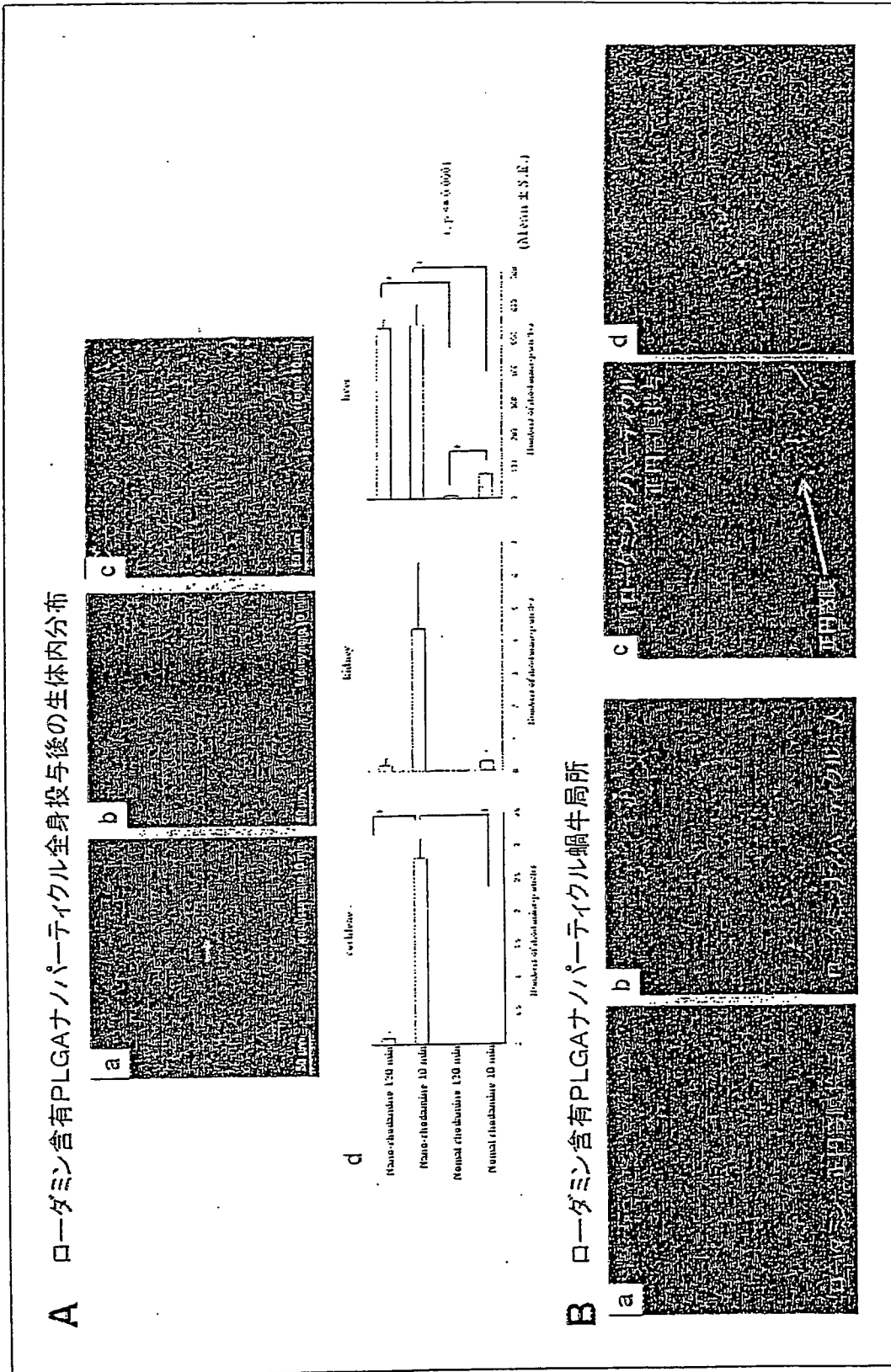


図14 ローダミン含有ポリ乳酸/グリコール酸 (PLGA) ナノパーティクルの蝸牛内分布



A : ローダミン含有 PLGA ナノパーティクル全身投与 10 分後、蝸牛では血管に相等する部位でのみローダミン蛍光 (赤) が認められた (a)。腎臓 (b)、肝臓 (c) では、多くの蛍光が認められた。肝臓でのみローダミンの徐放が示唆された (d)。  
 B : 通常のローダミン正円窓膜上投与 24 時間後、蝸牛内に蛍光は認められない (a)。ローダミン含有 PLGA ナノパーティクルを蝸牛内に注入すると、蝸牛全体に蛍光が認められる (b)。ローダミン含有 PLGA ナノパーティクル正円窓膜上投与後、蝸牛殻室階に蛍光が認められた (c・d)。

ナノパーティクルを用いた場合、少なくともナノパーティクルが長期的に組織内あるいは細胞内にとどまらなければ、ナノパーティクルから徐放される薬物が投与されたことにはならない。したがって、ナノパーティクルの全身投与は、蝸牛への薬物投与方法としては有用ではないことが分かった。

