

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、同用量の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現するのかを、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

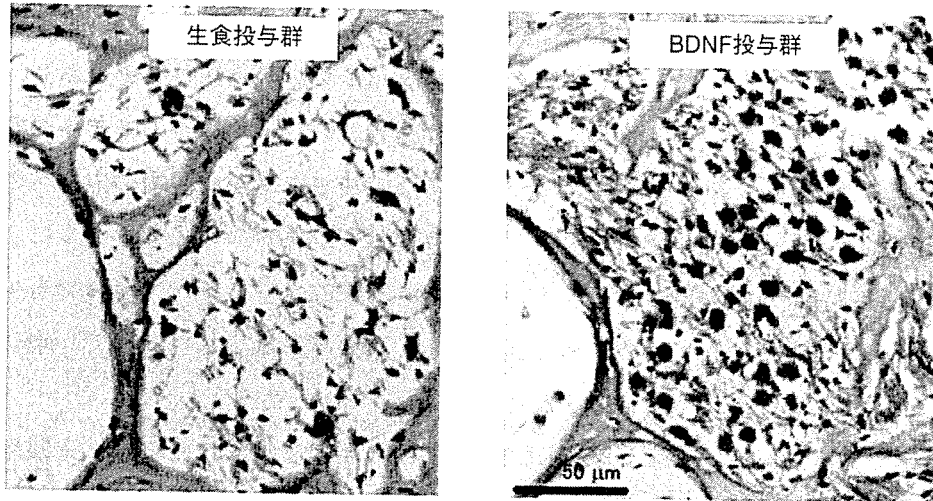


図3 ラセン神経節組織図 (HE染色)

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 クレスギ聴覚研究所

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を示されており，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)

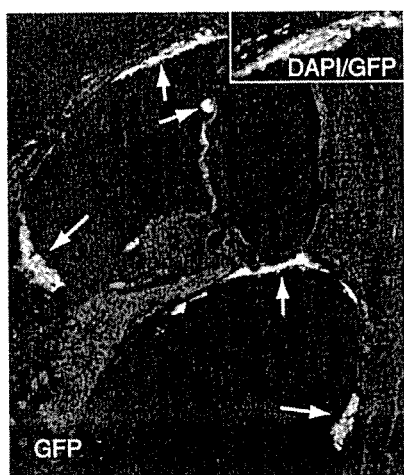


図3 障害蝸牛に移植された神経幹細胞
(巻頭写真17参照)

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）

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）

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が示唆されている^{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）¹⁴⁾。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1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場所である。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²³⁾。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

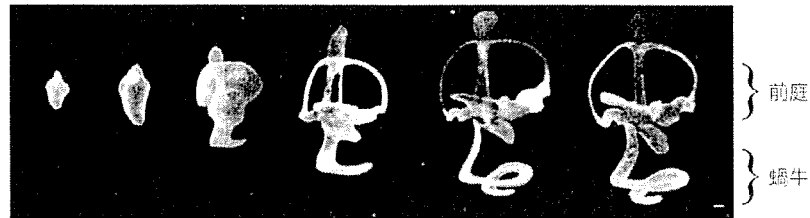
ヒト内耳は再生しない？

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多種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^{1,2)}。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)。

A 胎生 10.75日 11.5日 12日 13日 15日 17日



B a 蝸牛の構造 b. 蝸牛を構成する細胞

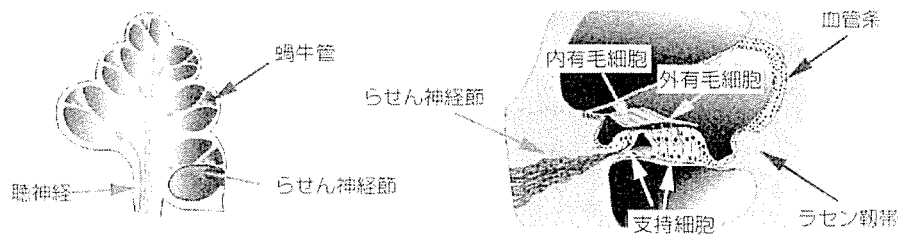


図1 内耳発達とその構造

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。血管条やラセン靭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¹⁰⁾。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¹¹⁾、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¹²⁾。鳥類を用いた有毛細胞再生実験¹³⁾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

