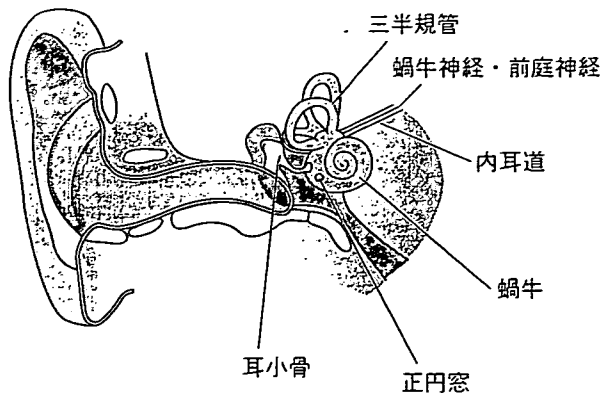


A 耳の解剖



B コルチ器

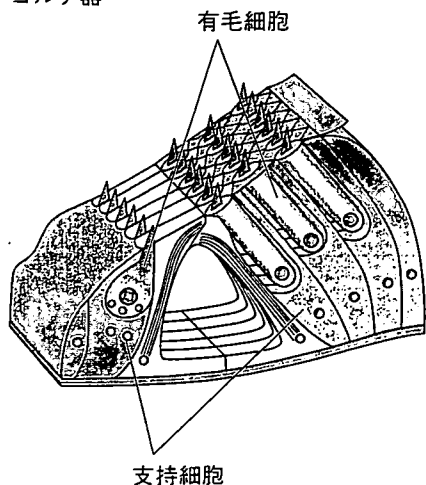


図1 内耳

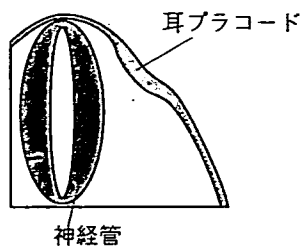
Kelley et al.: Nature Rev. Neurosci., 7: 837-849, 2006より改変

とし、陥凹して皮膚から切り離されて耳胞となり、複雑な形態形成を経て内耳を形成する(図2)。この間に起こる細胞レベルでの運命決定について明らかになってきたのはごく最近のことである。耳胞の壁の一部はNotch情報伝達系を介して感覚上皮として決定を受ける。その中の前駆細胞からはラセン神経節・前庭神経節の神経細胞が分化し、p27<sup>Kip1</sup>やpRbのような細胞増殖制御因子の発現によって細胞増殖が停止したあと<sup>4)</sup>は、再びNotchシグナルによって有毛細胞と支持細胞<sup>\*3</sup>が交互に存在するように分化する<sup>5)</sup>(図3)。

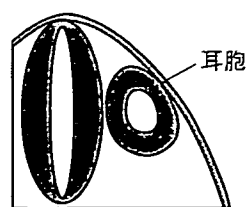
※2 ラセン神経節細胞

双極性の神経細胞で、末梢では有毛細胞とシナプスを形成して有毛細胞からの刺激を受容し、中枢では脳幹の蝸牛神経核に伝達する。

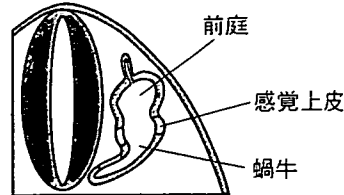
A



B



C



D

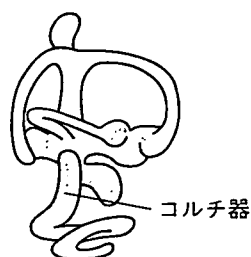


図2 内耳の発生

その後の聴毛の形成に関わる細胞骨格とモーターに関連する分子<sup>6)</sup>や、有毛細胞が整然と再配置されるときに平面内細胞極性を司る分子群が機能していること<sup>7)</sup>なども明らかになってきた。その後の成熟した内耳では細胞増殖は起こらない<sup>8)</sup>。

2) 内耳幹細胞は存在するか

成熟した内耳における細胞増殖がみられないことや、ラットの内耳有毛細胞障害後、細胞の修復機構によって少数の有毛細胞の再生がみられるが細胞増殖による細胞の補充は起こらない<sup>9)</sup>ことは、内耳に幹細胞が存在しないことを示唆すると考えられていた。しかし、最近になって、ラットの蝸牛由来の細胞を*in vitro*で培養して、細胞増殖を介して新生有毛細胞が生じたとする報告<sup>10)</sup>や、マウスの前庭感覚上皮から増殖してsphereを形成し、三胚葉に分化し得る多分化能をもつ細胞が得られたという報告<sup>11)</sup>がなされ、内耳にも幹細胞が存在すると考えられるようになってきた。しかし、内耳由来の幹細胞の分離が生後直後から週を重ねるごとに急激に困難になる<sup>12)</sup>ことから、組織幹細胞としての内耳幹細胞は生後急激に消失すると考えられる。発生段階の耳胞由来の幹細胞の分離も試みら

※3 支持細胞

有毛細胞の周囲に存在する細胞で、有毛細胞と共通の前駆細胞から発生する。

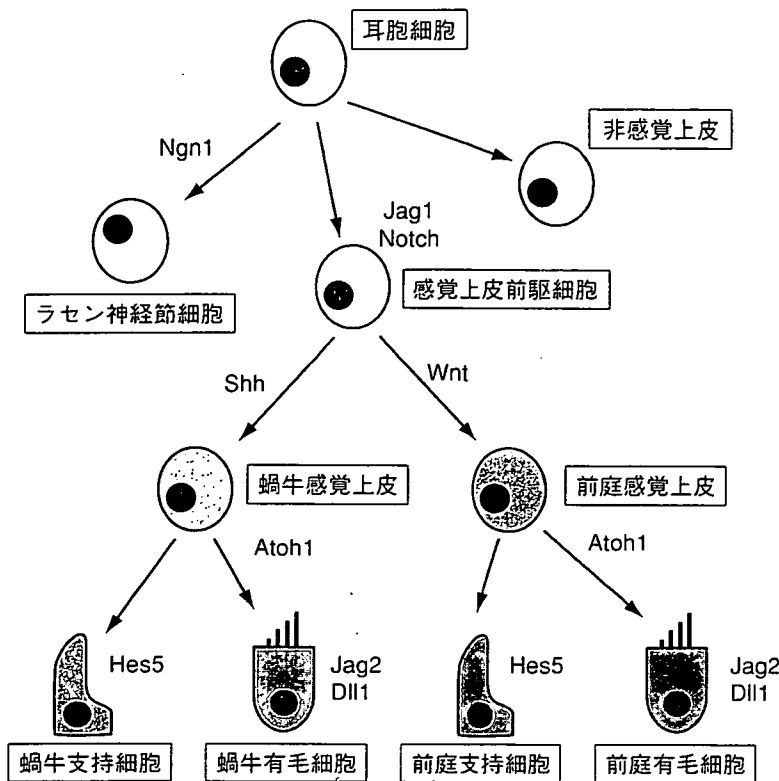


図3 内耳細胞の運命決定  
Kelley et al. : Nature Rev. Neurosci.  
7 : 837-849, 2006 より改変

れている。齧歯類の耳胞由来の幹細胞分離の試みのほか<sup>13) 14)</sup>、ヒト胎児蝸牛からも未分化な感覚上皮に相当する細胞が得られ、ここから有毛細胞を分化させることができる<sup>15)</sup>。これらが上述した内耳細胞の運命決定のどの段階に相当するかははっきりしていない。NestinやMusashilを用いた組織学的な検討では耳における幹細胞の位置を指摘し得ていないが、有毛細胞と支持細胞の前駆細胞の存在や、p27<sup>Kip1</sup>・Prox1など、前駆細胞と支持細胞の共通のマーカーが多数あることなどから、内耳幹細胞は支持細胞の中にあると考えられている<sup>16)</sup>。

## 2 有毛細胞の幹細胞治療

内耳障害で最も象徴的に傷害される細胞は有毛細胞であり、これを標的とした新しい治療が模索されている。その1つが、幹細胞から有毛細胞を作製して移植するというものである。

### 1) 幹細胞から内耳有毛細胞の分化誘導は可能か？

さまざまな幹細胞を用いて、内耳有毛細胞を作製することが試みられてきた。Liら<sup>11)</sup>は、マウスES細胞から胚様体を形成し、EGF, bFGF, IGF-1存在下に付着細胞を選択して分化させることによって、Myo VIIaやParvalbuminなどの有毛細胞のマーカーを発現し、

さらに発生中のニワトリの耳胞に移植すると耳胞に取り込まれて聴毛を有するまでに分化したとしている。ほかにも、ラットの神経幹細胞を有毛細胞に分化誘導する試み<sup>17)</sup>やヒトES細胞から分化させる方法<sup>18)</sup>なども報告されている。これらの報告は、有毛細胞のような高度に分化した細胞でも原理的には幹細胞から分化誘導することが可能であることを示している。しかし、細胞移植の材料として用いるほど多量に、安定して得られるというほどの制御を得られているわけではない。また、誘導された有毛細胞が機能することを確認するためには、聴毛の動きに対する膜の脱分極や細胞内カルシウム濃度の上昇がみたいところであるが、そこまで成熟した有毛細胞が得られているわけではない。さらに、有毛細胞には、蝸牛の内毛細胞・外毛細胞、前庭のI型・II型の4種類があり、それぞれ役割が異なるものであるが、そもそもこれらの発生学上の差違についての研究はほとんど進んでおらず、上記の方法で誘導された有毛細胞がどれに相当するかもわかっていない。有毛細胞の分化発生機構について、前節に述べたような詳細が明らかになってきたのはむしろ上記の報告以降であり、今後、これらの新しい知識を用いることで、有毛細胞の*in vitro*での誘導という面での新たな展開がある可能性がある。