次に、PLGA ナノパーティクルの内耳局所投与への応用について検討した。ナノパーティクル化したローダミン 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.25mL を浸透させたジェルフォームをモルモット正円窓膜上に留置し、投与 24 時間後のローダミン蛍光粒子の蝸牛内への移行を観察した。コントロールとして、ナノパーティクル化したローダミンを正円窓膜から蝸牛内に注入した組織と、通常のローダミンを含有したジェルフォームを正円窓膜上に留置した組織を用いた。蝸牛内に直接ナノパーティクル化したローダミンを注入した蝸牛では、基底回転から頂回転までの広い範囲で蛍光粒子が観察された (図14B)。蛍光粒子は蝸牛外リンパ腔に局在していた。通常のローダミンを正円窓膜上に留置した場合、ローダミン蛍光は全く観察されなかった (図14B)。投与 24 時間後にはローダミンは蝸牛から排出されていたと推察される。一方、ナノパーティクル化したローダミンを正円窓膜上に留置した蝸牛では、蝸牛基底回転から第2回転の鼓室階にローダミン蛍光粒子が観察された (図14B)。

これらの結果は、PLGA ナノパーティクルは蝸牛正円窓膜を通過することができることを示唆している。蝸牛内に移行した PLGA ナノパーティクルは受動的に拡散したと考えられるが、PLGA ナノパーティクルから放出されるさらに分子量の小さい粒子は、より広い範囲に拡散することが期待できる。すなわち、PLGA ナノパーティクルは、蝸牛外リンパ液への薬物徐放システムとして応用できることが分かった。

## 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

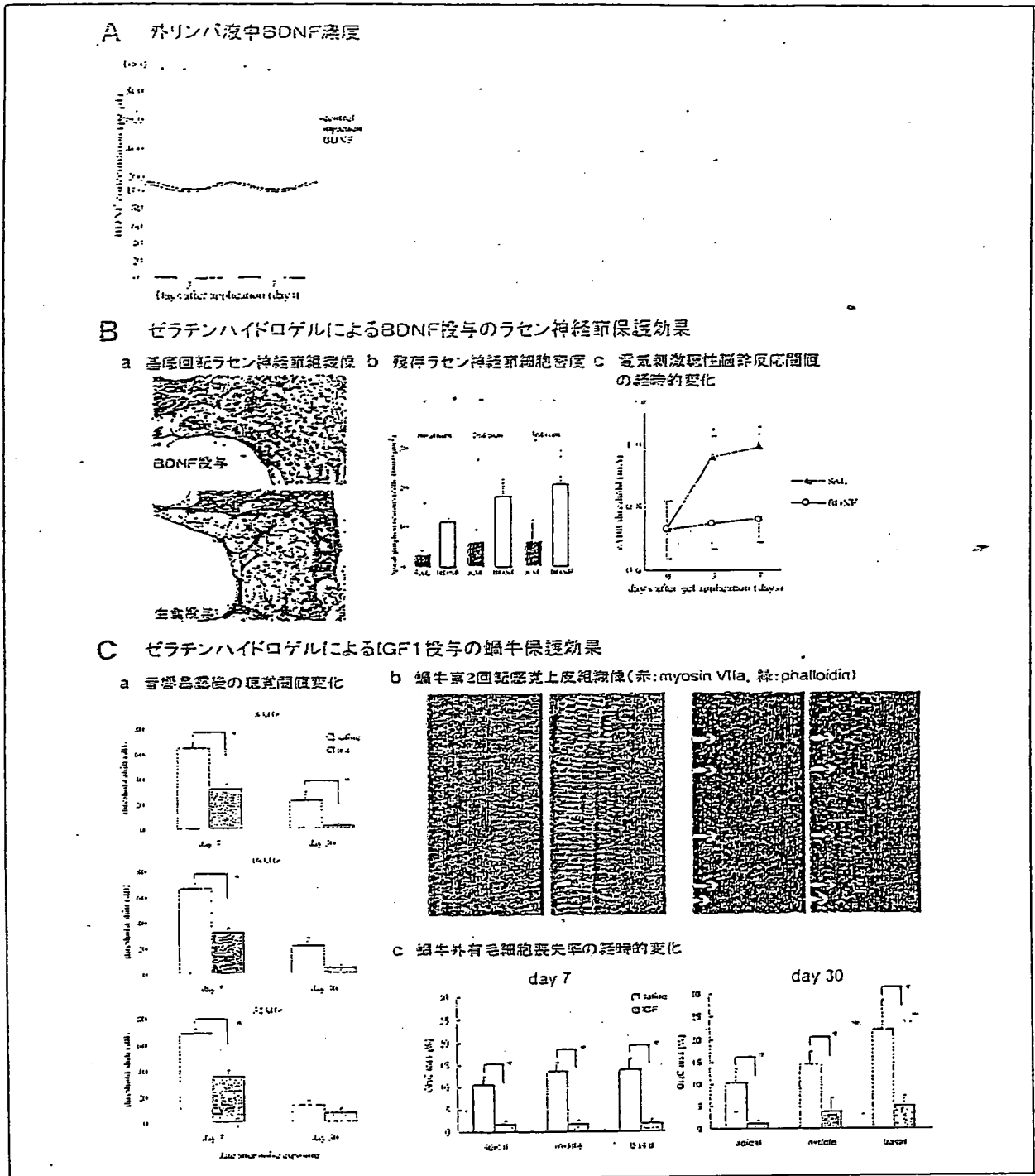
ゼラチンハイドロゲルは、コラーゲンとグル

タールアルデヒドの重合により形成されるゼラチンポリマーである。ゼラチンポリマーは、生体内で加水分解されるが、その分解速度は重合するグルタールアルデヒドの濃度によって制御される<sup>70)</sup>。ゼラチンポリマーは、正もしくは負の荷電を帯びさせることが可能であり、負に荷電した薬物の徐放には正に荷電したポリマー、正に荷電した薬物には負に荷電したポリマーを用い、薬物とポリマーは荷電により結合し、ゼラチンポリマーの分解により薬物が徐放される<sup>71)</sup>。この方法は水溶性の薬物の徐放に適しており、特に神経栄養因子や細胞成長因子などのタンパクやペプチドの徐放に用いることができることが特徴である。