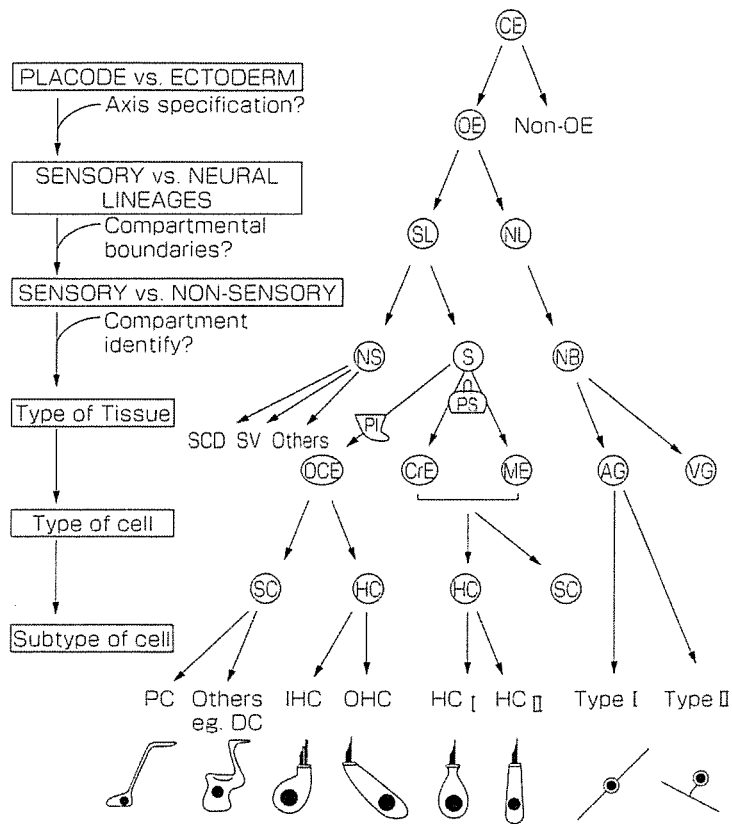


図2 内耳を構成する細胞の系譜

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²⁾。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—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、牛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—蛋白、すなわち有毛細胞マーカ— (Math1, myosin VIIa,

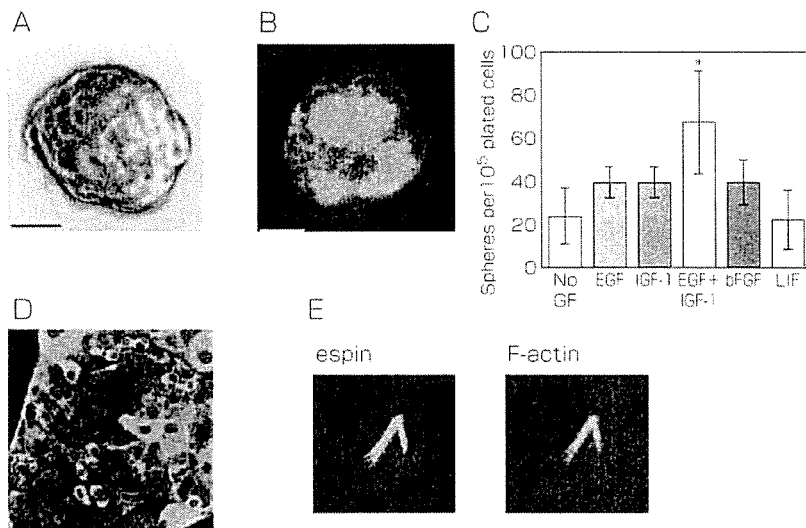


図3 成体内耳幹細胞(→巻頭 Color Gravure 参照)

- A: マウス前庭平衡斑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)、支持細胞マーカー(pan-cytokeratin)、神経細胞マーカー(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

