships between the following variables: age and average bone-conductance threshold; age and SV ratio or SG density for each cochlear turn; and average bone-conductance threshold and SV ratio or SG density. Differences in the SV ratio and SG density according to audiometric pattern were examined by a single factorial analysis of variance. A *P* value less than .05 was considered statistically significant.

RESULTS

Figure 2 shows the distribution of average bone-conductance thresholds according to age. A significant correlation was discovered between age and average auditory threshold (Fig. 2) ($r = 0.47$, $P < .0001$). This indicated that aging had a significant effect on the elevation of auditory thresholds among the members of the study group.

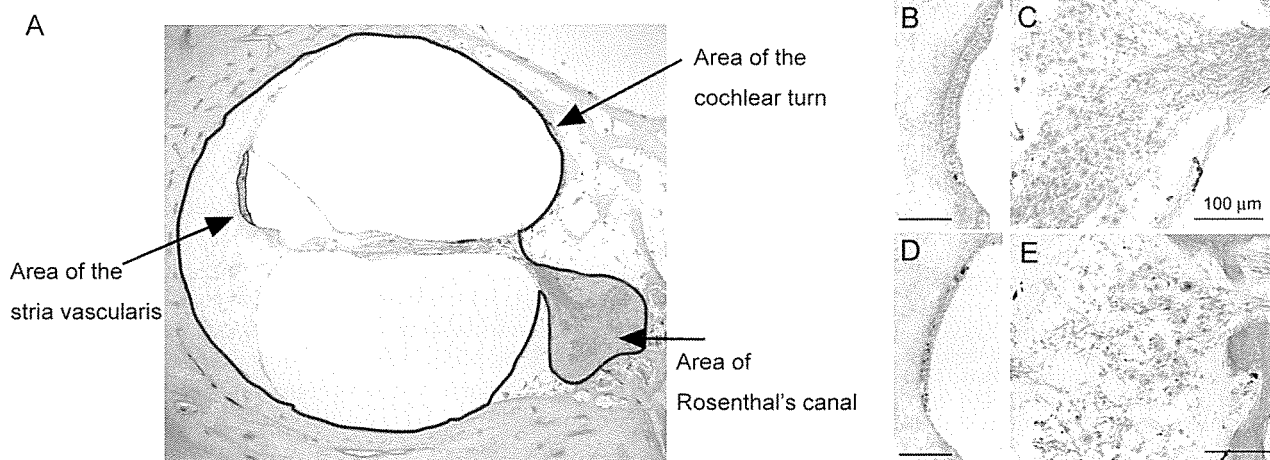


Fig. 1. Morphology of human cochleae. (A) Basal turn of cochlea of 38-year-old male. Area of cochlear turn (black line). Area of SV (dotted line). Area of Rosenthal's canal (gray section). (B) Stria vascularis (SV) of 19-year-old male showing no atrophic changes. (C) Spiral ganglion (SG) of a 37-year-old female exhibiting numerous neurons. (D) SV of 79-year-old male, which is more atrophic than that shown in B. (E) SG of a 77-year-old female, which shows relatively few neurons. Scale bars = 100 μm .

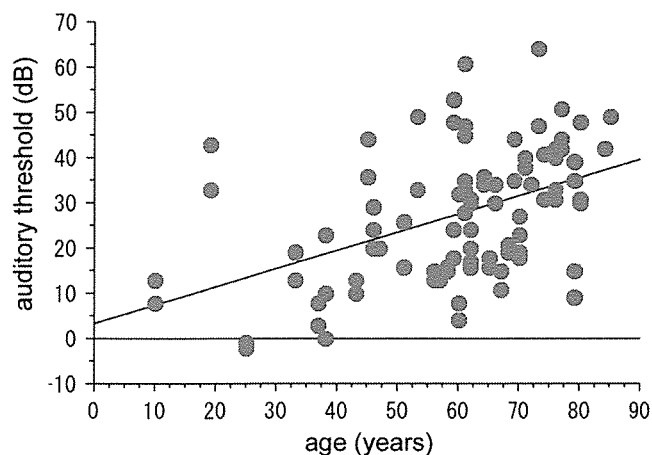


Fig. 2. Relationship between auditory threshold and age. x-axis shows age (years) and y-axis shows average bone-conductance thresholds (dB) at five frequencies (250, 500, 1,000, 2,000, and 4,000 Hz). Significant correlation was detected between average auditory threshold and age using the Pearson's correlation coefficient with Fisher's z transformation ($r = 0.47$, $P < .0001$).