薬物を投与する 30 分前にゼラチンハイドロゲルと混合するのみで、薬物とゼラチンポリマーの複合体が形成できる。この方法は、すでに血管再生を目的とした細胞成長因子の投与で臨床応用が行われている<sup>72)</sup>。非常に簡便な方法であり、毒性の問題もなく、安全性も高い方法である。われわれは内耳局所投与、特に神経栄養因子や細胞成長因子の投与に応用可能であると考えた。

ラセン神経節の生存促進作用が知られている<sup>73)</sup> BDNF を投与薬物とし、ゼラチンハイドロゲルを正円窓膜上に留置した場合の蝸牛外リンパ液中への移行について、モルモットを用い、ELISA 法にて解析した。コントロールとして、生食を浸透させたハイドロゲルを留置した蝸牛、正円窓膜から同用量の BDNF を直接注入した蝸牛を用い、投与 3、7 日後に蝸牛外リンパ液を採取し、BDNF の濃度を調べた。その結果、生食留置および直接注入例の蝸牛外リンパ液中にはごくわずかの BDNF しか認められなかったが、ハイドロゲルを正円窓上に留置した蝸牛では有意に高濃度の BDNF が検出された (図15A)。投与 3 日後で直接注入例の 30 倍、投与 7 日後では 100 倍以上の BDNF 濃度が、ハイドロゲルを用いて投与した蝸牛で認められた<sup>74)</sup>。以上の結果は、ゼラチンハイドロゲルが、経正円窓膜的に内耳に BDNF を投与

図15 ゼラチンハイドロゲルによる内耳薬物投与



A: BDNF をゼラチンハイドロゲルにて投与した場合 (BDNF), 生食投与した群 (control), BDNF を蝸牛内に注入した群 (injection) に比べて, 投与3, 7日後ともに有意に高濃度の BDNF が蝸牛外リンパ液中に検出された。

B: ゼラチンハイドロゲルによる BDNF 投与により, ラセン神経節細胞喪失が有意に抑制され (a・b), 機能低下も有意に抑制することができた (c)。

C: ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 投与により, 音響外傷による聴覚閾値上昇を有意に抑制することができ (a), 組織学的に蝸牛外有毛細胞の喪失を有意に抑制することができた (b・c)。

するシステムとして有用であることを示している。

次に、ゼラチンハイドロゲルを介して投与された BDNF が、内耳障害に対して保護効果を発揮しうるかを検討した。蝸牛有毛細胞喪失に伴うモルモットラセン神経節細胞の二次変性モデルを用いて、ゼラチンハイドロゲルを介した BDNF 投与の有効性を機能的、組織学的に解析した。機能解析は、eABR を用いた。BDNF 投与後の eABR 閾値を、生食を投与したコントロール群と比較した。生食投与群では投与 3, 7 日後に閾値の上昇が認められたが、BDNF 投与群では閾値上昇が有意に抑制されることが分かった (図 15B)。組織学的には、残存しているラセン神経節細胞密度を比較したが、蝸牛の各回転で、BDNF 投与群のラセン神経節細胞密度が有意に高いことが明らかとなった (図 15B)。つまり、ゼラチンハイドロゲルは、内耳への神経栄養因子や細胞成長因子などのタンパクやペプチドの徐放に応用できることが示されたわけである。

BDNF は、ラセン神経節細胞の生存促進作用の他にも、ラセン神経節細胞の神経伝達など聴覚に深く関与することが知られており、内耳障害治療薬として期待が持てるが、現時点では臨床に供されていない。われわれは、すでに臨床での使用が可能な細胞成長因子の一つであるインスリン様細胞成長因子 1 (Insulin-like growth factor 1: IGF1) に着目した。

実験モデルとして、ラット音響外傷モデルを用いた。BDNF での蝸牛外リンパ液への移行性実験から、投与 3 日後から 7 日後に高い BDNF 濃度が確認できたことにもとづき、音響暴露 3 日前に IGF1 を浸透させたゼラチンハイドロゲルをラット正円窓膜上に留置した。コントロールとしては、生食を浸透させたゲルを留置した蝸牛を用いた。音響外傷後の聴覚閾値の変化を ABR にて評価し、蝸牛感覚上皮の外有毛細胞の喪失率にて定量的に組織学的な評価を行った。音響暴露 7, 30 日後に ABR にて機能評価を行ったところ、7 日後では 8, 16, 32

kHz すべての周波数にて、IGF1 投与群で有意に閾値が低く、30 日後でも 8, 16kHz で有意に閾値が低いことが分かった (図 15C)。また、蝸牛頂、第 2、基底回転で外有毛細胞の喪失率を算出したところ、音響暴露 7, 30 日後ともに、有意の差を持って、IGF1 投与群で喪失率が低いことが判明した<sup>79)</sup>。以上の結果は、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 の内耳局所投与が音響外傷による機能障害、組織障害の防止に有効であることを示している。

これら一連の結果は、ゼラチンハイドロゲルを用いた内耳薬物投与方法の有効性を示すものといえる。現在、臨床応用に向けての最終段階にある。

### 3. 小 括

臨床応用できる内耳への薬物投与システム開発ができれば、これまでに蓄積された内耳障害治療に関する基礎的研究成果の臨床応用が可能になる。PLGA ナノパーティクルに関しては、ステロイドや遺伝子プラスミド投与への応用を検討している。

ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 投与については、今後、倫理委員会での最終検討をへて、臨床試験を開始すべく準備している。これまでに多くの神経栄養因子や細胞成長因子の内耳障害治療への可能性が基礎的に呈示されていることから、われわれの開発したゼラチンハイドロゲルを用いた内耳薬物投与方法は幅広く応用されることが期待できる。その他、われわれの行ってきた細胞移植のサポートシステムとしての応用についても、現在研究中である。

## V. 総 括

内耳に再生医療を応用する場合、目的の組織(細胞)の自発的な再生を促すのが最も自然な方向であると思われる。齧歯類での研究では障害を受けた内耳をこの方法で組織学的、機能的に再生することが可能であることを示した。今後、内耳の発生・再生に関連する遺伝子情報の詳細がさらに解明されれば、細胞(この場合は

残存している支持細胞など)を目的の細胞(この場合は有毛細胞やラセン神経節細胞)にさらに効率よく誘導することは可能である。また分裂を停止している細胞を増殖方向に向かわせることにより再生を促すことも可能である。

しかし、自発的再生を誘導するためには、内耳が完全に障害を受けていないことが条件となる。有毛細胞に分化しうる支持細胞などが残存している必要がある。再生能力を持つ細胞が残存していない場合には、細胞移植による内耳の再生が必要となる。

細胞移植を用いる内耳の再生医療も、すでに一部はサルを使った研究に移行しており、臨床応用に近づいてきた。今後は、より理想的な機能再生に向けた工夫、また移植により問題点が生じないかという検討が必要になる。再生した機能をさらに高めるためには、自然再生を誘導するのと同様な遺伝子情報による操作と、例えばある種の神経栄養因子などを移植細胞と同時に投与するなどの方法をとる必要があると推測される。このためにも栄養因子などを内耳に投与する適切な DDS の開発が必要となり、その目的はほぼ達せられたと思われる。

細胞移植による再生医療の問題点については以下のようなことが考えられる。まず、移植細胞に対する拒絶反応である。幸い内耳は他の臓器に比べ、血液内耳関門により隔てられた一種の免疫租界に近い環境にある。これまでわれわれは動物を使って研究をするにあたり、一般的には免疫抑制剤は使用していない。また、組織を観察する限り、明らかな免疫拒絶反応は起こしていない。この意味からも内耳は再生医療に関し有利な器官といえる。

他の問題は、移植細胞が目的とする細胞に分化しないだけでなく、腫瘍化しないかという問題である。特に、胚性幹細胞を移植細胞として用いる場合はこの腫瘍化は大きな問題となる。現在のところ、移植後3-4ヶ月の観察では腫瘍化の傾向はない。しかしこの点に関しては今後慎重な検討が必要である。また、再生医療、特に細胞移植を伴う場合には、倫理上の問題に

関しては十分に討議される必要がある。

最後に、内耳の再生医療が臨床応用までに必要な項目、今後のスケジュールにつき述べてみたい。

内耳再生プロジェクトは三つの柱からなる。① 移植細胞と移植技術の開発、② 内耳再生(発生)の基礎的(特に遺伝子のレベルでの)背景の解明、③ 移植に対する支援技術の開発である。

「移植細胞と移植技術の開発」に関してはほぼ達成されており、現在はサルを使った霊長類への研究を行っており、臨床応用も十分視野に入ってきた。内耳の発生・再生へのメカニズムに関しては十分とはいえないまでも一部は解明され、今後はそれをどのように応用するかという段階にある。「移植に対する支援技術」とは、内耳再生の効率を高めるべく神経栄養因子を含めた各種薬物の投与に関する研究である。本研究に関してはすでに技術的開発は終了しており、臨床的有効性の検討が次の課題である。

本研究の成果が多くの聴覚障害者、前庭機能障害者の福音になると確信する。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究に携わった多くの研究者、また協力を頂いた共同研究施設、共同研究者の方々に深く謝意を表します。

#### VI. 文 献

- 1) Ito J, Kojima K, Kawaguchi S: Survival of neural stem cells in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 121 (2): 140-142, 2001.
- 2) Kojima K, Tamura S, Nishida A, Ito J: Generation of inner ear hair cell immunophenotypes from neurospheres obtained from fetal rat central nervous system in vitro. *Acta Otolaryngol Suppl* 551: 26-30, 2004.
- 3) Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Endo T, Kim T, S. Dong Y, Kita T, Kojima K, Naito Y, Omori K, Ito J: Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl* 551: 43-47, 2004.