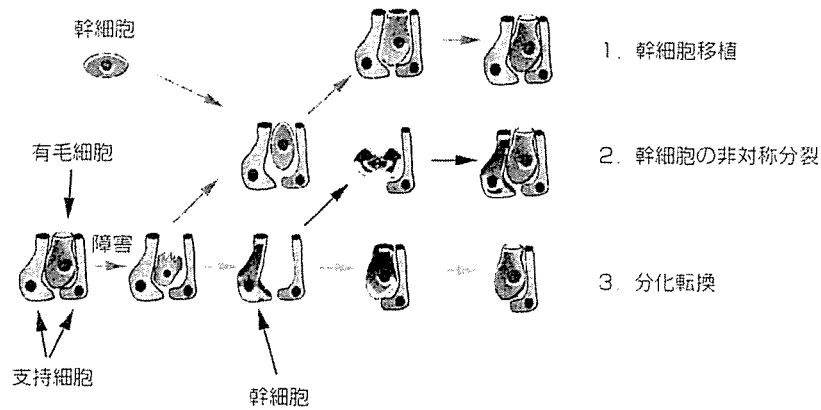


図4 内耳再生へ向けての戦略 (→巻頭Color Gravure 参照)

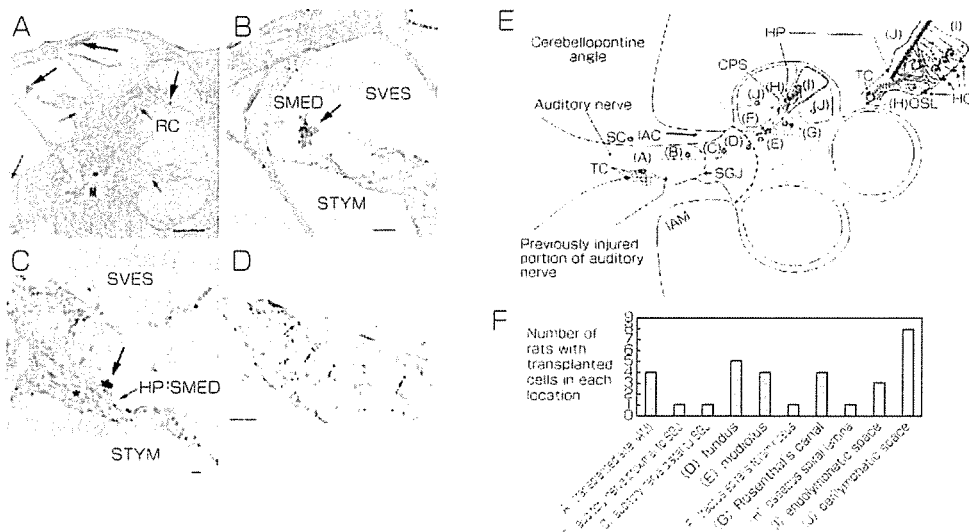


図5 内耳への細胞移植

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^{13, 14}。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) を作ることに成功したとの報告があった¹⁵。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することが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な問題も避けることができる。iPS細胞

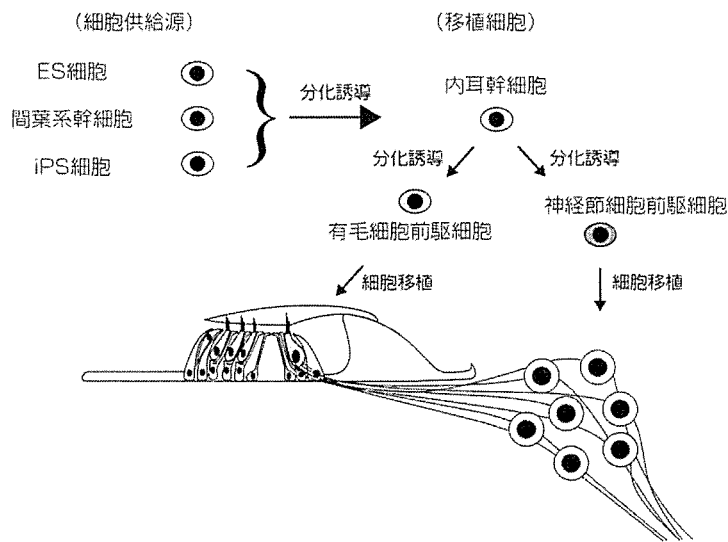


図6 幹細胞を用いた内耳再生への戦略

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¹⁹⁾。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^{19) 20)}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²¹⁾。