## 2) 有毛細胞の移植治療は可能か

内耳有毛細胞が得られたとして、それを移植することによる難聴の治療はできるのであろうか。内耳有毛細胞は、細胞自体が高度に分化した機能細胞であるだけでなく、整然と配列することも聴覚に必須であり、そのような複雑な構築をもった配列を移植によって再現することは、細胞を作製することよりもさらに困難が予想される。これまで、内耳に幹細胞を導入するさまざまな方法が報告されており<sup>19)~22)</sup>、内耳のさまざまな部分に細胞の導入が可能であることは示されているが、多数の有毛細胞が望ましい配列で感覚上皮に挿入されるというところまで制御できるわけではない。あるいは、有毛細胞として移植するよりも、支持細胞を作製・移植して有毛細胞への分化転換を図るとか、これらの前駆細胞を移植して感覚上皮を形成させるというのも、今後試すべき方法であろう。障害を与えた内耳に有毛細胞発生のキーになる遺伝子である *Atoh1* をウイルスベクターを用いて導入することで整然とした配列をもった有毛細胞が発生したという報告もあり<sup>23)</sup>、有毛細胞発生機構あるいは分化誘導から得られた情報をもとに、遺伝子導入や阻害剤の導入を行って有毛細胞の自発的再生を促すという考え方は、細胞移植と並行して、あるいは組み合わせる考えていかなければならないと考えている。

## 3) ラセン神経節細胞の幹細胞治療

聴覚の一次感覚ニューロンであるラセン神経節細胞は、内耳障害において第一義的に傷害されるほか、有毛細胞の障害に引き続いて二次的に失われることも知られている。現時点で高度感音難聴に対する唯一の治療方法である人工内耳は、蝸牛に電極を挿入し、外部のマイクで拾った音に応じて蝸牛内電極でラセン神経節細胞を直接刺激することで聴覚を得るといふ人工臓器である(図4)。保険適応にもなっており、すでに日常の診療で用いられているが、ラセン神経節の障害が高度になると人工内耳の効果が低下すると考えられており、ラセン神経節が再生できるならその意義は大きい。

### 1) 幹細胞移植によるラセン神経節細胞の再生

神経細胞は幹細胞から比較的容易に作製することができる細胞であるが、ラセン神経節細胞に対する移植には、ES細胞・神経幹細胞・骨髄由来間葉系細胞な

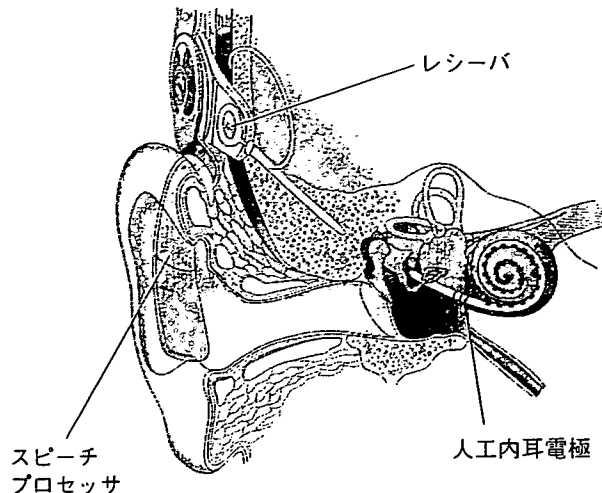


図4 人工内耳  
<http://corporate.cochlear.com/Corp/Press/186.asp>  
 より改変

どに由来する未分化な神経細胞や内耳由来の不死化神経細胞株<sup>24)</sup>などさまざまな細胞が用いられている。実験動物でラセン神経節に移植する方法として、3つの方法が主に用いられている。①蝸牛壁あるいは半規管から内腔(外リンパ腔)に注入する方法<sup>19)</sup>、②蝸牛壁からラセン神経節を容れているローゼンタール管<sup>\*4</sup>を直接穿刺して注入する方法<sup>25) 26)</sup>、③内耳道から聴神経に沿って逆行性に注入する方法<sup>27)</sup>である(図5)。①は手技的に容易であり、汎用されていたが、最近では②のように目的とする場所に直接注入するより確実な方法が好まれる。②は蝸牛の破壊を伴うのに対し、③は蝸牛を温存できるが、内耳道からローゼンタール管へ到達する細胞数は限られている。

### 2) 移植幹細胞は内耳で機能するか

われわれはさまざまな試みを行ってきた中で、齧歯類と霊長類(サル)において、ES細胞由来の未熟な神経細胞を内耳障害を与えたラセン神経節に移植することで、いったん高度に悪化した電気聴性脳幹反応(eABR)<sup>\*5</sup>が改善するというデータを得ている(投稿準備中)。いかにしてこのような機能回復が起こるのであるか。ラセン神経節細胞はグルタミン酸作動性の双極性ニューロンである。われわれを含めて、グ

\*4 ローゼンタール管

蝸牛軸のうち最もコルチ器に近い部分で、ラセン神経節の細胞体が存在する。

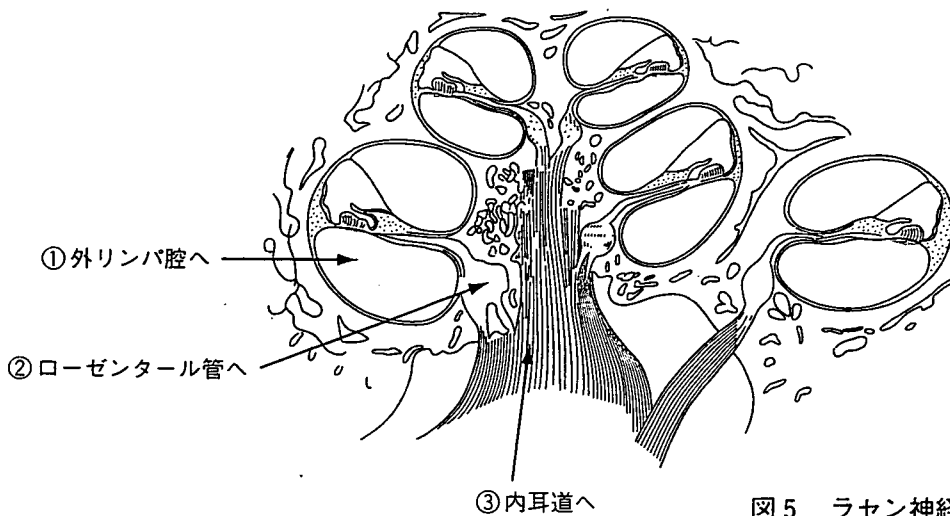


図5 ラセン神経節への移植経路

ルタミン酸作動性ニューロンを特異的に誘導した幹細胞由来神経を移植したという報告はないが、少なくともES細胞由来の神経細胞にグルタミン酸受容体が存在することは知られている<sup>28)</sup>。また、ローゼンタール管に移植された神経細胞が有毛細胞基底部へ、あるいは内耳道を中枢の方向へと線維を伸張すること<sup>25)</sup>、ES細胞由来の神経細胞が培養コルチ器の有毛細胞とシナプスを形成することが示されている<sup>29) 30)</sup>。以上から考えると、移植神経細胞が有毛細胞と脳幹の蝸牛神経核をつなぐ神経回路を再構成し、機能しているという可能性がある。

もう1つの可能性としては、移植した細胞が分泌する神経栄養因子が障害を受けたラセン神経節細胞を保護する<sup>31)</sup>ということがあり得る。NT-3やBDNFなどの神経栄養因子が障害を受けたラセン神経節細胞の生存を助けることはよく知られており<sup>32)</sup>、移植した細胞がこれらを分泌することで、残存したラセン神経節細胞を生存させるというものである。この効果のみを目的とするならば、移植する細胞は幹細胞である必要はなく、BDNFを発現する線維細胞を蝸牛に移植するという cell-gene therapy という方法がすでに報告されている<sup>33)</sup>。

どちらにしても、幹細胞移植による機能回復がみられるという点での意義は大きい。このラセン神経節の再生を人工内耳と組み合わせることを想定すれば、すでに人工内耳挿入術は通常行われている手術であり、細胞移植はその延長で行える。その結果として相乗的な機能回復が期待できるので、ヒトにおける臨床応用に向けての現実性は高いと考えられる。

## おわりに

内耳障害に対する幹細胞を中心とした細胞移植治療に関連するいくつかのトピックスについて説明した。有毛細胞に対する細胞移植は、移植細胞の準備という点でも移植による組織の再構築という点でも現時点ではまだ模索中であるが、発生学からの情報が急速に集まりつつあるので今後の展開が望まれる。ラセン神経節に対する細胞移植は臨床応用の実現により近い段階にある。現在はES細胞を用いて実験動物における機能回復を得た段階であるが、今後は脂肪幹細胞やiPS細胞などの自己由来幹細胞へと移行していくことになるであろう。

有毛細胞、ラセン神経節・前庭神経節と並んで内耳障害の原因と考えられている部位にラセン靭帯・血管条がある。薬物や遺伝子異常によるこれらの部位の障害が知られているが、幹細胞治療をここに応用しようという試みも最近報告された<sup>34)</sup>。内耳のような複雑な構築をもった組織を幹細胞を用いて治療することは決して簡単ではないが、今後も再生医療による内耳障害治療の実現に向けてさまざまなアプローチで取り組んでいく必要がある。

### ※5 電気聴性脳幹反応 (eABR)

聴性脳幹反応 (ABR) は音刺激に対する聴神経・脳幹聴覚路の神経活動電位を記録したものであるが、eABRは音刺激の代わりに蝸牛に挿入した電極からの電気刺激に対する活動電位を記録したもの。有毛細胞の機能に依存せずに聴神経よりも中枢の神経活動を評価できる。

本稿執筆にあたり，ご指導，ご監修いただいた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教授に深謝いたします。