- 4) Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Tateya I, Endo T, Kim T S, Dong Y, Kita T, Kojima K, Naito Y, Omori K, Ito J: Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. *Acta Otolaryngol Suppl* 551: 65-68, 2004.
- 5) Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Kim T S, Endo T, Taniguchi Z, Naito Y, Ito J: Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuroreport* 14: 77-80, 2003.
- 6) Gage FH, Coates P W, Palmer T D, Kuhn H G, Fisher L J, Suhonen J O, Peterson D A, Suhr S T, Ray J: Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (25): 11879-11883, 1995.
- 7) Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim T S, Endo T, Yamada S, Kageyama R, Naito Y, Ito J: Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 14: 1677-1681, 2003.
- 8) Li H, Roblin G, Liu H, Heller S: Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (23): 13495-13500, 2003.
- 9) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa S I, Sasai Y: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ESCs by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28: 31-40, 2000.
- 10) Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, Muguruma K, Ikeya M, Nishiyama A, Arakawa A, Suemori H, Nakatsuji N, Kawasaki H, Murakami F, Sasai Y: Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (10): 5828-5833, 2003.
- 11) Kim T S, Nakagawa T, Kita T, Higashi T, Takebayashi S, Matsumoto M, Kojima K, Sakamoto T, Ito J: Neural connections between embryonic stem cell-derived neurons and vestibular hair cells in vitro. *Brain Res* 1057: 127-133, 2005.
- 12) Matsumoto M, Nakagawa T, Higashi T, Kim T S, Kojima K, Kita T, Sakamoto T, Ito J: Inner-  
vation of stem cell-derived neurons into auditory epithelia of mice. *Neuroreport* 16: 787-790, 2005.
- 13) Okano T, Nakagawa T, Endo T, Kim T S, Kita T, Tamura T, Matsumoto M, Ohno T, Sakamoto T, Iguchi F, Ito J: Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *Neuroreport* 16: 1919-1922, 2005.
- 14) Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin K A, Swiderski D L, Dolan D F, Brough D E, Raphael Y: Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 11 (3): 271-276, 2005.
- 15) Endo T, Nakagawa T, Kita T, Iguchi F, Kim T S, Tamura T, Iwai K, Tabata Y, Ito J: A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 115: 2016-2020, 2005.
- 16) Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, Mitsui T, Manabe A, Tanaka R, Kobayashi K, Ito M, Yasukawa K, Nakahata T: Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 105 (7): 1013-1021, 2000.
- 17) Iwai H, Lee S, Inaba M, Sugiura K, Tomoda K, Yamashita T, Ikehara S: Prevention of accelerated presbycusis by bone marrow transplantation in senescence-accelerated mice. *Bone Marrow Transplant* 28 (4): 323-328, 2001.
- 18) Yagihashi A, Sekiya T, Suzuki S: Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) protects spiral ganglion neurons following auditory nerve injury: morphological and functional evidence. *Exp Neurol* 192 (1): 167-177, 2005.
- 19) Awad H A, Butler D L, Boivin G P, Smith F N, Malaviya P, Huijbregtse B, Caplan A I: Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5: 267-277, 1999.
- 20) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, Kim T S, Hiratsuka Y, Tamura T, Kanemaru S, Shimizu Y, Ito J: Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport*

- 15: 1-4, 2004.
- 21) Dezawa M, Hoshino M, Ide C: Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons. *Expert Opin Biol Ther* 5 (4): 427-435, 2005.
- 22) Xia A, Kikuchi T, Hozawa K, Katori Y, Takasaka T: Expression of connexin 26 and Na<sup>+</sup>-K-ATPase in the developing mouse cochlear lateral wall: functional implications. *Brain Res* 846 (1): 106-111, 1999.
- 23) Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini L, Eybalin M, Wu T, Marcus DC, Wangemann P, Willecke K, Petit C: Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol* 12 (13): 1106-1111, 2002.
- 24) Kusunoki T, Cureoglu S, Schachern P A, Baba K, Kariya S, Paparella M M: Age-related histopathologic changes in the human cochlea: a temporal bone study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131: 897-903, 2004.
- 25) Spicer S S, Schulte B A: Spiral ligament pathology in quiet-aged gerbils. *Hear Res* 172: 172-185, 2002.
- 26) Sharif S, Nakagawa T, Ohno T, Matsumoto M, Kita T, Ito J: Bone marrow stromal cells: a source for regeneration of gap junction networks in the mouse cochlear connective tissue. (submitted)
- 27) Udani V M: The continuum of stem cell trans-differentiation: possibility of hematopoietic stem cell plasticity with concurrent CD45 expression. *Stem Cells Dev* 15 (1): 1-3, 2006.
- 28) Kita T, Nakagawa T, Okano T, Kada S, Yoshimoto M, Nakahata T, Ito J: Distribution and roles of bone marrow-derived cells in the mouse cochlea. (submitted)
- 29) Streit W J: Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 48 (2): 234-239, 2005.
- 30) Tzeng S F, Huang H Y: Downregulation of inducible nitric oxide synthetase by neurotrophin-3 in microglia. *J Cell Biochem* 90 (2): 227-233, 2003.
- 31) Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough D E, Raphael Y: Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci* 23 (11): 4395-4400, 2003.
- 32) Nance W E: The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 9 (2): 109-119, 2003.
- 33) 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*. (in print)
- 34) Roberson D W, Rubel E W: Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *Am J Otol* 15: 28-34, 1994.
- 35) Chen P, Segil N: p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 126: 1581-1590, 1999.
- 36) Lowenheim H, Furness D N, Kil J, Zinn C, Gultig K, Fero M L, Frost D, Gummer A W, Roberts J M, Rubel E W, Hackney C M, Zenner H P: Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4084-4088, 1999.
- 37) Dong Y, Nakagawa T, Endo T, Kim T S, Iguchi F, Yamamoto N, Naito Y, Ito J: Role of the F-box protein Skp2 in cell proliferation in the developing auditory system in mice. *Neuroreport* 14: 759-761, 2003.
- 38) Lee Y S, Liu F, Segil N: A morphogenetic wave of p27Kip1 transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development. *Development*: 2006. (in print)
- 39) Torchinsky C, Messana E P, Arsuru M, Cotanche D A: Regulation of p27Kip1 during gentamicin mediated hair cell death. *J Neurocytol* 28 (10-11): 913-924, 1999.
- 40) Sage C, Huang M, Karimi K, Gutierrez G, Vollrath M A, Zhang D S, Garcia-Anoveros J, Hinds P W, Corwin J T, Corey D P, Chen Z Y: Proliferation of functional hair cells in vivo in the absence of the retinoblastoma protein. *Science* 307 (5712): 1114-1118, 2005.
- 41) Mantela J, Jiang Z, Ylikoski J, Fritsch B, Zacksenhaus E, Pirvola U: The retinoblastoma gene pathway regulates the postmitotic state