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²²⁾。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

4. 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

中川 隆之

Key words：老化，聴力，保護，再生

(日老医誌 2004；41：607—609)

老人性難聴の現状

人間の最も頻度の高い身体機能障害のひとつに聴覚障害があり，これは後天的，先天的ともにあてはまる事実である。高齢者の多くは，何らかの聴覚障害と関連する訴えを有する。音がクリアに聞こえない，耳鳴りがするなどの訴えに始まり，日常生活に困難なレベルまで難聴が進行することも少なくない。実際，本邦を含め先進国では，60歳以上人口の60%が感音難聴を有し，75歳以上になれば日常生活に困難をおぼえるレベルの難聴者が25%を占めるといわれている。老人性難聴は，最も頻度の高い感音難聴の要因という側面も持つ。今後の高齢化社会を考慮すれば，誰もが関係する疾患とも言える老人性難聴に対して豊富な対処方法があるのかといえば，現実には補聴器の装用に限定されているのが現状である。近年の進歩に伴い，補聴器によりえられる聴覚の質は向上している。しかし，老人性難聴に対する防御，治療法は全くないのが現状である。さらなる高齢化社会の到来を前に，老人性難聴の進行を予防する方法，あるいは高度感音難聴に陥った場合には，聴覚を再生する方法の開発が急務といえる。

老人性難聴の病態

老人性難聴に対する予防法，治療法を考えるにあたっては，老人性難聴の病態を解明することが不可欠となる。これまででも，老人性難聴の病態解明は重要な課題とされ，数多くの研究がなされてきた。代表的な研究として，Schuknechtによる一連のヒト側頭骨病理の解析が知られている¹⁾。彼は，その詳細な組織学的解析から，老人性難聴の病理組織像による分類を提起している。ひとつ

は，蝸牛コルチ器の有毛細胞の変性とするタイプであり，長く動物実験などから有毛細胞変性が感音難聴の主な病態と考えられてきた病態である。しかし，実際に有毛細胞変性が明らかな老人性難聴例は少なく，ラセン神経節の変性や血管条，ラセン靭帯を含む蝸牛側壁の変性がよく認められる所見であることを指摘している。最近の動物実験²⁾³⁾から，このSchuknechtのヒト側頭骨の観察を支持する所見がえられている。しかし，蝸牛の老化現象のメカニズムには未だ不明の点が多いのが現状である。

我々は，加齢による内耳機能低下と組織所見の関連性を調べる目的で，C57BL/6マウスの聴覚および平衡機能とそれぞれの末梢感覚器の組織像を検討した。結果，聴覚機能の低下と蝸牛の組織学的変性はよく相関するが，平衡機能においてはほとんど相関しないことが判明した。すなわち，加齢による聴覚機能低下には，末梢感覚器である蝸牛が大きな役割を占めると考えられる。一方，蝸牛の組織学的変性を部位別に検討すると，ラセン神経節における神経細胞密度減少および血管条の萎縮が聴力低下とよく相関することが示唆された。最近，ラセン靭帯の変性も加齢とともに進行することが報告されており⁴⁾，老化による蝸牛変性は単一の病態で説明できるものではないと考えられる。今後，蝸牛の加齢に伴う変性の分子生物学的な機構を明確にし，機能低下の鍵を握る部位を明確にする必要がある。