## 文献

- 1) Rubel, E. W. et al. : Science, 267 : 701-707, 1995
- 2) Chardin, S. & Romand, R. : Science, 267 : 707-711, 1995
- 3) Tucci, D. L. & Rubel, E. W. : Otolaryngol. Head Neck Surg., 103 : 443-450, 1990
- 4) Rocha-Sanchez, S. M. & Beisel, K. W. : Int. J. Dev. Biol., 51 : 585-595, 2007
- 5) Kelly, M. & Chen, P. : Int. J. Dev. Biol., 51 : 535-547, 2007
- 6) El-Amraoui, A. & Petit, C. : J. Cell Sci., 118 : 4593-4603, 2005
- 7) Montcouquiol, M. E. et al. : J. Neurosci., 26 : 5265-5275, 2006
- 8) Oesterle, E. C. et al. : J. Comp. Neurol., 463 : 177-195, 2003
- 9) Zheng, J. L. et al. : J. Neurosci., 19 : 2161-2170, 1999
- 10) Malgrange, B. et al. : Mech. Dev., 112 : 79-88, 2002
- 11) Li, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 13495-13500, 2003
- 12) Oshima, K. et al. : J. Assoc. Res. Otolaryngol., 8 : 18-31, 2007
- 13) Kojima, K. et al. : Acta Otolaryngol., Supplementum : 53-55, 2004
- 14) Zhai, S. et al. : J. Neurobiol., 65 : 282-293, 2005
- 15) Chen, W. et al. : Hear. Res., 233 : 23-29, 2007
- 16) Warchol, M. E. : Hear. Res., 227 : 11-18, 2007
- 17) Kojima, K. et al. : Acta Otolaryngol., Supplementum : 26-30, 2004
- 18) Rivolta, M. N. et al. : Methods Mol. Biol., 330 : 71-92, 2006
- 19) Tateya, I. et al. : Neuroreport, 14 : 1677-1681, 2003
- 20) Naito, Y. et al. : Neuroreport, 15 : 1-4, 2004
- 21) Sharif, S. et al. : Neuroreport, 18 : 351-354, 2007
- 22) Parker, M. A. et al. : Hear. Res., 232 : 29-43, 2007
- 23) Izumikawa, M. et al. : Nature Med., 11 : 271-276, 2005
- 24) Sekiya, T. et al. : Eur. J. Neurosci., 25 : 2307-2318, 2007
- 25) Okano, T. et al. : Neuroreport, 16 : 1919-1922, 2005
- 26) Tamura, T. et al. : Acta Otolaryngol., Supplementum : 65-68, 2004
- 27) Sekiya, T. et al. : Neurosurgery, 60 : 417-433, 2007
- 28) Raye, W. S. et al. : Eur. J. Neurosci., 25 : 1961-1970, 2007
- 29) Matsumoto, M. et al. : Neuroreport, 16 : 787-790, 2005
- 30) Kim, T. S. et al. : Brain Res., 1057 : 127-133, 2005
- 31) Iguchi, F. et al. : Neuroreport, 14 : 77-80, 2003
- 32) Fritzsich, B. et al. : Cell Tissue Res., 295 : 369-382, 1999
- 33) Okano, T. et al. : Mol. Ther., 14 : 866-871, 2006
- 34) Kamiya, K. et al. : Am. J. Pathol., 171 : 214-226, 2007

### <著者プロフィール>

坂本達則：1995年京都大学医学部卒業。2004年京都大学大学院医学研究科修了後，理化学研究所発生・再生科学総合研究センターリサーチアソシエイト，'06年より京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科助教。ES細胞の分化誘導と内耳発生についての研究を行い，医学博士取得。現在，再生医学を用いた内耳障害の治療に向けての研究を行っている。

**DDS を用いた感覚器領域における  
再生医療***Regenerative medicine using DDS in sensory organs***KEYWORDS**ドラッグデリバリーシステム  
感音難聴  
視力障害

坂本 達則 中川 隆之 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**

Drug delivery to the cochlea is hampered by blood-inner ear barrier together with its dense bony capsule. The round window is a possible access to deliver drugs effectively into the cochlea. Intratympanic injections and osmotic mini-pump has been utilized to get access to the round window membrane (RWM). Gelatin hydrogel immersed with brain derived-neurotrophic factor (BDNF) or IGF1 is successfully applied to the RWM to protect spiral ganglion neurons or cochlear hair cells. PLGA nano-particles are shown to penetrate round window membrane, and are expected to provide sustained-release in the cochlea. Drug delivery to the retina is also a challenge due to the existence of blood-retina barrier. Photo dynamic therapy and intraocular implants are clinically utilized methods to overcome this difficulty. Iontophoresis using drug immersed hydrogel as a contact electrode effectively brings drugs into vitreous. PLGA nano-particles with pigment epithelium-delivered factor protected the retina from ischemic injury. PLGA nano-particles may also be used as vehicles to transfect cells with plasmid DNA. Pegaptanib, an RNA aptamer which inhibit vascular endothelium-delivered growth factor, is used for ocular vascular disease. PLGA nano-particles will also be used for better sustained-release of pegaptanib.

**はじめに**

耳や眼は外界と接した臓器であり、アクセスは一見容易に思えるが、全身投与でも局所投与でも薬剤がターゲットとなる細胞に到達するまでにはさまざまな阻害要因があり、効率的な薬物投与は決して容易ではないため、これまでも Drug Delivery System (DDS) 的な工夫がなされてきた。本稿では、この領域で使われている DDS を紹介し、その再生医療としての応用について述べる。

**感音難聴に対する DDS**

感音難聴は非常に頻度の高い身体障害で、その原因としては、音響外傷、耳毒性薬剤、遺伝子異常、老化、メニエール病を含む内リンパ水腫関連の疾患などが挙げられるが、多くは蝸牛の障害が難聴を引き起こしている。空気

Sakamoto, Tatsunori / Nakagawa, Takayuki / Ito, Juichi

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

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

の疎密波として鼓膜に到達した音は、3つの耳小骨を介して蝸牛に伝えられ、蝸牛内では感覚上皮が振動する。感覚上皮に存在する感覚細胞(有毛細胞)では、振動が神経伝達物質の放出を引き起こし、一次感覚ニューロンであるらせん神経節細胞を興奮させ、中枢へと伝達される(図1)。多くの感音難聴ではこの有毛細胞やらせん神経が傷害されているため、治療の際には蝸牛がターゲットとなる。感音難聴に対して臨床的に実際に行われている治療はステロイドやビタミン剤、循環改善薬などの全身投与(経口、または経静脈)であるが、効果のある症例は限られている。感音難聴が治りにくい第一の理由は、いったん傷害された有毛細胞やらせん神経節細胞が再生しないことがまず挙げられるが、もう一つの原因が蝸牛への薬剤到達の難しさであ

る。蝸牛を含めた内耳は非常に密な骨に囲まれており、血流も限られていること<sup>1)</sup>、さらに、「血液-脳関門」と同様の「血液-内耳関門」<sup>2)</sup>が存在することが蝸牛への薬物到達を難しくしている。ただ、蝸牛には正円窓という小さな開窓部があって、薄い正円窓膜が蝸牛を満たす外リンパ液をシールしているため、薬物投与のルートとしては可能性がある。ただし、膜を損傷して外リンパ瘻を起こすと難聴やめまいを引き起こし、またもう1枚の偽性膜が存在するために確実に正円窓膜上に投与できない例も多いといわれており、取り扱いに注意を要する。鼓膜を穿刺してあるいは鼓膜穿孔があればそこから薬液を鼓室内に充填させる方法(鼓室内投与法)は、簡便であるが、薬物は耳管を通じて鼻腔へ容易に排出されるため、蝸牛への到達の程度も決

して高くはなく、その効果を持続させることも難しい<sup>3)</sup>。マイクロカテーテルを正円窓膜近傍に留置する方法も報告されていて、より確実に正円窓に向けて薬物を持続投与できる。突発性難聴に対するステロイド投与方法として臨床的に有効であることも示されているが<sup>4)</sup>、マイクロカテーテル留置には中耳手術と同程度の侵襲が必要であり、普及するには至っていない。

## ハイドロゲル

ハイドロゲルとは、ゼラチンやコラーゲン、ヒアルロン酸、アルギン酸などの親水性高分子化合物を架橋してできるゼリー状物質の総称である。特に、カチオン化、あるいはアニオン化したゼラチンを用いたハイドロゲル(ゼラチンハイドロゲル)は、静電的に薬物と結合し、生体内で加水分解されるに従って薬物を徐放することが知られている。結合が静電的であるため薬物を修飾する必要がなく、その架橋の程度を変えることで分解速度を制御できるので、DDS基材としては使いやすい。

Endoら<sup>5)</sup>は、脳由来神経栄養因子(BDNF)を浸潤させたハイドロゲルをモルモットの正円窓膜上に留置して、蝸牛におけるその効果を検証した。外リンパ液中のBDNF濃度を調べると、1週間以上にわたってBDNFは徐放されており、また、らせん神経節細胞に対する保護効果が組織学的、機能的に確認された。また、Iwaiら<sup>6)</sup>は

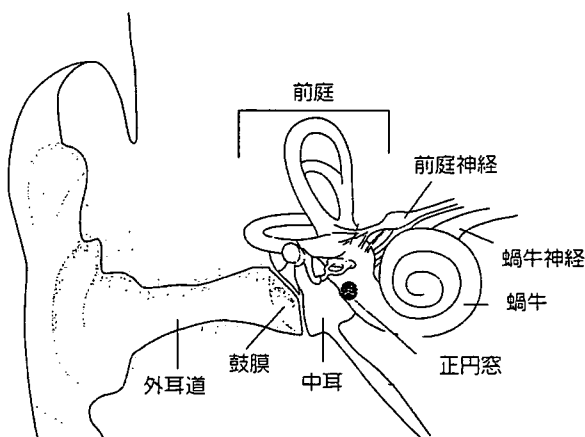


図1 外耳・中耳・内耳

IGF1 を含ませたゼラチンハイドロゲルを正円窓膜上に留置して、音響外傷による感音難聴に対する予防効果を検討した。その結果、機能的には難聴の防止効果が、組織学的には蝸牛有毛細胞の細胞死を防御する効果があることを確認した。現在我々はゼラチンハイドロゲルを用いたIGF1投与による急性高度難聴治療の臨床応用を準備中である。

### 生体適合性プラスチックによるナノパーティクル

PLGA (copoly lactic acid/glycolic acid) は、手術用吸収糸や創傷被覆膜として医療で広く用いられている生体適合性高分子である。材料である乳酸とグリコール酸の比率を変えることで分解を遅延することができ、生体内で加水分解されたあとの単量体は無害である。最近の微粒化技術の進歩によって、幅広い薬剤をPLGAナノパーティクル化できるようになり、新しいDDS基材として注目されている。