- of hair cells of the mouse inner ear. *Development* 132 (10): 2377-2388, 2005.
- 42) Sage C, Huang M, Vollrath M A, Brown M C, Hinds P W, Corey D P, Vetter D E, Chen Z Y: Essential role of retinoblastoma protein in mammalian hair cell development and hearing. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (19): 7345-7350, 2006.
- 43) Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann B G, Kemler R: Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59: 3-10, 1996.
- 44) Tetsu O, McCormick F: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422-426, 1999.
- 45) Léonova E V, Raphael Y: Organization of cell junctions and cytoskeleton in the reticular lamina in normal and ototoxically damaged organ of Corti. *Hear Res* 113: 14-28, 1997.
- 46) Whitlon D S, Zhang X, Pecelunas K, Greiner M A: A temporospatial map of adhesive molecules in the organ of Corti of the mouse cochlea. *J Neurocytol* 28: 955-968, 1999.
- 47) Takebayashi S, Nakagawa T, Kojima K, Kim T S, Kita T, Dong Y, Endo T, Iguchi F, Naito Y, Omori K, Ito J: Expression of  $\beta$ -catenin in developing auditory epithelia of mice. *Acta Otolaryngol Suppl* 551: 18-21, 2004.
- 48) Takebayashi S, Nakagawa T, Kojima K, Kim T S, Endo T, Iguchi F, Kita T, Yamamoto N, Ito J: Nuclear translocation of beta-catenin in developing auditory epithelia of mice. *Neuroreport* 16: 431-434, 2005.
- 49) Matsuda M, Keino H: Roles of beta-catenin in inner ear development in rat embryos. *Anat Embryol (Berl)* 202: 39-48, 2000.
- 50) Ohyama T, Mohamed O A, Taketo M M, Dufort D, Groves A K: Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development* 133 (5): 865-875, 2006.
- 51) Kim T S, Nakagawa T, Lee J E, Fujino K, Iguchi F, Endo T, Naito Y, Omori K, Lefebvre P P, Ito J: Induction of cell proliferation and  $\beta$ -catenin expression in rat utricles in vitro. *Acta Otolaryngol Suppl* 551: 22-25, 2004.
- 52) Novak A, Hsu S C, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S: Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4374-4379, 1998.
- 53) Huelsken J, Birchmeier W: New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 11: 547-553, 2001.
- 54) Nelson W J, Nusse R: Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303: 1483-1487, 2004.
- 55) Nakagawa T, Kim T S, Murai N, Endo T, Iguchi F, Tateya I, Yamamoto N, Naito Y, Ito J: A novel technique for inducing local inner ear damage. *Hear Res* 176: 122-127, 2003.
- 56) Kim T S, 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* 205: 201-209, 2005.
- 57) Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter E H, Kopan R, Israel A: Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377: 355-358, 1995.
- 58) Kato H, Sakai T, Tamura K, Minoguchi S, Shirayoshi Y, Hamada Y, Tsujimoto Y, Honjo T: Functional conservation of mouse Notch receptor family members. *FEBS Lett* 395: 221-224, 1996.
- 59) Lanford P J, Lan Y, Jiang R, Lindsell C, Weinmaster G, Gridley T, Kelley M W: Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* 21: 289-292, 1999.
- 60) Birmingham N A, Hassan B A, Price S D, Vollrath M A, Ben-Arie N, Eatock R A, Bellen H J, Lysakowski A, Zoghbi H Y: Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284: 1837-1841, 1999.
- 61) Zheng J L, Gao W Q: Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat Neurosci* 3: 580-586, 2000.



- 62) Yamamoto N, Tanigaki K, Tsuji M, Yabe D, Ito J, Honjo T: Inhibition of Notch/RBP-J signaling induces hair cell formation in neonate mouse cochleas. *J Mol Med* 84: 37-45. 2006.
- 63) Mizutani T, Taniguchi Y, Aoki T, Hashimoto N, Honjo T: Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9026-9031. 2001.
- 64) Gale JE, Meyers JR, Periasamy A, Corwin JT: Survival of bundleless hair cells and subsequent bundle replacement in the bullfrog's sacculle. *J Neurobiol* 50 (2): 81-92. 2002.
- 65) Zheng JL, Keller G, Gao WQ: Immunocytochemical and morphological evidence for intracellular self-repair as an important contributor to mammalian hair cell recovery. *J Neurosci* 19 (6): 2161-2170. 1999.
- 66) Forge A: Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear Res* 19 (2): 171-182. 1985.
- 67) Taura A, Kojima K, Ito J, Ohmori H: Recovery of hair cell function after damage induced by gentamicin in organ culture of rat vestibular maculae. *Brain Res.* (in print)
- 68) Juhn SK, Hunter BA, Odland RM: Blood-labyrinth barrier and fluid dynamics of the inner ear. *Int Tinnitus J* 7: 72-83. 2001.
- 69) Arnold W, Senn P, Hennig M, Michaelis C, Deingruber K, Scheler R, Steinhoff H J, Riphagen F, Lamm K: Novel slow- and fast-type drug release round-window microimplants for local drug application to the cochlea: An experimental study in guinea pigs. *Audiol Neurootol* 10: 53-63. 2005.
- 70) Ishihara T, Izumo N, Higaki M, Shimada E, Hagi T, Mine L, Ogawa Y, Mizushima Y: Role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile. *J Control Release* 105: 68-76. 2005.
- 71) Higaki M, Ishihara T, Izumo N, Takatsu M, Mizushima Y: Treatment of experimental arthritis with poly(D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Ann Rheum Dis* 64: 1132-1136. 2005.
- 72) 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* 115: 2000-2005. 2005.
- 73) Tabata Y, Miyao M, Ozeki M, Ikada Y: Controlled release of vascular endothelial growth factor by use of collagen hydrogels. *J Biomater Sci Polym Ed* 11: 915-930. 2000.
- 74) Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y: Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 24: 4375-4383. 2003.
- 75) Iwakura A, Fujita M, Kataoka K, Tambara K, Sakakibara Y, Komeda M, Tabata Y: Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart Vessels* 18: 93-99. 2003.
- 76) Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, Pyykko I, Olivius NP, Kaksonen R, Lindstrom B, Altschuler R, Miller JM: Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1657-1660. 2002.
- 77) Nakaizumi T, Kawamoto K, Minoda R, Raphael Y: Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects SGNs from ototoxic damage. *Audiol Neurootol* 9: 135-143. 2004.
- 78) 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* 116: 526-533. 2006.