ヒト側頭骨病理の解析については，先述したSchuknechtの研究が広く知られているが，日本人側頭骨に関する定量的な解析の報告は乏しい。動物実験で認められる所見がヒトでも認められるか否かを耳疾患を有さない日本人側頭骨96耳を用いて解析した。ヒト側頭骨においては，当然のことながら単一種のマウスでの解析とは異なり，明らかな個体差を認めた。しかし，ラセン神経節細胞密度，血管条断面面積の減少と年齢との相関が認められた。つまり，ヒトでは，個々の症例に応じて，老化

T. Nakagawa：京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科

による蝸牛変性の程度、メカニズムを考える必要があるが、老化に伴う蝸牛変性の共通所見として、ラセン神経節および血管条の萎縮が存在するということができる。

老人性難聴予防へのストラテジー

老人性難聴に対する現状での確立された治療は、補聴器の装用のみであり、厳密な意味での治療法はない。加齢による難聴の進行は一般に緩やかであることを考慮すれば、老人性難聴治療方法として、予防方法の開発が重要な意義をもつと考えられる。これまでも蝸牛、特に有毛細胞、ラセン神経節細胞の変性、細胞死の防御について数多くの研究がなされており、様々な神経栄養因子⁵⁶⁾や抗酸化物質⁷⁸⁾の有効性が実験的に示されている。しかし、これらの研究成果が臨床応用に進んだ例は、今のところない。臨床応用の道を狭めている要因に内耳にいかにか有効に薬物を到達させるかという問題がある。内耳には、中枢神経系と同様の血液-内耳関門が存在し、全身投与された薬物が内耳に到達しにくいという特徴がある。また、投与された薬物が十分な効果を発揮するためには、必要な容量が必要な時間内耳に存在しなければならない。われわれは、この問題を解決すべく内耳薬物投与システムの開発を行った。

われわれの考案した内耳薬物投与システムは、京都大学再生医学研究所の田畑教授のグループが開発した生体吸収性徐放ゲル⁹⁾を応用したものである。投与方法は簡潔で、中耳正円窓膜状にゲルを留置するのみである。われわれは、内耳保護効果がすでに明らかにされている脳由来神経栄養因子 (BDNF) を投与薬物とし、この薬物投与システムの有効性を検証した。BDNF を浸漬したゲルを留置後、経時的に蝸牛外リンパ液中の BDNF 濃度を ELISA 法で測定したところ、投与 2 週後でも高濃度の BDNF を内耳リンパ液中に検出することができた。実際に薬物効果発現をラセン神経節の 2 次性変性モデルを用いて検討した。BDNF 投与を受けたモルモットでは、コントロールとした生食投与モデルに比して、組織学的に有意にラセン神経節細胞保護効果が認められ、さらに、機能的保護効果が電気刺激聴性脳幹反応により明らかにされた。以上の結果から、生体吸収性徐放ゲルを用いた薬物投与システムが内耳に対しても応用できることが示唆された。この内耳薬物投与システムは、老化による蝸牛障害の予防に用いることができる可能性があり、今後の研究発展が期待される。

聴覚機能再生へのストラテジー

加齢による聴力低下には大きな個人差があるが、身体

障害者に該当する高度聴覚障害者は本邦でも約 36 万人存在する。この中で老人性難聴進行例の占める割合は無視できるものではない。現在のところ、いずれの原因にせよ一旦喪失した聴力を回復させることは極めて困難である。そこで、われわれは新しい研究的アプローチとして、細胞移植による内耳再生を試みた。これまでに神経幹細胞による有毛細胞、ラセン神経節細胞再生の可能性¹⁰⁾¹¹⁾、骨髄由来間葉系細胞移植によるラセン神経節細胞再生の可能性¹²⁾について報告した。ここでは、胚性幹細胞 (以下 ES 細胞) 移植によるラセン神経節再生についての最近の知見を紹介する。