Tamuraら<sup>2)</sup>は、PLGAナノパーティクルが正円窓膜を超えて蝸牛まで到達できるかどうかを調べた。ローダミン含有PLGAナノパーティクルを蝸牛の正円窓膜上に留置して24時間後の蝸牛内の分布を組織学的に調べると、ローダミン含有PLGAナノパーティクルは蝸牛の正円窓に近い基底回転から頂回転までの広い範囲にわたって存在しており、PLGAナノパーティクルは正円窓膜を通過して、蝸牛の外リンパ液中を拡散することがわかっ

た。ハイドロゲルでは薬物はいったん徐放されてから拡散してターゲットへと輸送されていくが、ナノパーティクルの場合はパーティクルのままターゲットに輸送され、その場で徐放するので、薬物の安定性やターゲティング性能などの点で有利である。突発性難聴に用いられているステロイドやメニエール病の治療に用いられるアミノ配当体、さらに前述のBDNFやIGF1などをPLGAナノパーティクル化して用いれば、全身的な副作用などを回避しながら、蝸牛のみに高濃度かつ長期間、薬物を維持することができるので、今後の有効性の検証・臨床応用が待たれる。

### 視力障害に対する DDS

重篤な視力障害の原因として頻度の高いものは、糖尿病網膜症、緑内障、

加齢黄斑変性症、網膜色素変性症などがあげられるが、その主な障害部位は網膜・視神経である(図2)。網膜において幹細胞の存在が明らかになっているが、それが傷害された網膜を再生させるという報告はまだまだなく、細胞障害を受けると修復されることは困難であるということの意味する。眼球は強膜、結膜による強固なバリアーや涙によるクリアランスのほかに、「血液-網膜関門」<sup>3)</sup>が存在するため、点眼や全身投与を行っても、眼球後方への薬物投与の効率は低い。

滲出性加齢黄斑変性症は、脈絡膜に新生血管が生じ、出血、網膜剥離、浮腫などが生じ、病変が中心窩に及ぶと重大な視力低下をきたす疾患である。これに対して、光線力学的療法(photo dynamic therapy : PDT)が行われている。PDTは、新生血管集積性の光反応薬剤を全身投与した後、病

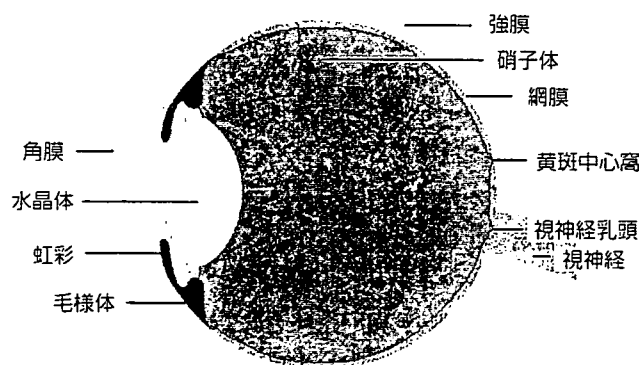


図2 眼球断面図



変部分である網膜の脈絡膜に弱いレーザーを照射することで局所の血管を閉塞させるという、ターゲティングDDSである。

また、日本国内では未承認であるが、ステロイド徐放インプラント (Retisert®: フルオシノロンをペレット状にしてポリビニルアルコールとシリコンで被覆して徐放化)<sup>11)</sup> や抗ウイルス薬徐放インプラント (Viterasert®: ガンシクロビルペレットをポリビニルアルコールとエチレン酢酸ビニル共重合体で被覆して徐放化)<sup>12)</sup> といった、眼球内に埋め込む形の徐放剤が実用化されている。

### ハイドロゲル, PLGA ナノパーティクルによる徐放

ポリヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) は、コンタクトレンズの材料として1960年代から用いられている高分子素材である。Eljarrat-Binstockら<sup>13)</sup> はゲンタマイシンで膨潤させたHEMAハイドロゲルを角膜表面に、あるいはHEMAにエチレングリコールジメタクリレート (EGDMA) を組み合わせたハイドロゲルを強膜面にあて、1分程度通電することで房水、あるいは硝子体に効率的にゲンタマイシンを輸送できることを示した。このようなイオントフォーシスと呼ばれる方法は、耳鼻咽喉科臨床的には局所麻酔薬を鼓膜に効率よく到達させるために古くから頻用されているが、眼球後方の薬物到達が困難な領域へのDDSとしても、簡便で有効

な方法である。

Liら<sup>14)</sup> は、網膜血管新生を抑制する作用をもつ色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor: PEDF) をPLGAナノパーティクルに封入し、網膜虚血モデルマウスの眼球内に投与した。PEDF封入PLGAナノパーティクルを使うことで、PEDF単体で投与するよりも長期にわたって網膜神経節細胞と内網状層の保護できることを示した。

### 核酸導入

*In vivo* で用いられている遺伝子導入法は、ウイルスベクターによるものがほとんどである。ウイルスベクターによるものは遺伝子導入効率は高いが、ウイルス蛋白に対する免疫反応、増殖能をもったウイルス混在の可能性が排除できないこと、ベクターがゲノムに挿入される場合には他の遺伝子に影響する可能性があることなどが問題になる。非ウイルスベクター法として、プラスミドDNAとカチオン性脂質との複合体 (リポプレックス) を用いるリポフェクションと、プラスミドDNAとカチオン性ポリマーとの複合体 (ポリプレックス) を用いるポリフェクションなどが用いられている。現状ではリポフェクションのほうが頻用されているが、ポリフェクションは①均一で安定な複合体形成、②遺伝子導入率が高い、③血清の影響を受けやすいなどの利点がある<sup>15)</sup>。前述のように、PLGAナノパーティクルが正円窓

から蝸牛に導入できることから、同じ方法で蝸牛への遺伝子導入ができると期待される。

米国では、加齢性黄斑変性症などによる毛細血管新生を抑制して視力障害の進行を抑える効果をねらって、血管内皮増殖因子 (VEGF) 抑制性のRNAアプタマー (pegaptanib, Macugen®) が使用されており<sup>16)</sup>、日本でも臨床試験が行われている。アプタマーとは標的蛋白と特異的に結合するようにデザインされた核酸分子であるが、pegaptanibの場合、核酸残基の置換、40kDaのポリエチレングリコール (PEG) との結合によって、硝子体液中での安定性と反応特異性を向上させた<sup>16)</sup>。これをPLGAマイクロスフェア化することでさらなる徐放効果をねらう試みも行われている<sup>17)</sup>。

### おわりに

感覚器領域においても、昨今の再生医学研究の成果で、これまで機能回復が難しかった病態に対して治療に用いることのできる多数の因子が同定されつつあり、それとともに、それぞれに適したDDSの開発も進みつつあり、近い将来の臨床応用が期待される。さらに我々は、骨髄由来幹細胞を末梢血管から導入するとマクロファージ様の細胞が内耳に集積することに着目して、これを利用したDDSを模索している。

謝 辞

本稿作成に当たり、神戸市立中央市民病院眼科 山城健児先生にご協力いただきましたことを深謝いたします。

●文 献

- 1) Angelborg C, Hillerdal M, Hultcrantz E, et al: The microsphere method for studies of inner ear blood flow. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 50: 355-362, 1988
- 2) Juhn SK, Hunter BA, Odland RM: Blood-labyrinth barrier and fluid dynamics of the inner ear. *Int Tinnitus J* 7: 72-83, 2001
- 3) Ho HG, Lin HC, Shu MT, et al: Effectiveness of intratympanic dexamethasone injection in sudden-deafness patients as salvage treatment. *Laryngoscope* 114: 1184-1189, 2004
- 4) Salt AN, Plontke SK: Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug Discov Today* 10: 1299-1306, 2005
- 5) Lefebvre PP, Staecker H: Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol* 122: 698-702, 2002
- 6) Plontke S, Lowenheim H, Preyer S, et al: Outcomes research analysis of continuous intratympanic glucocorticoid delivery in patients with acute severe to profound hearing loss: basis for planning randomized controlled trials. *Acta Otolaryngol* 125: 830-839, 2005
- 7) Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al: Novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 115: 2016-2120, 2005
- 8) Iwai K, Nakagawa T, Endo T, et al: Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 116: 529-533, 2006
- 9) Tamura T, Kita T, Nakagawa T, et al: Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 115: 2000-2005, 2005
- 10) Cunha-Vaz JG: The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res* 78: 715-721, 2004
- 11) Jaffe GJ, Yang CH, Guo H, et al: Safety and pharmacokinetics of an intraocular fluocinolone acetonide sustained delivery device. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3569-3575, 2000
- 12) Musch DC, Martin DF, Gordon JF, et al: Treatment of cytomegalovirus retinitis with a sustained-release ganciclovir implant. The Ganciclovir Implant Study Group. *N Engl J Med* 337: 83-90, 1997
- 13) Eljarrat-Binstock E, Raiskup F, Fruchtpery J, et al: Hydrogel probe for iontophoresis drug delivery to the eye. *J Biomater Sci Polym Ed* 15: 397-413, 2004
- 14) Eljarrat-Binstock E, Raiskup F, Stepensky D, et al: Delivery of gentamicin to the rabbit eye by drug-loaded hydrogel iontophoresis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2543-2548, 2004
- 15) Li H, Tran VV, Hu Y, et al: A PEDF N-terminal peptide protects the retina from ischemic injury when delivered in PLGA nanospheres. *Exp Eye Res* 83: 824-833, 2006
- 16) 有馬英俊: 遺伝子導入法としてのポリフェクシオン- $\alpha$ -シクロデキストリンを基本素材とする高機能性遺伝子導入用ベクターの構築を中心として一. *薬学雑誌* 124: 451-464, 2004
- 17) Rakic JM, Blaise P, Foidart JM: Pegaptanib and age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 352: 1720-1721, 2005
- 18) Ng EW, Shima DT, Calias P, et al: Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 5: 123-132, 2006
- 19) Carrasquillo KG, Ricker JA, Rigas IK, et al: Controlled delivery of the anti-VEGF aptamer EYE001 with poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 290-299, 2003

特報

第43回  
2006年度

ベルツ賞受賞論文

2等賞

## 内耳障害への再生医学的アプローチ

伊藤 壽一<sup>\*\*1</sup> 中川 隆之<sup>\*1</sup> 山本 典生<sup>\*2</sup>

## Summary

Inner ear disorders including sensorineural hearing loss is one of the most common disabilities in our society, but treatment options are currently limited to cochlear implants and hearing aids. The major reason for this is limited capacity for regeneration of the mammalian inner ear. We have sought alternative means of biological therapy for inner ear diseases via three different approaches, 1) cell therapy, 2) promotion of spontaneous regenerative activity and 3) development of drug delivery systems (DDS) for inner ears.