Figure 3 shows the distribution of SV ratios for each cochlear turn according to age. A trend for the SV ratio to decrease with age was seen at every cochlear turn. A significant correlation between age and the SV ratio was found in the basal cochlear turn (Fig. 3A) ($r = -0.36$, $P = .0003$) and the apical cochlear turn (Fig. 3C) ($r = -0.23$, $P = .025$). By contrast, no significant correlation was observed in the middle cochlear turn (Fig. 3B). Figure 4 shows the distribution of SG densities for each cochlear turn according to age. Although the SG densities tended to decrease with age, none of the cochlear turns showed a statistically significant correlation between these variables.

The subjects of the present study were divided into four groups according to their audiometric patterns, as follows: 37 subjects showed a normal pattern, 25 subjects showed a descending pattern, 19 subjects showed a flat pattern, and 10 patients showed a high-tone-loss pattern. The means and standard errors of the SV ratios and SG densities for each audiometric-pattern group are shown in Figure 5. There were no significant differences in either the SV ratios or the SG densities among the audiometric pattern groups for each cochlear turn. We also examined the relationship between the average auditory threshold and the SV ratio or the SG density at each cochlear turn. No significant correlations were observed between these parameters.

DISCUSSION

The study group in the present analysis was screened to exclude individuals with hearing impairments caused by ototoxic pathogens other than aging by reviewing their medical records and pure-tone audiograms. Morphometric analysis of the 91 selected subjects revealed a significant correlation between auditory threshold and age, which indicated that aging had important effects on hearing performance, at least within our study population.

