

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
中川隆之:	聴力のバイオロジー：老化による聴力低下のメカニズムと聴力再生への取り組み.	日老医誌	41: 607-609, 2004.
Lee JE, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Shiga A, Lee SH, Ito J:	Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis.	ORL	2004;66:111-118.
Kitajiri S, Fukumoto K, Hata M, Sasaki H, Katsuno T, Nakagawa T, Ito J, Tsukita S, Tsukita S:	Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia.	J Cell Biol	2004;166:559-570.
中川隆之, 井口福一郎, 伊藤壽一:	内耳への神経幹細胞移植.	炎症・再生	24:562-566, 2004.
Endo T, Nakagawa T, Iguchi F, Kita T, Okano T, Sha SH, Schacht J, Shiga A, Kim TS, Ito J:	Elevation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure.	Free Rad Biol Med	2004;38 : 492-498.
Shiga A, Nakagawa T, Nakayama M, Endo T, Iguchi F, Kim TS, Naito Y, Ito J:	Aging effects on vestibulo-ocular responses in C57B/6 mice: comparison with alteration in auditory function.	Audiol Neurootol	2005;10:97-104.
Takebayashi S, Nakagawa T, Kojima K, Kim TS, Endo T, Iguchi F, Kita T, Yamamoto N, Ito J:	Nuclear translocation of beta-catenin in developing auditory epithelia of mice.	Neuroreport	2005;16:431-434.
Nakagawa T, Ito J:	Cell therapy for inner ear diseases.	Curr Pharm Des	2005;11:1203-1207.
Endo T, Nakagawa T, Kita T, Iguchi F, Kim TS, Tamura T, Iwai K, Tabata Y, Ito J.	A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel.	Laryngoscope	2005;115:2016-2020.

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
Kim TS, Nakagawa T, Kitajiri S, Endo T, Takebayashi S, Iguchi F, Kita T, Tamura T, Ito J.	Disruption and restoration of cell-cell junctions in mouse vestibular epithelia following aminoglycoside treatment.	Hear Res	2005;205:201-209.
Tamura T, Kita T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Ishihara T, Mizushima Y, Higaki M, Ito J.	Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles.	Laryngoscope	2005;115:2000-2005.
Kita T, Nakagawa T, Kim TS, Iwai K, Takebayashi S, Akaike A, Ito J.	Serofendic acid promotes survival of auditory hair cells and neurons of mice.	Neuroreport	2005;16:689-692.
伊藤壽一：	内耳への新しい薬物投与方法 -徐放性ドラッグデリバリーシステム-	耳鼻臨床	98:1-4, 2005.
伊藤壽一：	内耳の再生医療.	Drug Delivery System	20:96-104, 2005.
岩井浩治, 内藤 泰：	内耳障害と再生医学シリーズ① 内耳障害の病態1.	JOHNS	21:122-124, 2005.
岩井浩治, 中川隆之：	内耳障害と再生医学シリーズ⑨ 内耳障害モデル.	JOHNS	21:1424-1425, 2005.
岩井浩治, 伊藤壽一：	内耳障害と再生医学シリーズ⑫ 内耳再生の臨床応用への展望.	JOHNS	21:1830-1831, 2005.
岡野高之, 内藤 泰：	内耳障害と再生医学シリーズ② 内耳障害の病態2.	JOHNS	21:256-259, 2005.
平海晴一：	人工感覚器.	人工臓器	34 : 171-173, 2005.

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 Oto-laryngologica	2007;127:Suppl557:3-7.
Tsuji J, Murai N, Naito Y, Ito J.	c-Fos expression in the mouse brainstem after unilateral labyrinthectomy.	Acta Oto-laryngologica	2007;127:Suppl557:8-11.

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
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.
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.
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.

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
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.