As for cell therapy, the first attempts to examine the feasibility of cell therapy in the treatment of inner ear disorders have been performed using neural stem cells (NSCs), making NSC transplantation for the restoration of inner ear cells a potentially viable treatment. Further studies have indicated the high potential of embryonic stem cells for restoration of spiral ganglion neurons in rodents and primates. Results from studies using bone marrow-derived cells suggest their possible use for restoration of spiral ganglions and gap junction systems in the cochlea. Cell transplantation has also been demonstrated as a strategy for gene delivery into the inner ear without use of virus vectors.

There are three possible strategies for hair cell regeneration in the inner ear, induction of proliferation of progenitor cells, transdifferentiation of supporting cells to hair cells and promotion of self-repair of damaged hair cells. Studies for induction of cell proliferation have indicated involvement of p27kip1 and skp2, beta-catenin and E-cadherin in mechanisms of regulation of cell proliferation in sensory epithelia. Pharmacological inhibition of Notch signaling has been demonstrated as a strategy for transdifferentiation of supporting cells to hair cells after birth. Results from studies using organotypic cultures demonstrate that functional hair cells can be regenerated through the process of self-repair.

We have attempted to develop DDS for inner ears, because lack of safe and effective

\*1 京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 \*\*1 同 教授

\*2 同 分子生物学教室

methods for drug delivery to the cochlea has been a considerable obstacle to clinical application of basic findings in the inner ear. Advances in pharmacological technology provide various drug delivery systems via biomaterials, which can be utilized for local drug delivery to the cochlea. Results from studies using poly lactic/glycolic acid (PLGA) nanoparticles and gelatine hydrogels indicate the potential of these materials for local drug delivery to the cochlea in clinic.

The present findings provide a sound foundation for the development of therapies to treat inner ear disorders. Some of the findings presented here are being progressed towards the clinic.

Key words: inner ear, regeneration, cell therapy, stem cell, cyclin-dependent kinase inhibitor, Wnt signaling, Notch signaling, drug delivery system

## 目 次

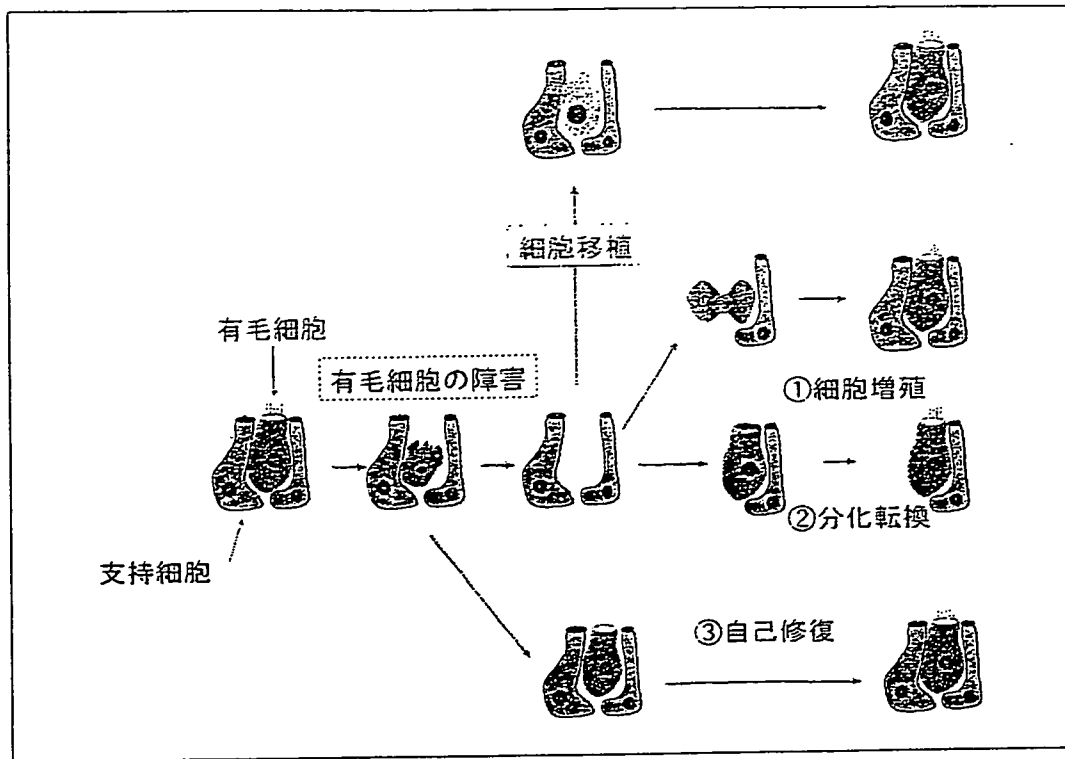
## I. 緒 言

- I. 緒言
- II. 細胞移植による内耳再生
  - 1. 内耳細胞移植技術の開発
  - 2. 神経幹細胞移植
  - 3. 内耳前駆細胞の分離培養と移植
  - 4. 胚性幹細胞移植
  - 5. 骨髄由来細胞移植
  - 6. 細胞移植による内耳遺伝子導入
  - 7. 小括
- III. 内耳の自発的再生の誘導
  - 1. 内耳での細胞増殖制御機構
  - 2. 内耳有毛細胞の分化運命決定機構の解明による内耳再生
  - 3. 内耳有毛細胞の自己修復
  - 4. 小括
- IV. 内耳薬物投与システムの開発
  - 1. PLGA ナノパーティクルを使用した内耳薬物投与システム
  - 2. ゼラチンハイドロゲルを使用した内耳薬物投与システム
  - 3. 小括
- V. 総括
- VI. 文献

これまで内耳障害で高度感音難聴や前庭障害が生じた場合、それは回復不能とされてきた。特に高度感音難聴の場合、従来は治療手段がなかった。わが国には補聴器を使用しても言葉の理解が難しい高度難聴者が、障害者として登録されているだけでも約 40 万人存在し、中等度難聴者の数を加えると数百万人の人が難聴という障害に苦しんでいる。これに対し 1980 年代になり、聴神経を刺激する電極を内耳に手術的に挿入し、聞こえを回復しようとする人工内耳が臨床応用され、高度難聴者に対する唯一の治療方法として定着している。筆者はわが国で最も多くの人工内耳手術を手がけてきた。人工内耳は確かに高度難聴者に対する福音であるが、いくつかの疑問が生じる。人工内耳手術を受けた人々の聴覚はどの程度まで回復しているのか、本当に満足しうる状態か。また、1 万個以上あり、絶妙な配置で音・言語の解析をする内耳有毛細胞に対し、20 本程度の人工内耳電極でその機能を代用できるものであろうかなどという点である。また、人工内耳は海外からの輸入医療であり、われわれのオリジナリティーはない。

障害を受けた内耳有毛細胞を再生させて機能

図1 内耳再生へのストラテジー



も回復させるという発想は、全くの夢物語であろうか。

同様の期待は中枢神経系の障害の領域でも生じていた。これまで哺乳類の中枢神経系は、神経細胞、神経線維を含め、一度障害を受けると回復不能とされていた。しかし、現実には数々の研究から中枢神経にも再生能力があり、近い将来の臨床応用に向けて研究が進められている。

われわれはこれまでの研究から、内耳（特に内耳の中でも最も重要な位置をしめる「感覚細胞」、細胞の頂部に感覚毛が存在するのが特徴で「有毛細胞」とも呼ぶ）にも再生能力があることを確信した。潜在的な再生能力はあるが、再生を妨げようとする因子があり、そのために一見再生しないようにみえると考えに至った。さらに、ここ数年で急速に将来の臨床応用に期待を抱かせる結果が現れてきた。

#### 1) 内耳の自発的再生の誘導

再生医学を内耳に応用する場合、現段階では二つの方法があると考えられる。一つは「自発的再生の誘導」である。この自発的再生は、内耳再生の分子機構を解明し、それを内耳障害の

治療に応用しようとする試みである。

自発的再生の誘導には、① 内耳の特に有毛細胞の細胞増殖を停止させている分子を解除、または細胞増殖を誘導する分子を内耳に投与し、細胞増殖を誘導する、② 残存する細胞から有毛細胞への分化転換を誘導する、③ 内耳有毛細胞の自己修復能力を高め、機能的有毛細胞として再生する、などの方法が考えられる（図1）。

①に関しては、内耳感覚上皮（有毛細胞やその周辺の支持細胞が存在する）にある細胞の増殖・増殖の停止を調節する細胞周期の制御とその分子機構につき検討した。その結果、内耳の有毛細胞も他の組織の細胞と同様に、細胞周期を増殖の方向に向かわせるシグナル、停止の方向に向かわせるシグナルなどが巧妙に機能していることが分かった。このような分子メカニズムを解明し、障害を受けた有毛細胞に対し、細胞を増殖・再生に向かわせるようなシグナルを与えることにより細胞を再生し、機能回復に向かわせることができる。

②に関しては、特に内耳有毛細胞の周囲に

存在する支持細胞から有毛細胞に分化転換するのに重要な因子である Notch 情報伝達系のシグナルを変えることにより、生後の蝸牛感覚上皮で有毛細胞を新生することができた。特に、この分化転換を薬物投与により誘導できることが分かったことは、臨床応用の見地からは重要な意味を持つ。

③ に関しては、自己修復により機能的な有毛細胞が再生可能であることを証明することができ、薬物投与により自己修復が促進されることが分かった。

## 2) 細胞移植による内耳再生

内耳障害に再生医学を応用するにあたり、上記の自発的再生を促進するのも一つの方法であるが、もう一つの大きな柱となりうるものは「細胞移植」である。具体的には種々の幹細胞を用い、幹細胞を障害された内耳に移植し、内耳細胞の再生に応用しようとする試みである。