マウス ES 細胞を神経方向に分化誘導した後に回収し、あらかじめラセン神経節傷害を惹起しておいたモルモット蝸牛に移植した。4 週間後にラセン神経節機能を電気刺激聴性脳幹反応で評価したところ、シャムオベを施行したコントロールでは全く反応が認められなかったのに対して、一部の移植動物では反応が確認された。この反応が認められた動物では、多量の移植細胞が本来ラセン神経節細胞および蝸牛神経が存在する蝸牛軸に生着し、神経細胞に分化している像が観察された。これらの結果は、ES 細胞の蝸牛移植によりラセン神経節細胞を再生することが可能であることを示唆するものであり、まだまだ解決すべき問題は山積みであるが、細胞移植というストラテジーが内耳再生に応用可能であることを示すという意味で意義のある結果ととらえることができる。

今後の展望

第一に老化モデル動物を用いた研究により、分子生物学的レベルで有毛細胞のみならずラセン神経節、血管条、ラセン靭帯の加齢による変性のメカニズムを明らかにし、老人性難聴防御におけるターゲットが明確にする必要がある。次に、ヒトにおける個体差の要因、つまり加齢による蝸牛変性が強い症例と軽い症例の差異の要因を解析する必要がある。この要因に聴覚におけるアンチエイジングの鍵が隠されている可能性がある。そして、これらの基礎的研究成果を現実の臨床の場に供するためのトランスレーショナルな研究 (内耳薬物投与システムの臨床応用もここに含まれる) が、われわれの重要な責務であると考えられる。

参考文献

- 1) Schuknecht HF: Pathology of the ear. Cambridge, Harvard UP, 1974.
- 2) Keithley EM, Ryan AF, Woolf NK: Spiral ganglion cell

- density in young and old gerbils. *Hear Res* 1989; 38: 125—133.
- 3) Gates GA, Mills D, Nam BH, D'Agostino R, Rubel EW: Effects of age on the distortion product otoacoustic emission growth functions. *Hear Res* 2002; 163: 53—60.
 - 4) Hequembourg S, Liberman MC: Spiral ligament pathology: a major aspect of age-related cochlear degeneration in C57BL/6 mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 2001; 2: 118—129.
 - 5) Ylikoski J, Pirvola U, Virkkala J, Suvanto P, Liang XQ, Magal E, et al.: Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear Res* 1998; 124: 17—26.
 - 6) Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, Pyykko I, Olivius NP, Kaksonen R, et al.: Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1657—1660.
 - 7) Sha SH, Schacht J: Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation in vitro and ototoxicity in vivo: D-methionine is a potential protectant. *Hear Res* 2000; 142: 34—40.
 - 8) Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S: Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 2000; 21: 513—520.
 - 9) Tabata Y, Ikada Y: Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 31: 287—301.
 - 10) Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim TS, Endo T, Yamada S, et al.: Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 2003; 14: 1677—1681.
 - 11) Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Tateya I, Endo T, Kim TS, et al.: Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. *Acta Otolaryngol* 2004; Suppl 551: 65—68.
 - 12) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, et al.: Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 2004; 15: 1—4.

Abstract

Mechanisms of age-related hearing loss and strategies for protection and restoration of hearing

Takayuki Nakagawa

Hearing impairment is the most frequent disability in elderly individuals; however, we have limited options for treatment of age-associated hearing loss. To establish novel strategies for the treatment of age-associated hearing loss, it is crucial to elucidate the mechanisms of age-associated hearing loss. Studies on animal models and human temporal bones have indicated a close relationship between degeneration of the spiral ganglion neurons and stria vascularis and age-associated hearing loss. We have developed a drug delivery system using biodegradable gel for the inner ear to protect inner ears against aging. In addition, recent studies on cell therapy for the inner ear have suggested the efficacy of cell transplantation for restoration of hearing.