A New Method for Drug Application to the Inner Ear

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

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

Key Words

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

Abstract

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

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Introduction

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

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

KARGER

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

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

Accessible online at:
www.karger.com/orl

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

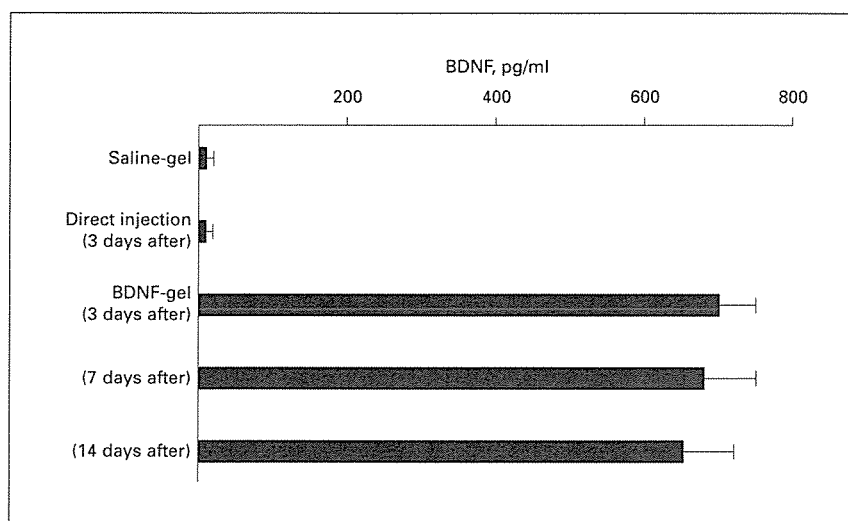


Fig. 1. Concentrations of BDNF in the perilymph.

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

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

Materials and Methods

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

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

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

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

Results

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

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

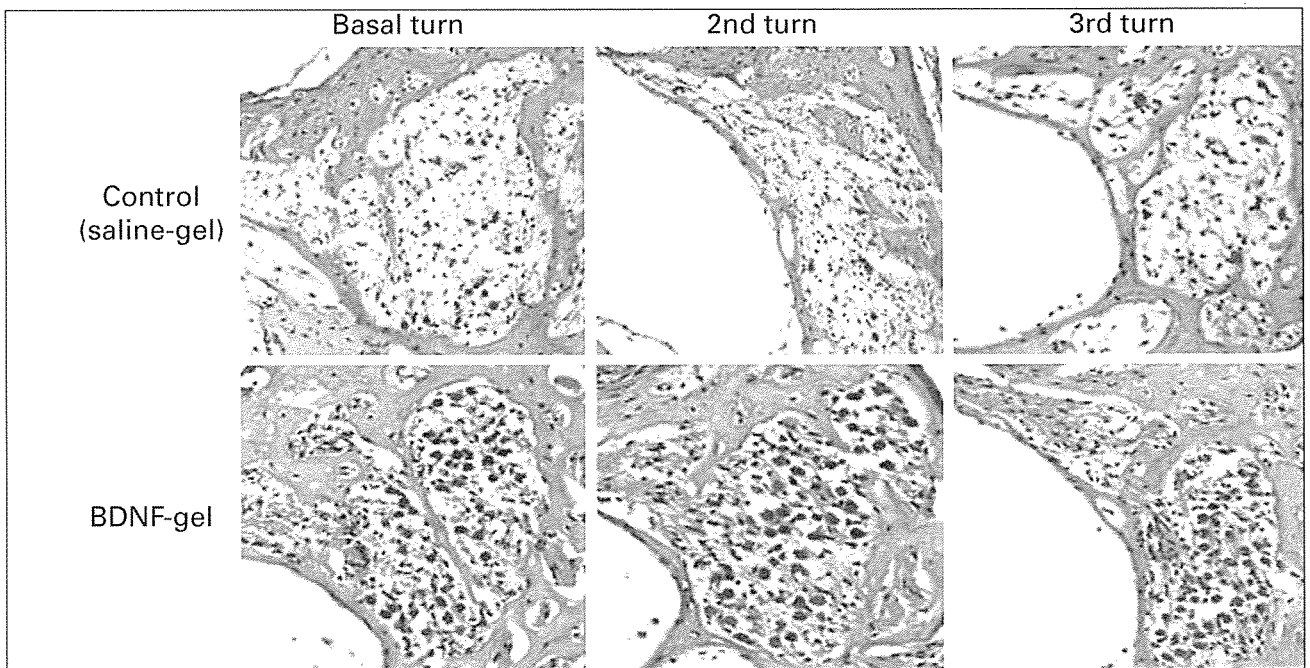


Fig. 2. Histological evaluation of the degeneration of SGNs in each turn of the cochlea 7 days after treatment with a hydrogel immersed in a BDNF solution or physiological saline alone. Hematoxylin-eosin staining.

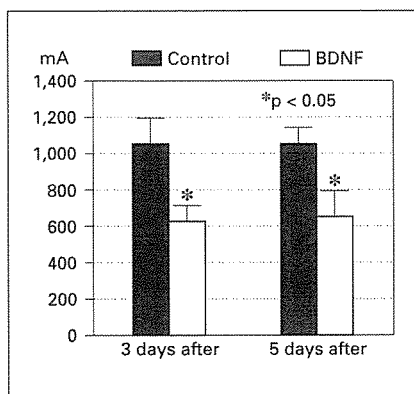


Fig. 3. Functional assessment of protective effects of BDNF application by hydrogel using EABR. The difference in alteration of EABR thresholds between BDNF and saline groups is significant 3 and 5 days after BDNF application.