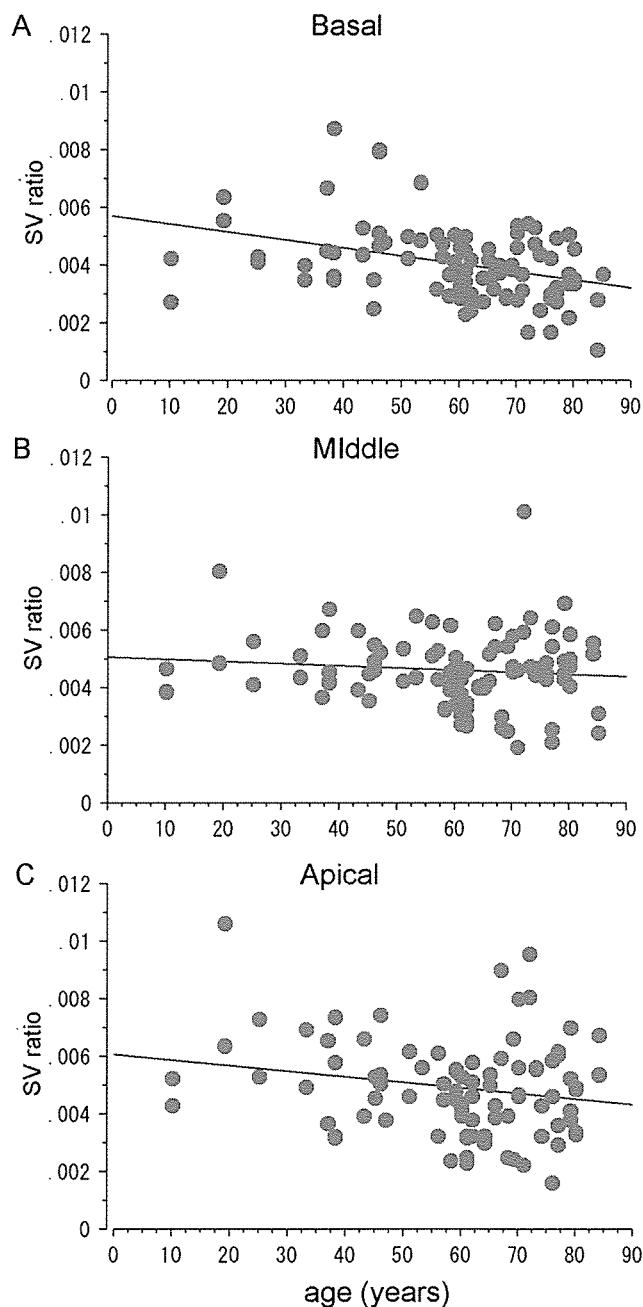


Fig. 3. Relationship between stria vascularis (SV) ratio and age in basal (A), middle (B), and apical (C) cochlear turns. x-axis shows age (yr) and y-axis shows SV ratio. Significant correlations between SV ratio and age were observed in basal and apical cochlear turns according to Pearson's correlation coefficient with Fisher's z transformation ($r = -0.36$, $P = .0003$ and $r = -0.23$, $P = .025$, respectively).

Our present findings demonstrated a significant correlation between SV atrophy and aging in human cochleae. This was consistent with previous findings reported for animal models. A series of studies on gerbils that were maintained under quiet conditions indicated that SV degeneration was the most prominent age-related histologic change in their cochleae.⁶⁻⁸ Age-related SV degeneration in these gerbil models was

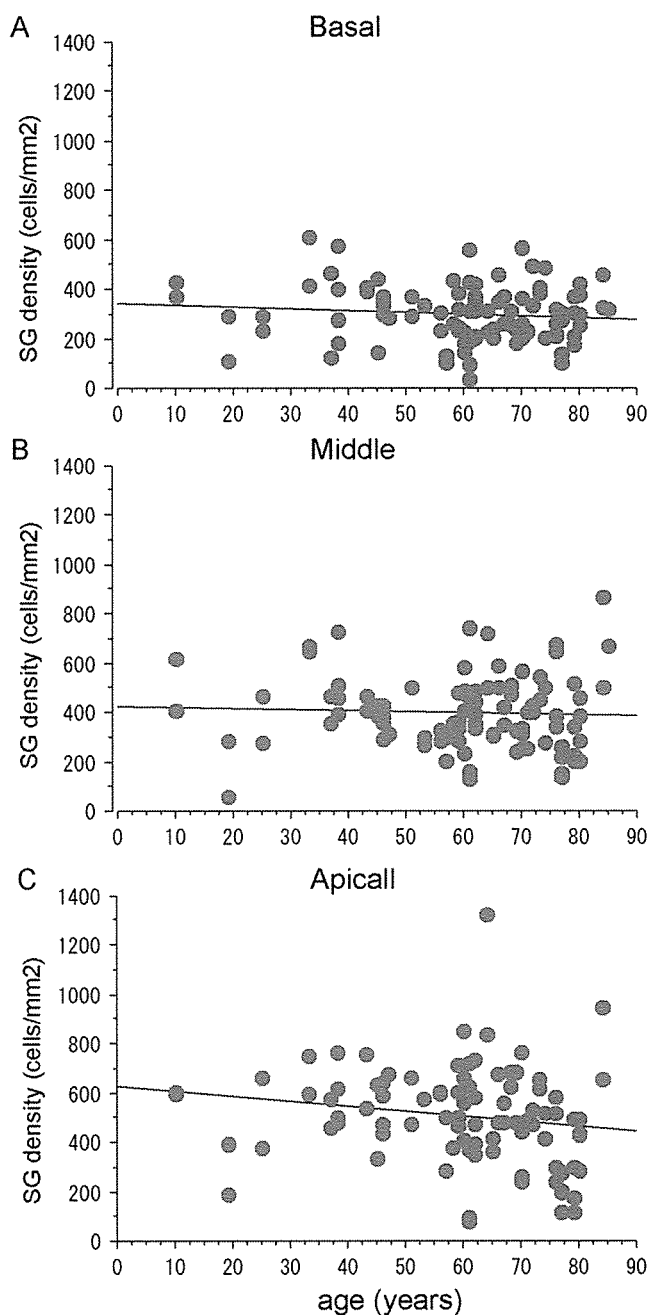


Fig. 4. Relationship between spiral ganglion (SG) density and age in basal (A), middle (B), and apical (C) cochlear turns. x-axis shows age (yr) and y-axis shows SG density. No significant correlations were observed between SG density and age in basal, middle, and apical cochlear turns.

usually found to originate in both the base and the apex of the cochleae. Our present results also identified significant aging effects on SV atrophy in the basal and apical portions of human cochleae. These findings support the hypothesis that SV degeneration is a morphologic characteristic of age-induced cochlear degeneration.