Key words: *Aging, Hearing loss, Protection, Regeneration*
(*Jpn J Geriat* 2004; 41: 607—609)

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

Mechanisms of Apoptosis Induced by Cisplatin in Marginal Cells in Mouse Stria Vascularis

Ji Eun Lee^{a,d} Takayuki Nakagawa^a Tomoko Kita^{a,b} Tae Soo Kim^a Fukuichiro Iguchi^a
Tsuyoshi Endo^a Atsushi Shiga^c Sang Heun Lee^d Juichi Ito^a

^aDepartment of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, ^bHorizontal Medical Research Organization, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, ^cDepartment of Otolaryngology, Aichi Medical University, Aichi, Japan; ^dDepartment of Otolaryngology, School of Medicine, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea

Key Words

Stria vascularis · Cisplatin · Lipid peroxidation · Peroxynitrite · Caspase · Nitric oxide

Abstract

Degeneration of the stria vascularis (SV) is amongst the major causes of cisplatin (CDDP)-induced hearing impairment. The pathways of apoptosis occurring in the SV due to CDDP were examined using a mouse experimental model. Temporal bones of adult C57BL/6 mice were collected on days 3, 7 and 14 after the local application of CDDP. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay and immunostaining for apoptosis-related proteins or reactive radical species were employed for analysis. Local application of CDDP caused apoptotic cell death of marginal cells 3 days after CDDP treatment. Immunohistochemical analyses demonstrated activation of caspase-3 and -9, but not -8, and redistribution of cytochrome c in affected marginal cells, indicating a caspase-dependent, mitochondrion-mediated apoptotic pathway in marginal cells. Temporary expression of hydroxynonenal, nitrotyrosine and inducible nitric oxide synthase in the SV was observed at the induction of apoptosis in marginal cells. CDDP toxicity generates reactive radical species in the SV, which causes mitochondrial membrane permeabilization leading to apoptosis of marginal cells.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

Introduction

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II; CDDP) is widely used as an effective and potent antineoplastic drug. It has been shown to be efficient against cancers of the head and neck; however, several side effects have been reported limiting its use. Ototoxicity remains a major problem and there is a high correlation between the degree of hearing loss and CDDP dosage [1, 2]. CDDP toxicity has been shown to cause degeneration in various regions of the inner ear. The stria vascularis (SV) is known as a primary site of CDDP ototoxicity. In the SV, it has been shown that marginal cells are especially vulnerable to CDDP-induced damage [3, 4]. In addition, it has been demonstrated that there is a high correlation between marginal cell damage and hearing loss [5]. Marginal cells play an important role in ion transport and maintenance of a high concentration of potassium in the perilymph of the cochlea [6]. Protection of marginal cells in the SV from CDDP toxicity is therefore critical for the preservation of hearing during CDDP treatment.

Protection of marginal cells of the SV from cell death due to CDDP requires an understanding of the mechanisms of cell death occurring in these cells during CDDP treatment. Cell death occurs by one of two methods, apoptosis or necrosis. Various ototoxic insults have been shown to induce apoptotic cell death in a variety of cell types in the inner ear [7–9]. Several pathways of apoptosis

KARGER

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

© 2004 S. Karger AG, Basel
0301–1569/04/0663–0111\$21.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/orl

Takayuki Nakagawa, MD, PhD
Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery
Graduate School of Medicine, Kyoto University
Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, 606-8507 Kyoto (Japan)
Tel. +81 75 751 3346, Fax +81 75 751 7225, E-Mail tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

have been described. In the death receptor-mediated pathway, activation of the receptor induces activation of caspase-8, leading to activation of caspase-3 [10]. Activated caspase-3 then causes a chain reaction resulting in cell degradation. In the mitochondrion-mediated pathway, death signals cause permeabilization of the mitochondrial membrane, resulting in release of cytochrome c from the mitochondria to the cytoplasm. Released cytochrome c activates caspase-9, followed by activation of caspase-3 [11]. Stress of the endoplasmic reticulum also induces apoptosis, involving activation of caspase-12 and calpain [12]. These pathways require activation of the caspase family for degradation of cells. On the other hand, the apoptosis-inducing factor (AIF) is a key molecule for the caspase-independent pathway of apoptosis [13].