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

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

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

Discussion

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

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

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

Acknowledgment

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

References

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

内耳再生へ向けての 幹細胞・前駆細胞の応用

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

Keywords

内耳幹(前駆)細胞
上皮成長因子
細胞移植
機能置換
再生医療

小島 憲

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

Summary

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

はじめに

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

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

Kojima, Ken

Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine
21st Century COE Program, Kyoto University Hospital

E-mail : kojimaken@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

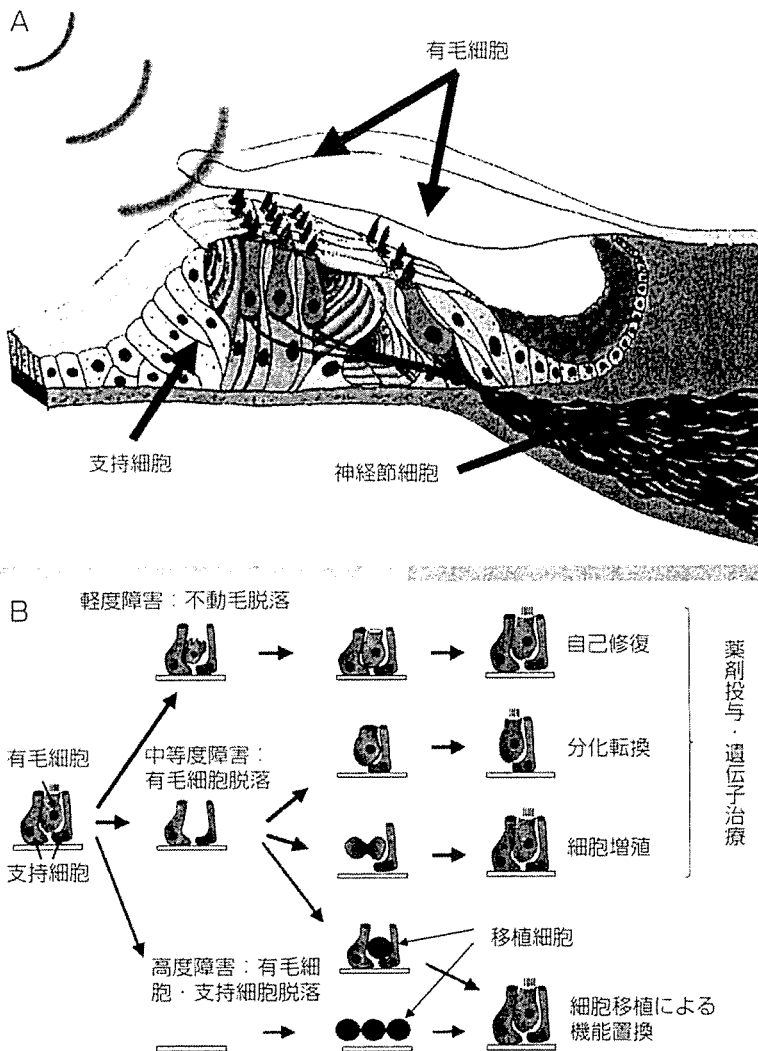
近の報告に我々の結果を交えて紹介する。

内耳修復に向けての戦略

声や音楽などの音情報は、外耳・中耳を経由し、内耳の蝸牛において電気

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

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



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

図1 内耳の音情報伝達にかかわる感覚器である蝸牛を構成する細胞群

保しなければならない。

内耳幹細胞・前駆細胞

血球系だけでなく中枢神経系など、さまざまな臓器に多分化能をもつ幹細胞や前駆細胞が発見され、すでに一部では細胞移植療法として臨床応用されている。内耳では、厳密に幹細胞といえる細胞はいまだに同定されていない。その理由の一つには、内耳は構成する細胞数が少なく、同時に細胞の増殖能力が低いことから、細胞を分散し培養系を樹立することすら困難であったことが挙げられる。この問題を克服するために、不死化遺伝子を導入したマウスなどの内耳から有毛細胞前駆細胞の培養細胞系を樹立する試みがなされた²¹⁻²⁷⁾。

Holleyら²¹⁾は、温度感受性T抗原(DNA型癌ウイルスの初期遺伝子がコードする蛋白質)遺伝子の組み込まれたマウスの卵形嚢から、Baraldら²²⁾はウズラとマウスの耳胞から、Kalinecら²³⁾は蝸牛から不死化した細胞を取り出した。これらの細胞は培養温度を変化することにより温度感受性T抗原の発現をコントロールし、細胞の分裂や分化を制御することが可能である。これらグループによると分化誘導することにより、不死化細胞から神経細胞の特徴をもつ細胞が出現した。この結果は内耳感覚上皮に神経系の前駆細胞が存在することを示唆する。一方、Rivoltaら²⁴⁾が蝸牛から、Lawlorら²⁵⁾、Zhengら²⁶⁾は卵形嚢から有毛細胞