Regenerative Medicine for Inner Ear Diseases

Juichi Ito<sup>1</sup>, Takayuki Nakagawa<sup>1</sup>, Norio Yamamoto<sup>2</sup>

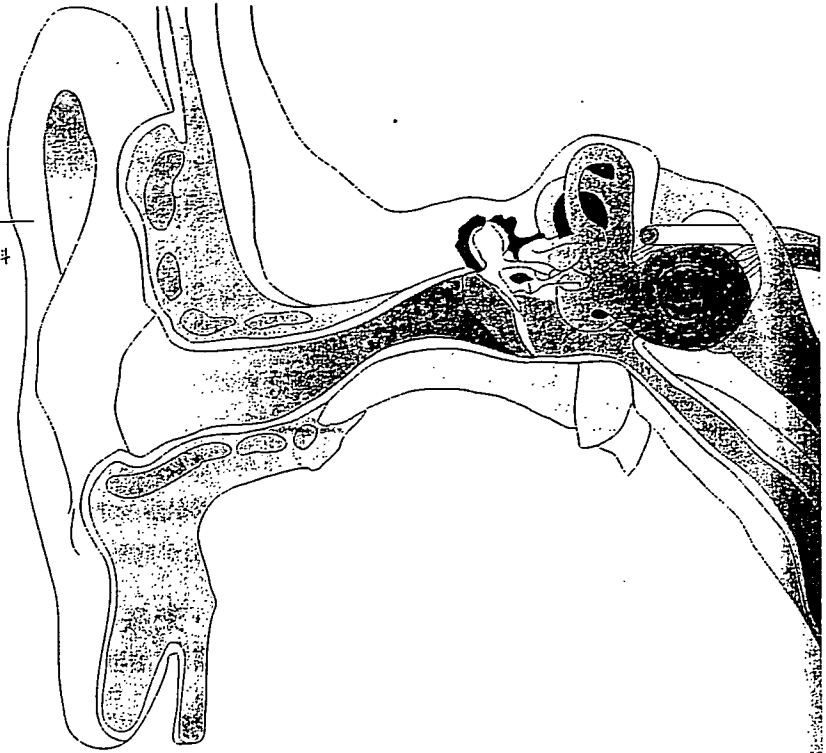
<sup>1</sup> Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery,  
Graduate School of Medicine, Kyoto University

<sup>2</sup> Department of Medical Chemistry and Molecular Biology,  
Graduate School of Medicine, Kyoto University

# 内耳再生の ストラテジー

●中川隆之 京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

内耳は、聴覚と平衡感を司る感覚器であり、側頭骨内に存在する骨で囲まれた器官である。哺乳類の場合、内耳の感覚細胞である有毛細胞や1次ニューロンであるラセン神経節細胞は、再生能力に乏しい。このため一度これらの細胞が障害を受けると感音障害が残る。発生学や分子生物学的な知見を利用して、これらの細胞を再生させようという試みが進められている。



## 内耳の解剖とその生理機能

内耳は、その複雑な形態から解剖学用語で「迷路」とよばれる。骨で囲まれた空間を骨迷路、その内部にある膜で囲まれた空間を膜迷路という。膜迷路は、リンパ液で満たされており、膜様の構造物で内リンパ腔と外リンパ腔に隔てられている。

聴覚を司る蝸牛と平衡感を担当する前庭は、それぞれ特徴的な構造をもった感覚上皮を有し、それらには特有の感覚細胞である有毛細胞

が存在する。有毛細胞は、音響刺激などの機械的刺激を神経刺激に変換し、おのこの1次神経節細胞に刺激を伝達する。このシグナルは第8脳神経を介して脳幹に伝えられる。脳幹で2次ニューロンに刺激が伝えられ、中枢に伝達され