Schuknecht and Gacek¹⁴ described degeneration of the SV as the most prominent morphologic characteristic

of age-related HL based on their observations of human temporal bones. Recent morphometric analysis of human temporal bones²⁰ also supported this hypothesis. Nelson and Hinojosa¹⁹ controversially concluded that SV atrophy was not specific to aged human cochleae with flat audiometric patterns of HL based on a precise morphometric analysis. The present study found no significant correlation between SV atrophy and audiometric patterns of HL or thresholds, although a significant correlation was detected between SV atrophy and aging. Previous studies on human subjects have indicated a poor correlation between audiometric patterns of HL and cochlear histopathology.¹⁵⁻¹⁸ We therefore conclude that SV atrophy is an anatomic characteristic of age-induced cochlear changes but suggest that it is difficult to discern cochlear histopathology from conventional pure-tone audiometry.

The present study failed to find an age-dependent decrease in SG density. By contrast, several previous studies found significant correlations between aging and loss of SG neurons in both humans^{15,20} and animal models.^{11,12} These reports frequently noted a loss of SG neurons coupled with a loss of cochlear hair cells. Gates and Mills¹⁸ showed that subjects experiencing loss of cochlear hair cells and SG neurons frequently had histories of noise exposure, indicating that these morphologic findings in human cochleae might have been induced by environmental noise. By contrast, in gerbils maintained under quiet conditions, which demonstrated age-dependent SV degeneration, loss of auditory nerve function was indicated by elevation of the compound action potentials of auditory nerves.¹⁰ Recently, changes of the expression patterns of brain-derived neurotrophic factors have been demonstrated in the SG neurons of aged rats and gerbils.²¹ This functional degeneration involved no significant loss of SG neurons. We therefore consider that the degeneration of SG neurons might be involved in age-related HL. However, these degenerative changes of the SG neurons cannot be detected by conventional histopathology of human temporal bones.

The present study failed to identify significant correlations between morphologic and audiometric findings in human subjects similar to those reported previously. One possible explanation for this discrepancy is that histologic findings obtained by conventional light microscopy cannot reveal changes in the functionality of cochlear elements, which might play critical roles in the process of age-induced HL.

CONCLUSION

Our present analysis of 91 temporal bones indicates that SV atrophy is the most common histopathologic feature of aged human cochleae. This conclusion is supported by previous observations of aged animal models and human temporal bones. By contrast, age-dependent SG atrophy was not detected by conventional light microscopy in the present study, although several previous studies have indicated a correlation between functional degeneration of SG neurons and aging.