に分化する能力をもつ細胞を得ている。このうち、Lawlorらの得た細胞は、後に有毛細胞とともに支持細胞に分化する能力をもつことが示され²⁵⁾、内耳有毛細胞と支持細胞は共通の前駆細胞をもつことが示唆されている。これらの結果は、耳胞・耳板から内耳有毛細胞と支持細胞、神経細胞が発生する組織学的なアプローチから得られた知見やレトロウイルスを用いた細胞トレースの研究結果と一致する²¹⁻²⁴⁾。一方、第8脳神経節を構成するグリアのほとんどは神経堤から発生するとされているが、前述のKalinecらは蝸牛の感覚上皮から有毛細胞の特徴をもつ細胞とともに、グリアの特徴をもつ細胞も得ている。この結果は、耳胞がわずかながらでも神経節に存在するグリアの形成にかかわっている可能性をうかがわせる。これらの研究から、有毛細胞・支持細胞・神経節細胞が前駆細胞を共有することが示唆されていた。

上皮成長因子(EGF)応答性胎仔耳胞細胞

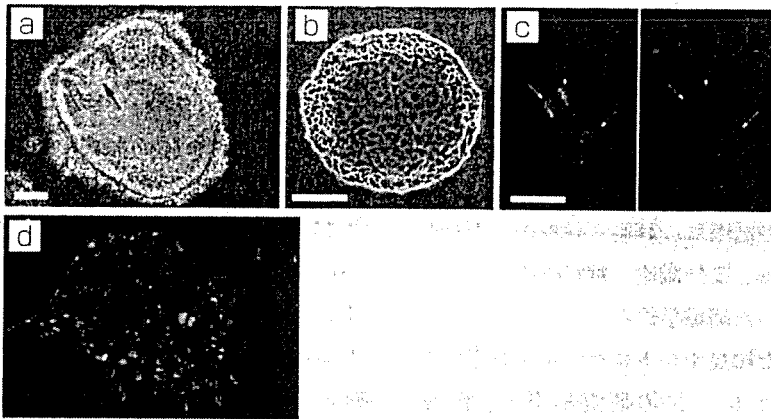
温度感受性不死化遺伝子を用いて内耳から得た細胞は、温度変化により増殖分化を制御することが可能であり、細胞の系譜の解析や発現遺伝子の解析などに有用なツールである。しかしながら、正常と同じ分裂・分化のメカニズムが働いているわけではないため、成長因子や細胞外マトリクスなど環境の影響を解析するには不向きと考えられるうえ、移植治療に用いるドナー細胞

としての応用は困難ではないかと思われる。この問題を解決するため、成長因子を用いて内耳から細胞を取り出す試みがされている。Malgrangeらは上皮成長因子(epidermal growth factor: EGF)または線維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor: FGF) 2を用いて新生仔ラット蝸牛から有毛細胞と支持細胞に分化する細胞を²⁸⁾、Zhaoは皮膚のケラチノサイトを培養する方法を用いて、成熟したモルモットの蝸牛から有毛細胞に分化する細胞を得ている²⁹⁾。

一方、我々はEGFを含んだ無血清培地を用いて、ラット胎仔(胎生12日)の耳胞から長期培養が可能な培養系を確立した(図2 a, b)¹⁰⁾。胎生12日の耳胞では蝸牛管の形成は認められず、未分化な細胞が豊富に含まれていると考えられる。我々はこの培養細胞(EGF応答性胎仔耳胞細胞)を用いて、①長期間培養系で未分化な性質を保つことができるのか、②どのような細胞に分化する能力をもつのか、以上2点について調べた。

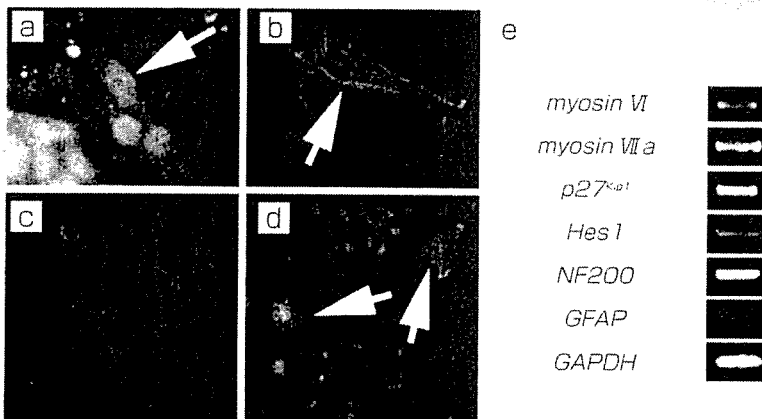
胎仔耳胞から得た細胞を3ヵ月間以上培養した後、分裂能を反映する核へのBrdUの取り込みを調べたところ、一部の細胞でBrdUの取り込みが観察された(図2 c)。また、大部分の細胞で神経幹細胞のマーカー蛋白であるネスチンの発現が認められた(図2 d)。これらの結果から、我々の用いた培養環境では、耳胞細胞は未分化な性質を維持できることが示された。