細胞移植により内耳を再生させようとする試みは、国の内外を問わず全くわれわれのオリジナルである。

第一に、われわれは内耳と同じ外胚葉系の幹細胞である神経幹細胞に着目した。神経幹細胞を幼若ラットの内耳に移植すると、神経幹細胞はラットの内耳に生着し、しかも少数であるが、内耳有毛細胞層のなかに侵入し、形態的には有毛細胞類似の細胞に分化した所見を得た<sup>2)</sup>。さらに、神経幹細胞の *in vitro* での分化について検討したところ、内耳有毛細胞のマーカータンパクである myosin7a と Brn3c を両方発現する細胞を認めた<sup>3)</sup>。これらの所見は、内耳に対する細胞移植医療の可能性を示すものである。

内耳障害に対し細胞移植による治療を目指す際、克服しなくてはいけないいくつかの課題がある。最大の課題は移植材料の開発である。移植材料には種々の幹細胞を利用することを考えているが、幹細胞にもいくつかの種類・段階がある。どの幹細胞を用いるべきなのか。細胞の能力という見地からは、胚性幹細胞 (ES 細胞) が注目される。胚性幹細胞は、理論的には生体のいかなる細胞も再生できる能力を持つ。

内耳の再生という面からは、内耳幹細胞なるものが分離・培養でき、内耳に移植できれば理想的である。われわれは内耳前駆細胞と考えられる細胞を分離・培養することに成功した。齧歯類の内耳への移植では内耳で十分生着し、内耳再生に有用な細胞であると考えられる。

胚性幹細胞を使用するにせよ、その他の胎児由来の細胞を使用するにせよ、倫理的な問題を解決しなくてはならない。

このような幹細胞に比べ、骨髄由来細胞は倫理的な制約は少ない。骨髄由来細胞は、自己のものを利用することが可能である。内耳への移植細胞として考えた場合、移植前にどのような分化誘導処置を行うのかも重要な問題である。われわれは骨髄由来細胞を内耳に移植することにも成功している。骨髄由来細胞が内耳の細胞に誘導できれば、臨床応用という観点からは最も可能性の高いものである。

内耳障害に対し再生医療を応用する場合、その主な目標となるものは内耳有毛細胞の再生である。しかし、仮に有毛細胞が再生しても内耳からの信号を中枢に送る蝸牛神経 (ラセン神経節細胞) が障害を受けていれば信号は中枢に伝わらず、その結果難聴は回復しないことになる。また、現在高度難聴に対する唯一の治療法は人工内耳であるが、人工内耳手術を行ってもラセン神経節細胞に障害があれば良好な聞き取りが得られない。細胞移植によりラセン神経節細胞が再生し、内耳有毛細胞や脳幹の蝸牛神経核細胞に神経連絡を作ることができれば、人工内耳での聞き取りも向上すると期待される。われわれは細胞移植により齧歯類のラセン神経節細胞の再生に成功し、機能の回復も確認した。さらにその技術をサルに応用し、良好な結果を得ている。現在は臨床応用に向けての最終段階にある。

蝸牛有毛細胞が音刺激に反応し、興奮をラセン神経節に伝えるためには、蝸牛内リンパ腔での内リンパ電位の生成・維持が不可欠となる。したがって、内リンパ電位生成・維持に不可欠な、蝸牛側壁に存在する血管条やラセン靱帯も

内耳再生医療の標的になる重要な組織といえる。これらに対してもわれわれは骨髄由来細胞を移植することにより、再生に成功している。

また、細胞移植を「ウイルスベクターを使わない内耳への遺伝子導入」に応用することにも成功した。約半分の感音難聴は、遺伝子異常的な背景を持つと推測されており、細胞移植により失われた遺伝子を補うことができれば、感音難聴の新しい治療への道を切り開くことができる。

### 3) 内耳薬物投与システム開発

自発的再生の誘導にせよ、内耳への細胞移植にせよ、それらのみで完全に内耳を組織学的、機能的に再生するのは困難である。それらを支援する技術の開発が不可欠である。

内耳は骨に囲まれ、その中にリンパ液を有し、外から投与された物質を「血液内耳関門」などで選択排除する特異な環境にある。上記の自発的再生の誘導、細胞移植を行うに際しても、この特異環境をできるだけ損傷することなく内耳にアプローチする必要がある。一方、*in vitro*の系では内耳有毛細胞などを保護する薬物がいくつか報告されている。しかしこれまで、内耳を損傷することなく内耳保護に有効な薬物を投与する方法はほとんどなかった。

我々はナノパーティクルやゼラチンハイドロゲルを利用した新しい drug delivery system (DDS) を開発し、内耳を損傷することなく内耳を保護する薬物を投与することに成功した。本 DDS 法はすでに臨床応用の段階に来ている。

本論文では、まず全くわれわれのオリジナルである「細胞移植による内耳再生」、次いで「内耳の自発的再生の誘導」、最後に「内耳薬物投与システム開発」の詳細につき述べる。

## II. 細胞移植による内耳再生

### 1. 内耳細胞移植技術の開発

内耳はほとんどすべての部位が骨で囲まれている。新生動物ではこの骨が柔らかく、細胞を直接注入することが可能であるが、成長すると

内耳は硬い骨に囲まれ、内耳にアプローチするためには、いずれかの部位で骨を削開する必要がある。しかし、内耳の骨壁を損傷し、内耳膜迷路が開放されると内耳障害が惹起されることは臨床的によく知られているところである。したがって、内耳にアプローチするためには、どの部位からアプローチするのが最も望む場所に細胞を導入することができ、なおかつ、機能的ダメージが少ないかを検討する必要がある。また、細胞移植のソースとなる細胞の候補を考えた場合、マウス由来の細胞を用いると選択肢が広がること、移植後の組織学的解析が容易であること、豊富な遺伝子情報が明らかなことなどを考慮すると、実験動物としてマウスを用いることが理想的と考えられる。しかし、マウスの内耳はきわめて小さく、手術的アプローチが困難であるという問題があった。そこでわれわれは、マウス内耳に細胞移植することが可能か、どの程度詳細に移植部位が限定できるのかを検討した。

移植細胞としては、green fluorescence protein (GFP)-transgenic mouse 由来の神経幹細胞を用いた。より幼弱な細胞の方が分化的多様性を持つと考え、胎仔間脳由来の神経幹細胞を移植細胞とした。移植方法としては、蝸牛の側壁から直接蝸牛内に細胞を注入する方法と、半規管から細胞を注入する方法を用いた (図 2 A)。マウス蝸牛では、蝸牛基底回転上を鐙骨動脈が走行するので、蝸牛第 2 回転から細胞を注入した。蝸牛側壁から移植する方法は、蝸牛に大きなダメージを与えることが予想されるが、蝸牛感覚上皮が存在する蝸牛中央階に直接細胞を導入できる利点がある。一方、半規管から細胞を注入する方法では、蝸牛まで距離があるという弱点があるが、蝸牛および中耳伝音系に全く手術操作が及ばないという利点がある。それぞれの方法で神経幹細胞を移植し、移植 3, 7, 14 日後に聴性脳幹反応 (ABR) にて聴力評価を行った後に、14 日目に蝸牛組織を採取し、移植細胞の局在を評価した。

蝸牛側壁から細胞移植を行った場合、われわ

れのねらい通り、移植細胞を蝸牛中央階に認めることができたが、聴力喪失の程度はかなり大きなものとなった(図2B)。一方、半規管から細胞を移植した場合、蝸牛の外リンパ腔にのみ細胞が認められ、聴力低下は軽度にとどまることが分かった(図2C)。以上の結果から、機能障害を軽度にとどめつつ、蝸牛内に細胞を送り込むことができる半規管からの移植方法を中心として用い、蝸牛側壁からの移植方法は蝸牛内リンパ腔に意図的に細胞移植を行う場合に使用した<sup>3)</sup>。

次に、蝸牛の一次神経節であるラセン神経節および蝸牛神経が存在する蝸牛軸への細胞移植について、マウスを用いた検討を行った。蝸牛正円窓から蝸牛軸に向かって、GFP 標識した神経幹細胞をマイクロシリンジで注入した。移植2週間後に移植細胞の局在を検討したところ、蝸牛軸内に移植細胞を認めることができた(図2D)。しかし、組織損傷の程度が大きく、機能評価は困難であった<sup>4)</sup>。ラセン神経節の機能評価は、電気刺激聴性脳幹反応(eABR)にて行うが、この方法では蝸牛内に電極を挿入する必要があり、マウス蝸牛の大きさを考えると、機能評価がきわめて困難であることが予想された。このため、ラセン神経節細胞再生を目的とする実験では、機能評価が可能な大きさの蝸牛を持つモルモットなど大型の齧歯類をレシピエント動物として用いることとした。

## 2. 神経幹細胞移植

神経幹細胞の内耳移植細胞としての能力を評価する目的で、生後3週の内耳機能の成熟したマウスに前処置を加えることなく、半規管からGFPにて標識した胎仔間脳由来の神経幹細胞を移植し、4週間後に組織学的解析を行った。移植細胞は蝸牛の外リンパ腔に認められ、蝸牛組織内に侵入する細胞は認められなかった(図3A)。網膜への移植実験でも、障害を惹起していない正常の網膜には、神経幹細胞は侵入しないことが示されており、これに合致する所見と考えられる。一方、移植細胞は、蝸牛の基底