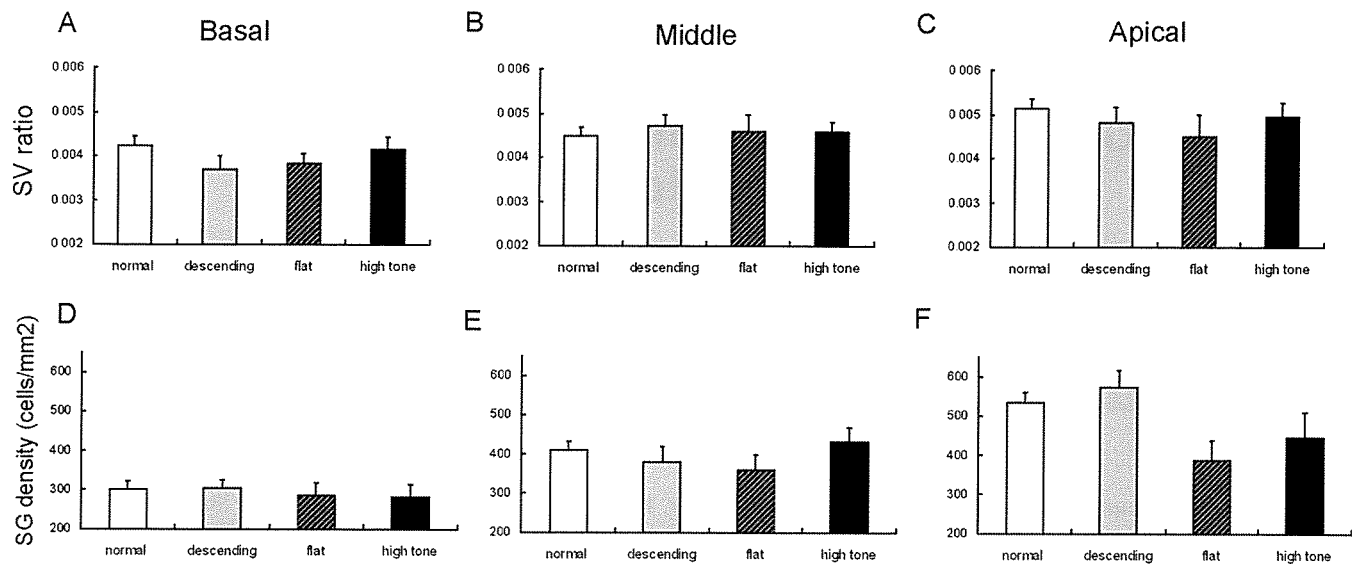


Fig. 5. Means and standard errors of stria vascularis (SV) ratios (A to C) and spiral ganglion (SG) densities (D to F) of experimental groups divided according to audiometric hearing-loss patterns. No significant differences in SV ratios or SG densities were found among experimental groups in the basal, middle, or apical cochlear turns.

Acknowledgments

The authors thank Professor emeritus Iwao Ohtani for his establishment of temporal bone laboratory and Etsuko Sato for her technical contribution to this work.

BIBLIOGRAPHY

- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005;11:271–276.
- Okano T, Nakagawa T, Endo T, et al. Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *Neuroreport* 2005;16:1919–1922.
- Seidman MD. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope* 2000;110:727–738.
- Ernfors P, Duan ML, El Shamy WM, Canlon B. Protection of auditory neurons from aminoglycoside toxicity by neurotrophin-3. *Nat Med* 1996;2:463–467.
- Iwai K, Nakagawa T, Endo T, et al. Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 2006;116:526–533.
- Spicer SS, Schulte BA. Spiral ligament pathology in quiet-aged gerbils. *Hear Res* 2002;172:172–185.
- Spieß AC, Lang H, Schulte BA, et al. Effects of gap junction uncoupling in the gerbil cochlea. *Laryngoscope* 2002;112:1635–1641.
- Schulte BA, Schmiedt RA. Lateral wall Na, K-ATPase and endocochlear potentials decline with age in quiet-reared gerbils. *Hear Res* 1992;61:35–46.
- Schmiedt RA, Lang H, Okamura HO, Schulte BA. Effects of furosemide applied chronically to the round window: a model of metabolic presbycusis. *J Neurosci* 2002;22:9643–9650.
- Hellstrom LI, Schmiedt RA. Compound action potential in-put/output functions in young and quiet-aged gerbils. *Hear Res* 1990;50:163–174.
- Shiga A, Nakagawa T, Nakayama M, et al. Aging effects on vestibulo-ocular responses in C57B/6 mice: comparison with alteration in auditory function. *Audiol Neurootol* 2005;10:97–104.
- Keithley EM, Ryan AF, Woolf NK. Spiral ganglion cell density in young and old gerbils. *Hear Res* 1989;38:125–133.
- Schuknecht HF. *Pathology of the Ear*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1974.
- Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102:1–16.
- Suga F, Lindsay JR. Histopathological observations of presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976;85:169–184.
- Engstrom B, Hillerdal M, Laurell G, Bagger-Sjöback D. Selected pathological findings in the human cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1987;436:110–116.
- Jennings CR, Jones NS. Presbycusis. *J Laryngol Otol* 2001;115:171–178.
- Gates GA, Mills JH. Presbycusis. *Lancet* 2005;366:1111–1120.
- Nelson EG, Hinojosa R. Presbycusis: a human temporal bone study of individuals with flat audiometric patterns of hearing loss using a new method to quantify stria vascularis volume. *Laryngoscope* 2003;113:1672–1686.
- Kusunoki T, Cureoglu S, Schachern PA, et al. Age-related histopathologic changes in the human cochlea: a temporal bone study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:897–903.
- Rüttiger L, Panford-Walsh R, Schimmang T, et al. BDNF mRNA expression and protein localization are changed in age related hearing loss. *Neurobiol Aging* 2006 March 29; Epub ahead of print.