次いで、免疫染色およびRT-PCR法



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

図2 耳胞細胞培養系を樹立(→巻頭Color Gravure参照)



a: 有毛細胞のマーカーマイオシンVIIa(赤)を発現する細胞(矢印), b: 支持細胞マーカであるシトケラチン(緑)とp27^{kip1}(赤)を共発現する細胞(矢印), c: neuron specific enolase(神経のマーカ)を発現する細胞, d: 支持細胞マーカであるGFAPが陽性の細胞(矢印), e: RT-PCRはそれぞれの細胞マーカが発現していることを示す。

図3 耳胞細胞の分化誘導(→巻頭Color Gravure参照)

を用いて耳胞細胞の分化能力を調べた。内耳有毛細胞のマーカとしてmyosin VIとmyosin VIIaを、支持細胞のマーカとしてcytokeratinとp27^{kip1}、Hes1を、神経細胞のマーカとしてneurofilament 200kD (NF200)を、グリアのマーカとしてglial fibrillary acidic protein (GFAP)を用いた。EGF応答性胎仔耳胞細胞は、培養密度を高くすることにより細胞分裂が抑制されて分化傾向になり、さまざまな特徴をもつ細胞が出現した。免疫組織では、円柱状で核の偏在が認められた細胞では有毛細胞のマーカmyosin VIIaの強い発現が(図3 a)、扁平で多角形の細胞は2種類の支持細胞のマーカcytokeratinとp27^{kip1}の共発現が認められた(図3 b)。また、双極性の細胞では神経細胞のマーカneuron specific enolaseの発現を認め(図3 c)、グリアや支持細胞のマーカであるGFAPが陽性の細胞(図3 d)もみられた。RT-PCRでは、有毛細胞(myosin VI, myosin VIIa)、支持細胞(Hes1, p27^{kip1}, GFAP)、神経細胞(NF200)の各マーカの遺伝子発現がみられた(図3 e)。内耳は発生の中期中に外胚葉組織の肥厚したシンプルな耳板から複雑な膜迷路を形成する。内耳有毛細胞や支持細胞、らせん神経節細胞はいずれも耳板に由来し、共通の前駆細胞(内耳幹細胞)が存在するのではないかと考えられている(図4)。EGF応答性胎仔耳胞細胞は、高密度培養により内耳有毛細胞や支持細胞、神経細胞への分化が誘導されたと考えられる。結果的に有毛

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

障害内耳感覚器と耳胞の共培養

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

内耳前駆細胞による移植治療の可能性と問題点

以上の結果から、EGF応答性胎仔耳胞細胞は傷害された内耳感覚器の影

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

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

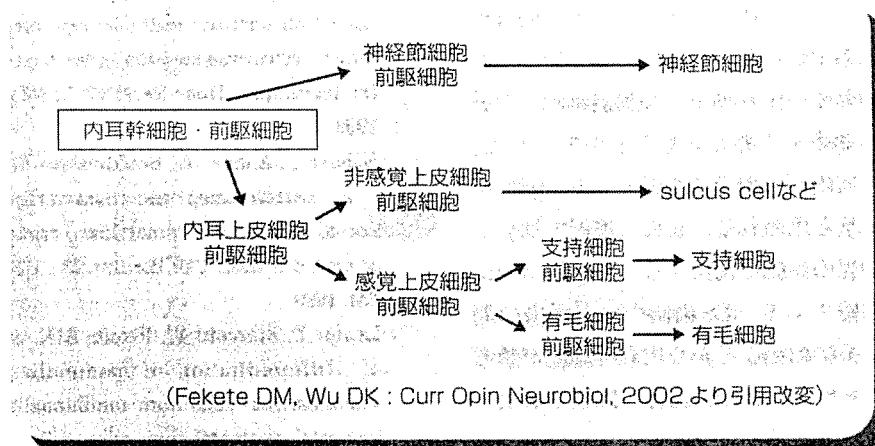
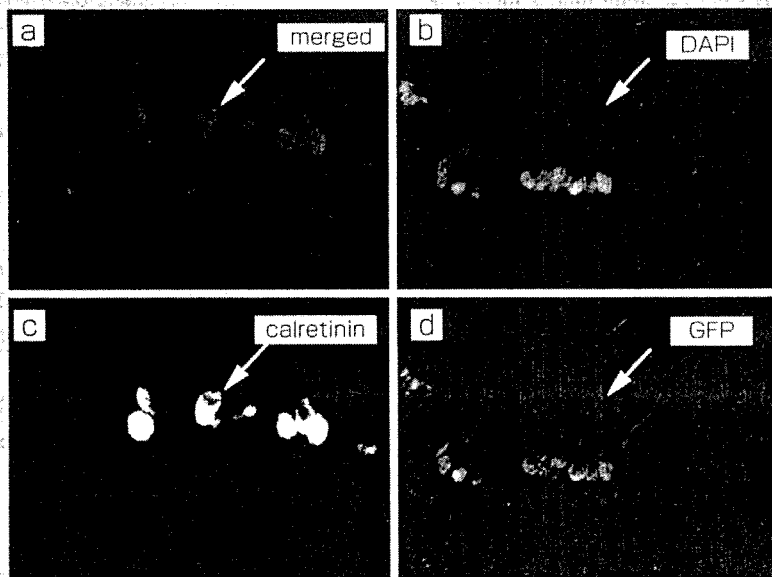