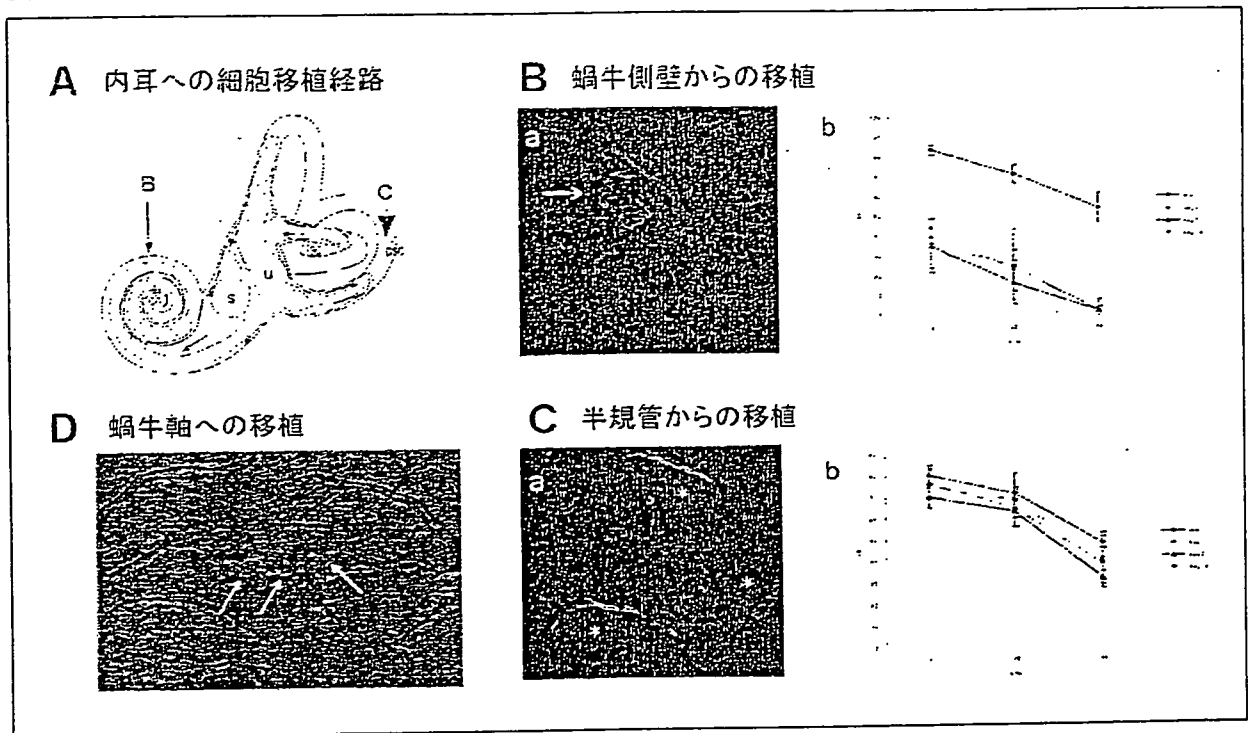
回転から頂回転まで広く分布しており、鼓室階、前庭階ともに認められたことから、半規管からの移植方法は、マウス蝸牛の外リンパ腔に広く細胞を導入できる方法であることが確認された<sup>3)</sup>。免疫組織化学による分化傾向の解析では、多くの移植細胞はグリア系の細胞に分化しており、神経細胞に分化した細胞は16%にとどまった(図3A)。また、内耳有毛細胞のマーカーを発現する細胞は認められなかった。この分化傾向は、中枢神経系に神経幹細胞を移植した場合とほぼ同様の割合であり<sup>6)</sup>、内耳移植による特別な分化誘導傾向は認められなかった。

次に、アミノ配糖体局所投与により内耳感覚上皮の障害を惹起した後に神経幹細胞を蝸牛側壁から注入する方法で内耳に移植する実験を行い、移植細胞の分布および分化傾向について検討した。非障害内耳に移植した場合と同様に、外リンパ腔に多くの移植細胞が分布していたが、障害内耳では内耳組織内に移植細胞の侵入を示す所見が認められた(図3B)。移植細胞の組織内への侵入は、蝸牛では、感覚上皮、ラセン神経節、ラセン縁、前庭では、感覚上皮、感覚上皮の基底部の位置する結合織に認められた。細胞の組織内への侵入経路については、蝸牛では、外リンパ腔から感覚上皮、ラセン神経節に侵入している像が観察された(図3B)。一方、前庭感覚上皮では、感覚上皮の管腔側表面、感覚上皮内に移植細胞が認められたことから、内リンパ腔側から感覚上皮内に細胞が侵入したことが推察された。

細胞の分化傾向について、免疫組織化学にて解析したところ、非障害内耳に移植した場合と同様に、グリア系の細胞に分化した細胞が最も多く認められ、約10%の細胞が神経系のマーカーを発現していた。注目すべき点として、障害内耳では、前庭感覚上皮内に侵入した移植細胞の一部が内耳有毛細胞のマーカーであるmyosin7aを発現している所見が認められた(図3C)。一方、蝸牛感覚上皮周辺に侵入した移植細胞でのmyosin7a発現は認められなかった。



図2 マウス内耳への移植経路と移植細胞の局在



A: 蝸牛側壁 (B 矢印) および半規管 (C 矢頭) からの移植経路を示す。灰色の部分は膜迷路を示す。  
 ch: 蝸牛, S: 球形嚢, U: 卵形嚢, psc: 後半規管, lsc: 外側半規管  
 B: 蝸牛内リンパ腔に移植細胞 (緑) を認める (a)。移植直後から、聴性脳幹反応閾値の著明な上昇を認め、回復傾向を認めない (b)。  
 C: 蝸牛外リンパ腔に移植細胞を認める (\*, a)。移植による聴性脳幹反応閾値の上昇はわずかである (b)。  
 D: 蝸牛軸に移植細胞 (矢印) を認める。

以上の所見は、神経幹細胞は障害を受けた内耳感覚上皮に侵入することが可能であり、有毛細胞に分化する可能性があることを呈示している<sup>7)</sup>。しかし、myosin7a 陽性の移植細胞は少数にとどまったことから、機能的な再生を誘導するためには、移植細胞への移植前の分化誘導などの工夫が必要と考えられる。

### 3. 内耳前駆細胞の分離培養と移植

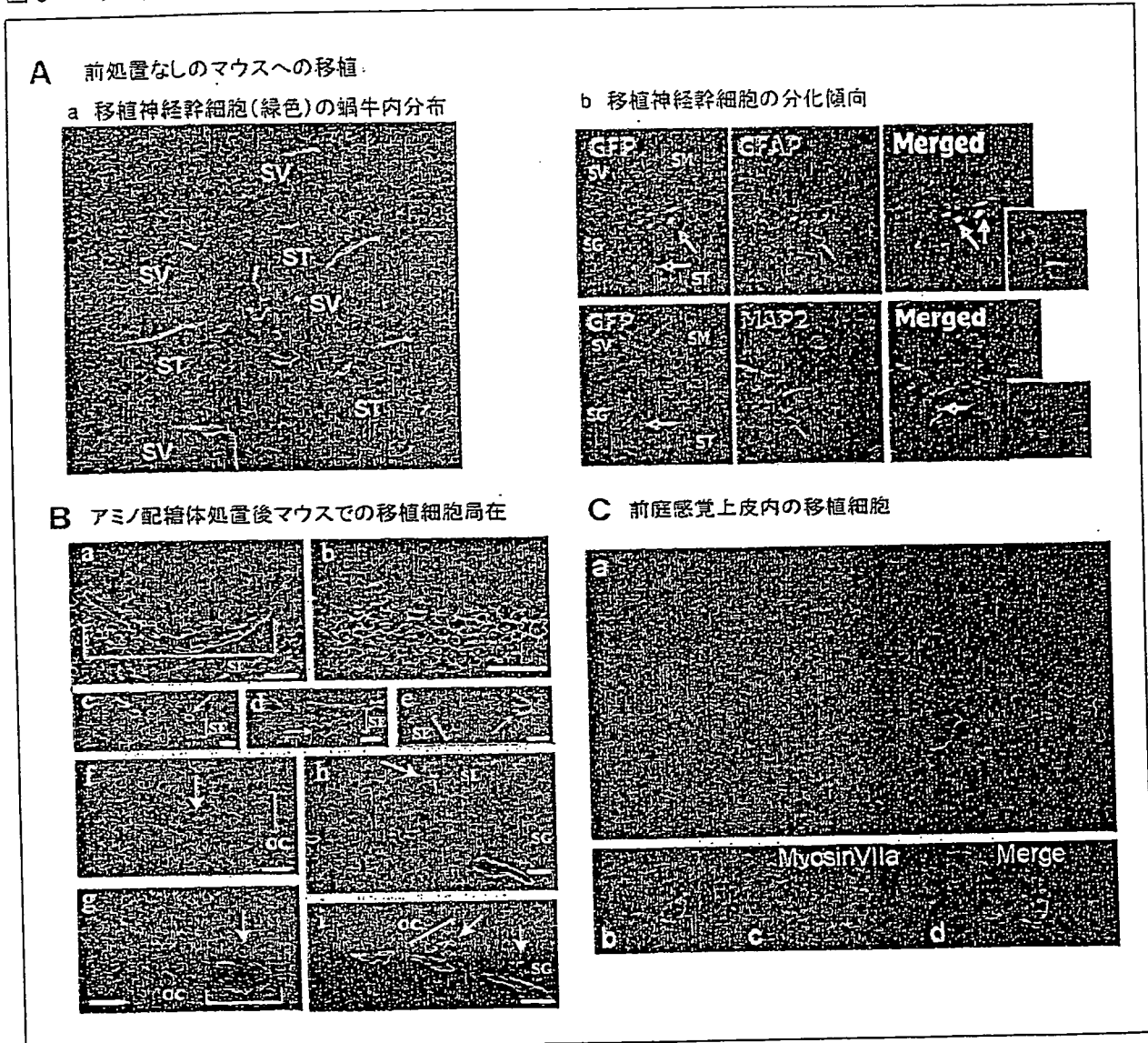
内耳再生を目的とした移植細胞について考えた場合、最も理想的な細胞ソースは内耳由来細胞であり、より未熟な胎児から採取された細胞が望ましい。われわれは「内耳幹細胞」、「内耳前駆細胞」とも呼べる細胞が分離・培養でき、また内耳への細胞移植のドナーとして使用できるかを検討した。

これまで、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持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の内耳での発現が研究されているが、内耳のどの部位に多分化能を持つ細胞が存在するのかわかりません。

われわれは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と考え、胎生 12 日ラット内耳の耳朶から不死化遺伝子を用いることなく培養細胞系を樹立した (図 4 A)。この時期の内耳では蝸牛の形成が始まっておらず、有毛細胞や支持細胞に将来分化していく未分化な細胞が豊富に存在すると考えられている。その細胞群から樹立した 1 個

図3 マウス内耳への神経幹細胞移植



A : 移植細胞は外リンパ腔に局在し (a), グリア細胞のマーカである GFAP および神経のマーカである MAP2 陽性細胞を認める (b). SV : 前庭階, ST : 鼓室階, SM : 中央階, SG : ラセン神経節

B : 卵形嚢 (a-e) に移植細胞 (緑) を認め, 感覚上皮 (c), 上皮内 (d-e) に局在を認める. コルチ器 (f-i), ラセン縁 (h), ラセン神経節 (i) にも, 移植細胞を認めた.