Elucidation of the triggers for cell death is also necessary for establishment of protective strategies against CDDP toxicity. Recent studies have revealed that reactive radical species play a central role in the degeneration of the inner ear due to various ototoxic insults including CDDP [14]. Superoxide is readily generated in the inner ear under pathological conditions. Superoxide is not in itself highly toxic, but it can be metabolized to highly reactive radical species. Superoxide is readily metabolized to two highly toxic radicals, peroxynitrite and hydroxy radicals. Superoxide can also react with nitric oxide (NO) to yield the toxic oxidizing agent peroxynitrite. This causes nitration of tyrosine residues and leads to changes in protein structure and function [15]. Nitrotyrosine (NT) is a useful marker for the analysis of protein peroxidation by peroxynitrite [16]. In another pathway, superoxide transforms into hydrogen peroxide and, as a result of catalysis by iron, forms highly toxic hydroxy radicals. Hydroxy radicals initiate lipid peroxidation. One of the products associated with lipid peroxidation, 4-hydroxynonenal (HNE), is a useful marker for the analysis of lipid peroxidation [17].

The aim of the present study was to elucidate the mechanisms of cell death in the SV caused by CDDP toxicity and the relationship between induction of cell death and generation of reactive radical species. Firstly, we established a mouse model for the rapid induction of apoptosis in the SV. We directly applied CDDP into inner ears of mice to cause massive and acute degeneration of the SV. Using this model, the pathway of apoptosis occurring in the SV was analyzed. The production of NT and HNE in the SV of this animal model was then examined together with expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS).

Materials and Methods

Experimental Animals

C57BL/6 mice (6 weeks of age; $n = 27$) were purchased from Japan SLC Inc. (Hamamatsu, Japan). Animals had free access to water and to a regular mouse diet. All experimental protocols were approved by the Animal Research Committee, Graduate School of Medicine, Kyoto University. Animal care was under the supervision of the Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University.

Ototoxic Treatment and Tissue Preparation

Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg). A CDDP solution (10 μ l, 2.0 mg/ml in physiological saline; Sigma, St. Louis, Mo., USA) was directly applied into the left posterior semicircular canal. The procedures used are described in detail elsewhere [18]. Animals treated with physiological saline acted as controls ($n = 6$). On day 3 ($n = 7$), day 7 ($n = 7$) or day 14 ($n = 7$) after CDDP treatment, the animals were deeply anesthetized with a lethal dose of ketamine and xylazine. They were then perfused intracardially with physiological saline, followed by 4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4. Controls were sacrificed on day 3 ($n = 3$) or day 14 ($n = 3$). The temporal bones were excised and immersed in fixative at 4°C for 4 h. Specimens were prepared (10 μ m thick) using a cryostat after decalcification with 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid in PBS for 24 h at 4°C. Sections were then mounted on γ -aminopropyl triethoxysilane-coated glass slides. Mid-modiolus sections from each animal were used for histological analysis. An average of 4 sections from each animal was used for quantitative analysis.

Estimation of Stria Degeneration

Hematoxylin and eosin (HE) staining was used for estimation of morphological changes in the SV after CDDP treatment. In addition, quantitative analysis of the volume of the SV was performed using HE-stained sections. The area of the SV of the cochlear second turn was measured using NIH Image software. The dying cells in the SV were labeled by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method. An Apoptag fluorescein direct in situ apoptosis detection kit (Intergen Company, Purchase, N.Y., USA) was used. After treatment with 0.5% Triton-X 100 in PBS for 20 min at room temperature, TUNEL staining was performed according to the manufacturer's instructions. At the end of the staining procedure, specimens were incubated in PBS containing 2 μ g/ml 4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA) to demonstrate nuclear chromatin. The specimens were then viewed with a Nikon ECLIPSE E600 fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). TUNEL-positive cells in the SV were identified using fluorescence images of TUNEL and DAPI staining. The numbers of TUNEL-positive cells in the SV of the second turn of the cochlea were also counted in 4 sections from each animal. Cell numbers in the SV were determined by counting DAPI signals in the SV using bright-field images merged with images of DAPI fluorescence. The area of the SV, the number of TUNEL-positive cells in the SV and the total cell numbers in the SV were statistically analyzed using StatView software (StatView Version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). The data obtained from control animals on day 14 were used as the control in this analysis. Differences between experimental groups were examined for significance