図4 内耳を構成する細胞の系譜

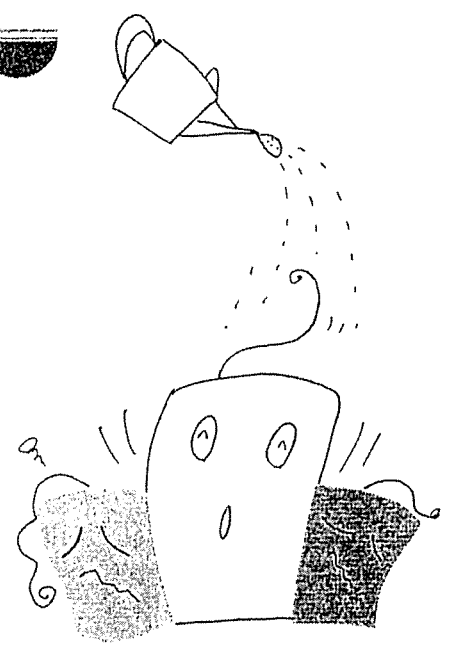


a : 障害内耳感覚上皮と共培養することによりカルレチニン陽性(赤)となった耳胞細胞(矢印)。b : DAPIによる核染色。c : カルレチニンに対する免疫染色。d : GFP遺伝子によりラベルされた耳胞細胞 (文献15より引用)

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

再生医学

細胞移植で機能回復をめざす



人工臓器、臓器移植の限界を克服

○細胞レベルで体を元どおりにする「再生医学」

○ 事故や病気などにより体の一部が失われたり、うまく機能しなくなったりすることがあります。障害の程度がわれわれ自身の治癒力を超えてしまえば、失われた体を元どおりに取り戻すことはできません。このような

場合には、失ってしまった体の機能を取り戻すためにさまざまな試みがなされています。すでに一部の臓器ではその機能を人工器官に置き換える、または臓器移植を行って失われた機能を再獲得する、などのことが行われています。たとえば人工透析や腎移植・肝移植・心臓移植などです。耳鼻咽喉科領域では高度難聴に対して人工内耳が用いられるようになってきました。しかしながら人工臓器で機能を完

全に修復することはいまのところ困難であり、臓器移植もドナーの不足や拒絶反応、倫理的問題などさまざまな問題をかかえ、いまだに決め手にかけるのが現状です。人工臓器や臓器移植の限界を超えるため、細胞レベルでいろいろな工夫を凝らし、障害を被ってしまった体を元どおりに、すなわち再生させることをめざしたのが「再生医学」です。現在では体の組織のすべてが再生医

学ターゲットになっているといっても過言ではありません。

内耳再生のターゲットは5つの細胞

○細胞移植は再生医学の切り札的存在

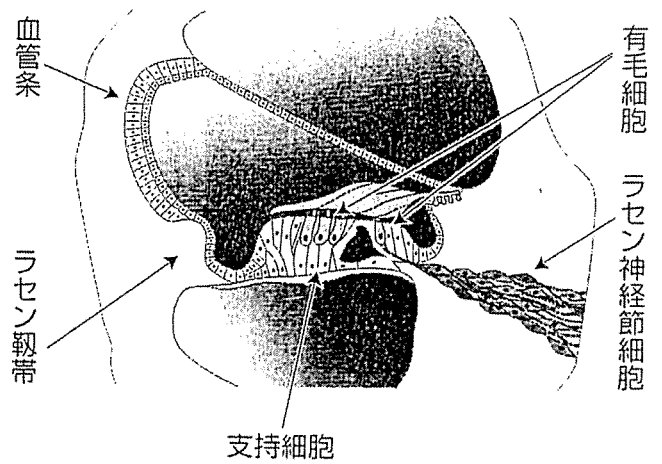
○ 内耳領域における再生医学のターゲットを図1に挙げます。障害組織にそのもとになる細胞（幹細胞・前駆細胞）が残っていれば、それらの細胞を増や