SE : 感覚上皮, OC : コルチ器, SL : ラセン縁, SG : ラセン神経節

C : 半規管膨大部感覚上皮内に移植細胞を認め (a), 有毛細胞のマーカである Myosin VIIa 発現を認めた (b-d).

の細胞由来の細胞株は, 培養状態では神経幹細胞のマーカートンパクであるネスチンを高率に発現する. しかし, 増殖が止まり, 分化傾向になる培養状態では, 有毛細胞 (myosin 6, 7a), 支持細胞 (cytokeratin, p27kip1, Hes1), 神経細胞 (neurofilament200, MAP1), グリア (A2B5, GFAP) のマーカートンパクを発現す

る細胞が出現した (図4B). この結果から, この細胞株は多能性を持つ細胞すなわち, 有毛細胞, 支持細胞, 神経細胞, グリアに分化する能力を持つ細胞であり, 内耳 (感覚器) 前駆細胞と考えられた<sup>2)</sup>.

この内耳前駆細胞を音響障害を与えたラットの内耳に移植したところ, その細胞は内耳感覚

上皮組織内に侵入し、内、外有毛細胞の層で生着した(図4C)。この結果は内耳前駆細胞が内耳有毛細胞の再生のための細胞移植のドナーとして適切であることを示し、さらに障害を受けた有毛細胞の周辺の細胞群が移植細胞を適切な位置に導き生着させる足場の役割を果たしていることを示す。現在はこれら移植細胞が組織学的のみならず、有毛細胞の機能を有するかを検討中である。

#### 4. 胚性幹細胞移植

内耳前駆細胞は内耳への細胞移植の有力なドナーであるが、安定した供給などの面を考慮すると、もう一つの有力な細胞ソースは胚性幹細胞である。すでに、胚性幹細胞を内耳の細胞へと分化誘導できることが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、その再現性は確認されておらず、われわれが同様の方法で内耳の細胞に分化する細胞を分離・培養を試みたが、目的とする細胞は得られておらず、分化誘導の方法については再評価が必要と考えられる。

一方で、胚性幹細胞から神経細胞への分化誘導方法は、いくつか確立されたものがある。蝸牛の中心の蝸牛軸に存在する蝸牛の一次神経節細胞であるラセン神経節細胞は、有毛細胞が受容した音刺激を脳に伝える役割を果たしているが、臨床的には人工内耳の有効性を決定づける重要な細胞である。また、蝸牛神経炎といわれる病態は、このラセン神経節細胞が特異的に障害された状態と考えられており、このような病態においてはラセン神経節細胞再生は聴覚再生に直結する。このような背景から、われわれは細胞移植によるラセン神経節細胞再生に着目した研究を行った。

ラセン神経節細胞のソースになりうる細胞として、神経幹細胞がまず想起される。しかし、神経幹細胞を蝸牛軸に移植した場合、神経に分化する細胞は10%に過ぎなかった<sup>4)</sup>。蝸牛軸に生着した神経細胞が中枢神経系と神経接合を形成して初めて機能的再生が期待できることを考慮すると、さらに高率に神経細胞に分化する移

植細胞が望ましい。そこで、胚性幹細胞から分化誘導した神経細胞を移植細胞として、ラセン神経節細胞の機能的再生についての研究を行った。

胚性幹細胞の神経誘導については、いくつかの報告があるが、われわれは笹井らの研究グループが開発した stromal cell-derived inducing activity (SDIA) 法を用いた<sup>5)6)</sup>。SDIA 法では、胚性幹細胞を PA6 という胎仔マウス頭蓋骨から得られた間葉系細胞と共培養することにより、胚性幹細胞を神経細胞に分化誘導する方法である。この方法では、共培養を3-4日行った後に添加する薬物を変えることにより、種々の神経系細胞を得ることができる。われわれの実験では、SDIA 誘導のみを行った比較的未分化な状態の神経系細胞を移植細胞として用いた。この細胞は、分離後さらに数日培養を続けると、ほとんどの細胞が神経細胞に分化する。本論文では、以後われわれが使用した移植細胞を胚性幹細胞 (ES) 由来神経前駆細胞と呼ぶこととする。

まず器官培養系で、マウス蝸牛および前庭感覚上皮とマウス ES 由来神経前駆細胞を共培養し、内耳有毛細胞と神経接合を形成する能力があるかを検討した。7日間の共培養後、ES 由来神経前駆細胞は神経に分化し、活発に神経突起を有毛細胞に向かって伸長することが示された(図5A)。詳細に観察すると、ES 由来神経前駆細胞の神経突起は、有毛細胞の元神経終末が存在する部位で有毛細胞と接しており、同部位でシナプス形成のマーカーの一つである synaptophysin を発現していることが確認された(図5B)。内耳有毛細胞および ES 由来神経前駆細胞の神経終末における synaptophysin の発現パターンは、内耳の発達段階で感覚上皮にて活発に求心系神経終末と有毛細胞間にシナプス形成が進行している時期のパターンと、ほぼ一致するものであった。また、ES 由来神経前駆細胞の分化傾向について、免疫組織化学にて解析したところ、内耳の求心系神経伝達物質であるグルタミン酸の発現が優位に認められ、

さらに求心系の後シナプスの存在を示唆する NMDA レセプターの発現が認められた (図 5 C).

これらの所見は、内耳感覚上皮との共培養により、ES 由来神経前駆細胞は内耳の求心系神経に近い性質を持つ神経細胞に分化し、活発に神経突起を伸長し、有毛細胞とシナプス形成する能力があることを示すものである<sup>14,15</sup>。したがって、ES 由来神経前駆細胞は、内耳の一次神経節細胞再生のソースとして、高い潜在能力を有する細胞ということが出来る。

次に、マウス ES 由来神経前駆細胞のラセン神経節細胞再生の可能性について *in vivo* で検討した。正常モルモット蝸牛の基底回転の蝸牛軸に GFP にて標識した ES 由来神経前駆細胞を注入し、移植 3-4 週間後に移植細胞および移植細胞由来の神経突起の蝸牛、聴神経、脳幹における局在を観察した。移植細胞は、主に注入された蝸牛基底回転の蝸牛軸に存在したが、蝸牛神経走行に沿って、末梢側、中枢側にも migration している像が観察された (図 5 D)。一部の移植細胞は、蝸牛第 2 回転のラセン神経節にまで侵入していた。ほとんどすべての移植細胞が神経細胞に分化しており、活発に神経突起を末梢、中枢側に伸長している組織像が確認された。移植細胞の多くは growth associated protein 43 を発現しており、活発な神経突起伸長を裏付ける所見といえる。移植細胞から伸長された神経突起は、末梢側では蝸牛頂部のラセン神経節細胞まで、中枢側では脳幹の外背側に達していることが確認された。

以上の所見は、移植された ES 由来神経前駆細胞が蝸牛軸で生存することができ、末梢、中枢へと移動することができることを示している。また、ほぼすべての細胞が神経に分化しており、活発に末梢、中枢に神経突起を伸長できることが明らかとなった<sup>14</sup>。

以上の結果を踏まえ、次の段階として、ラセン神経節障害モデルを用いて、機能回復に特に注目した実験を行った。ラセン神経節障害モデルとして、モルモットラセン神経節細胞変性モ

デルを用いた。アミノ配糖体であるカナマイシンと、利尿薬であるエタクリン酸を全身投与することにより、モルモットは 3-4 日で聾となる<sup>16,17</sup>。この 3 週間後には、ラセン神経節細胞の変性、消失が誘導される<sup>18</sup>。このタイミングで、人工内耳手術のアプローチに準じ、蝸牛基底回転に開窓し、同部から蝸牛軸に ES 由来神経前駆細胞を移植した。移植 4 週間後に、ラセン神経を直接電気刺激し、脳波にて脳幹の反応を記録する eABR にて、ラセン神経節機能評価を行った後に内耳組織を採取した。移植細胞を含まない培養液のみを注入した動物をコントロールとした。eABR の閾値は、コントロールでは約 0.9mA に上昇していたのに対して、移植を受けた動物では 0.4mA まで回復しており、統計学的にも有意差が認められた (図 5 E)。すなわち、ES 由来神経前駆細胞移植により、ラセン神経節機能が回復したと考えられる。組織学的にも、多くの移植細胞由来の神経細胞が蝸牛軸に認められ、これら移植細胞由来の神経細胞が機能再生に寄与したことが推測できる<sup>14</sup>。

以上の結果は、ES 由来神経前駆細胞の蝸牛軸への移植により、ラセン神経節細胞を機能的に再生できることを示す。

SDIA 法による胚性幹細胞の神経分化誘導は、マウス胚性幹細胞だけではなく、サル胚性幹細胞にも有効な方法である<sup>19</sup>。モルモットモデルでのラセン神経節機能再生が霊長類でも再現できるかを検討するために、サル蝸牛へのサル ES 由来神経前駆細胞の移植実験を行い、モルモットを使用したと同様の良好な結果を得た。

これまでに、サルを用いた感音難聴に関する研究はほとんど行われていなかったので、まずサルの難聴モデルを作製した。耳毒性薬物であるシスプラチンをサルの内耳へ局所投与することにより、聾とするモデルを開発した。ヒトにおける人工内耳手術と同様のアプローチ、すなわち、後下鼓室開放法にて、サル蝸牛正円窓を明視下においた。齧歯類の実験では強いラセン神経節細胞障害作用を持つことが明らかである