Cell–Gene Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor to the Mouse Inner Ear

Takayuki Okano, Takayuki Nakagawa,* Tomoko Kita, Tsuyoshi Endo, and Juichi Ito

Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 606-8507 Kyoto, Japan

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed at the Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, 606-8507 Kyoto, Japan. Fax: +81 75 751 7225. E-mail: tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp.

Available online 7 September 2006

Sensorineural hearing loss is a common disability, but treatment options are currently limited to cochlear implants and hearing aids. Studies are therefore being conducted to provide alternative means of biological therapy, including gene therapy. Safe and effective methods of gene delivery to the cochlea need to be developed to facilitate the clinical application of these therapeutic treatments for hearing loss. In this study, we examined the potential of cell–gene therapy with nonviral vectors for delivery of therapeutic molecules into the cochlea. NIH3T3 cells were transfected with the brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*) gene using lipofection and then transplanted into the mouse inner ear. Immunohistochemistry and Western blotting demonstrated the survival of grafted cells in the cochlea for up to 4 weeks after transplantation. No significant hearing loss was induced by the transplantation procedure. A *Bdnf*-specific enzyme-linked immunosorbent assay revealed a significant increase in *Bdnf* production in the inner ear following transplantation of engineered cells. These findings indicate that cell–gene delivery with nonviral vectors may be applicable for the local, sustained delivery of therapeutic molecules into the cochlea.

Key Words: gene therapy, cell transplantation, hearing loss, cochlea, brain-derived neurotrophic factor, nonviral vector

INTRODUCTION

Sensorineural hearing loss (SNHL) is one of the most common disabilities in industrialized countries. Defects in the auditory hair cells, and in their associated spiral ganglion neurons (SGNs), can lead to hearing loss or deafness. Approximately 50% of SNHL cases have a genetic basis, a significant proportion of which is non-syndromic and usually inherited in an autosomal recessive manner [1]. In the past decade, many genetic mutations that cause deafness have been identified, which may contribute to the biological sources available for therapeutic approaches. Should the restoration of mutated genes in the cochlea by gene manipulation become a reality, gene therapy might be a promising method for treating SNHL of genetic origin.

Protecting auditory hair cells and SGNs from irreversible degeneration is a primary objective as inner ear cells have limited regeneration capacity. With the recent increase in understanding of the role of neurotrophic factors, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), on the maintenance of the mature peripheral auditory systems, there have been numerous attempts to define ways to reduce hair cell and SGN degeneration [2–6].

Since neurotrophins have a short serum half-life of just minutes or hours [7], their sustained local delivery is essential for cochlear protection. Previous studies have used viral vectors, particularly adenoviruses or adeno-associated viruses, to deliver neurotrophins to the cochlea [8–13]. However, despite their high transduction efficiency, high titer, and ease of production, viral vectors involve potential toxicity.

Gene therapy could enable the long-term delivery of several agents into the inner ear. Cell transplantation has been used as a means of delivering peptides or proteins into the central nervous system, demonstrating its use as a delivery vehicle for therapeutic molecules [14–16]. In addition, recent studies have demonstrated successful cell transplantation into the mouse cochlea [17,18]. Therefore, transplantation of cells that have been genetically manipulated *in vitro* using nonviral vectors potentially resolves the problem of viral vector toxicity in cochlear gene therapy.

In this study, we conducted an examination of the efficiency of cell–gene delivery into the cochlea for application of therapeutic molecules to the treatment of SNHL. We chose NIH3T3 cells as a delivery vehicle for the