同教授
伊藤 壽一

小島 憲

京都大学大学院医学研究科
耳鼻咽喉科・頭頸部外科
特任助手（COE研究院）

図1 内耳再生医学の対象とされている細胞



してから分化を誘導することにより組織の再生が可能になります。しかし、聴覚を担う内耳有毛細胞は障害によりいったん脱落してしまうと生体では再生することはできないため、有毛細胞脱落による難聴はその後一生継続くと考えられてきました。

ところが、最近になり有毛細胞のもとになる細胞（幹細胞・前駆細胞）が成熟した哺乳類でも残っていることがわかり、薬

剤投与や遺伝子導入によりこの細胞の増殖を刺激してあらたな有毛細胞や神経節細胞をつくる可能性が示されました。不可能と考えられていた内耳の再生に大きく踏み出す一歩といえます。

しかし組織が高度に傷害された場合、ただでさえ少ない内在性の幹細胞を利用できるとは限りません。このようなケースでは外から細胞を入れる必要があります。すなわち「細胞移植」です。

臨床の現場でもっとも頻繁に行われている細胞移植は、白血病治療の際に行われる骨髄移植でしょう。今日では骨髄移植以外にも末梢血造血幹細胞移植や臍帯血移植なども行われています。骨髄移植の臨床応用は拒絶反応の制御技術の向上など医学的な問題だけでなくドナー確保のための移植バンクやネットワーク

の形成、法律の整備など社会的にもさまざまな進展をもたらしました。

最新の成果として挙げられるのは1型糖尿病患者への膵島（膵ランゲルハンス島）移植の臨床応用です。2004年4月に国内初の膵島移植が、2005年1月には世界初の生体膵島移植が京都大学医学部附属病院で行われました。膵島移植は、純化した膵島細胞を移植することで膵臓移植の際に起こる外分泌組織による合併症を回避できます。また、門脈から点滴を用いて肝臓内に移植するので大きな手術侵襲を伴いません。拒絶反応が膵島移植のほうが軽いなどの利点もあり、今後の普及が期待されています。

しかしながら臓器移植同様、細胞移植もドナー不足は深刻です。そこで注目されているのが旺盛な増殖能を持つ、いわゆる幹細胞です。

さまざまな細胞に分化する「幹細胞」

● 胚性幹細胞と組織幹細胞に大別され、旺盛な増殖能をもつ

幹細胞は、胚性幹細胞（ES細胞）と組織幹細胞に大別できます。ES細胞は、受精後5〜6日目の胚盤胞からとりだされる細胞で、非常に旺盛な増殖能を持つとともに体のすべての細胞に分化する能力（多能性）を持つといわれています。韓国とアメリカの研究グループは実際に疾患を持つ患者の核を移植して作製したクローン胚からES細胞を効率よく作ることに成功しました。

また、つい最近ですがアメリカのハーバード大学のグループは、成人の皮膚の細胞をES細胞と融合させてES細胞様の性質を持たせることにも成功しています。このようにして作られた細胞から目的の細胞を作り出

すことができれば移植に十分な数の細胞を得ることができると同時に、細胞を移植した後も拒絶反応が起こりにくいと予想されています。

一方の組織幹細胞は自己複製能を持ち、所属する組織のすべての種類の細胞に分化する能力(多分化能)を持つ細胞と定義されています。なかでも骨髄に存在する「間葉系幹細胞」はES細胞のように分化の可塑性が高いと考えられており、神経や筋肉、血管などさまざまな細胞になると報告されています。2005年夏には、心筋梗塞の患者さんに骨髄から得た細胞を移植することにより、良好な結果を得たとの発表が日本でもありました。慢性閉塞性血管障害や脊髄損傷に対して間葉系幹細胞移植を行う計画もなされています。そのメカニズムや有効性はまだ明らかではありませんが、患者さん本人の骨髄を使うことができれば、拒絶反応やドナー

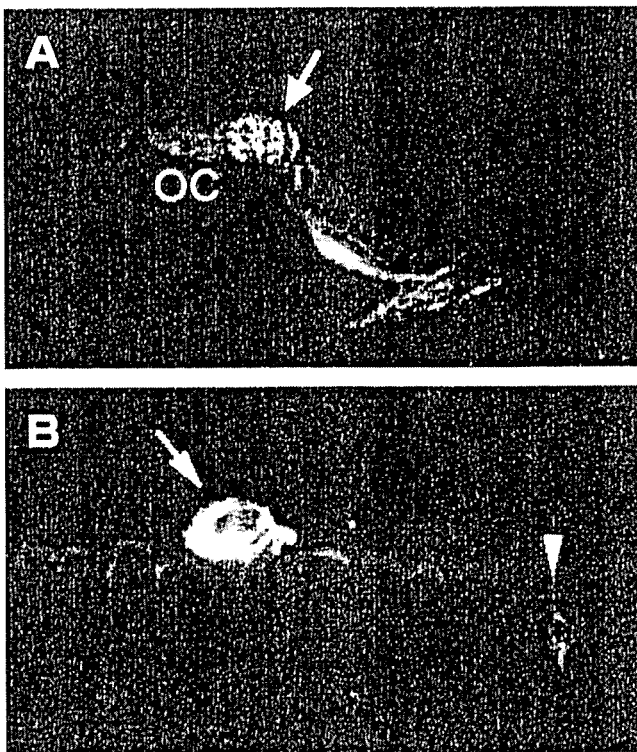
の問題だけでなく、臓器移植やES細胞移植が直面する倫理的な問題をも回避できると期待されています。

再生医学で感音難聴を治すための試み

有毛細胞の再生だけでは難聴の回復は困難。遺伝子導入や薬剤投与などの組み合わせが必要

前述のように、大人の内耳にも有毛細胞になることのできる幹細胞・前駆細胞が存在する可能性が示されています。しかし、障害が強い場合や慢性期になってからでは有毛細胞前駆細胞が残存しているとは考えにくく、このような場合は有毛細胞の前駆細胞を補う、すなわち幹細胞移植が必要になると考えています。これまで、神経幹細胞やES細胞、骨髄細胞を用いて

図2 新生仔ラット内耳に移植した神経幹細胞



移植神経幹細胞(矢印)はコルチ器内に生着し(A)、有毛細胞のマーカ-の1つであるファロイジン(矢印)を発現する細胞も存在した(B)。▼はファロイジン強陽性細胞(感覚上皮内に入っている)
(Acta Otolaryngol 121:140-142.より引用)

内耳細胞移植療法の可能性を示しました(図2)。しかしながら、有毛細胞のみ再生させても難聴を回復させることはできません。なぜなら、強い内耳障害の場合、信号の伝達に必須なラセン神経節や、有毛細胞が機能するための環境を整える血管系やラセン靱帯、支持細胞も傷害されるからです。ラセン神経節や靱帯に対してもES細胞や間葉系幹細胞を移植する試みが行

われています。現在のところ移植細胞の生着率は低く、また、内耳に安全に細胞を導入する方法も確立していません。しかし、近いうちこのような問題は解決されることでしょう。また、将来的には細胞移植だけでなく、遺伝子導入や薬剤投与などを組み合わせることにより、高度感音難聴が治療される時代がくると確信しています。

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 Dil (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'-6-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 Dil 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 1×10^5 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

1 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靭帯である。

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

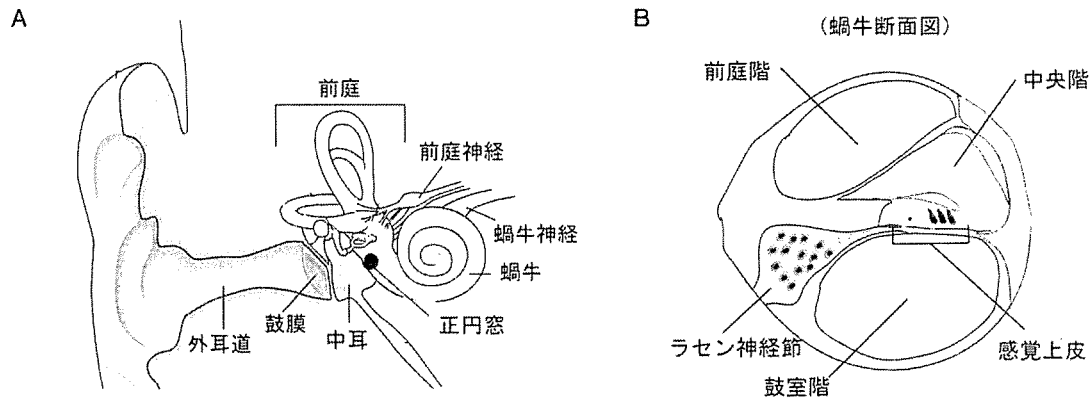


図1 内耳の局在と蝸牛断面図

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。