図1  
内耳障害のメカニズム  
図は蝸牛の断面。内耳障害には主に①-③の原因が考えられる。

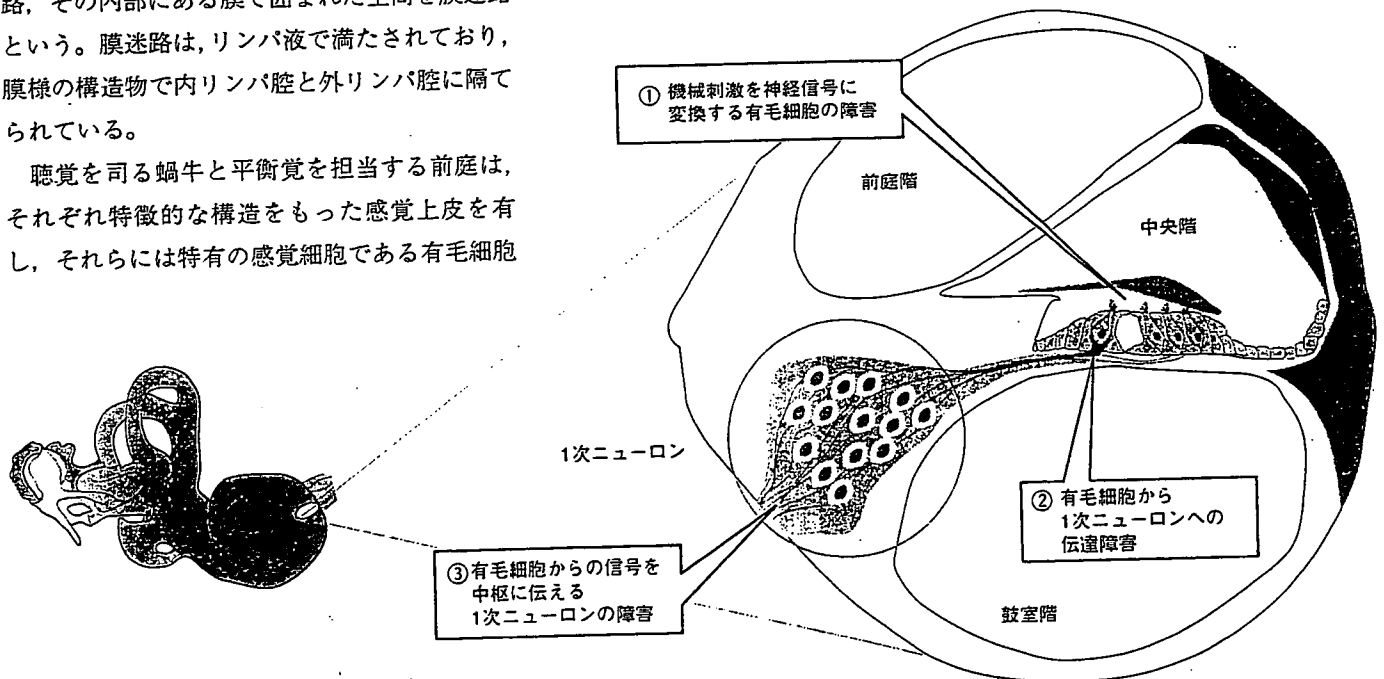
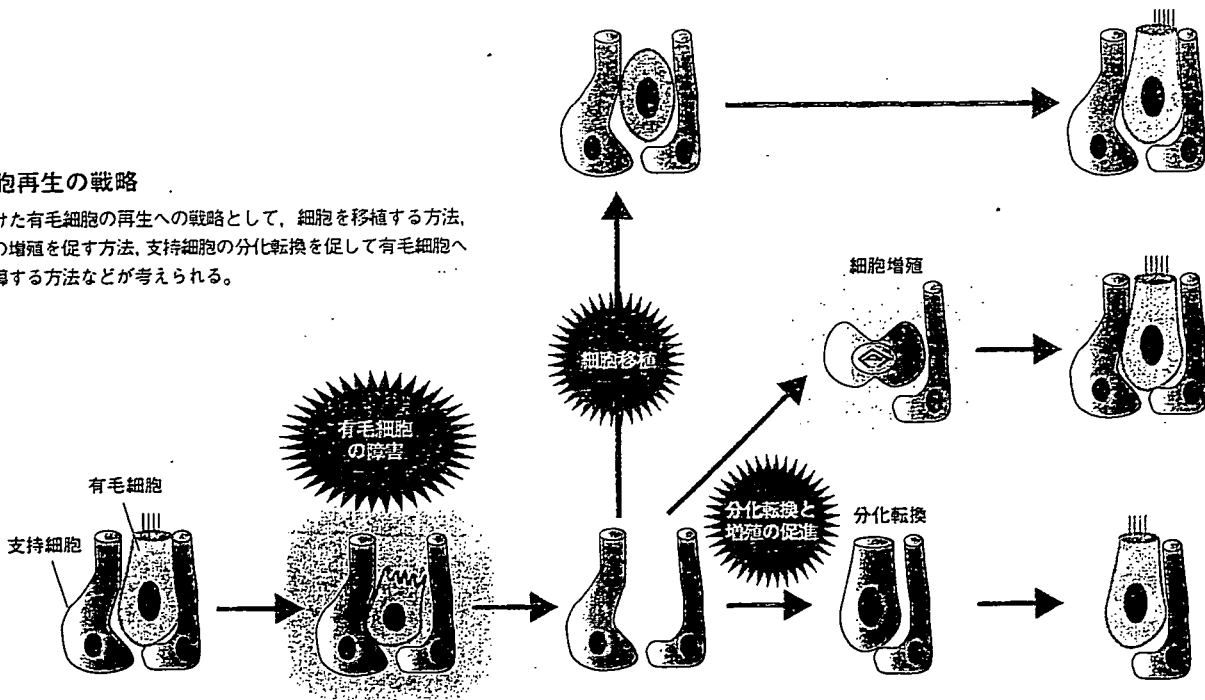


図2

有毛細胞再生戦略

障害を受けた有毛細胞の再生への戦略として、細胞を移植する方法、支持細胞の増殖を促す方法、支持細胞の分化転換を促して有毛細胞へと分化誘導する方法などが考えられる。



る。蝸牛における1次ニューロンは、ラセン神経節細胞とよばれ、蝸牛の軸にあたる部分にらせん状に配列している。

内耳障害と再生の標的

感音難聴に代表される内耳障害は、音響刺激などの機械的刺激を神経信号に変換する有毛細胞障害、有毛細胞から1次ニューロンへの伝達障害、有毛細胞からの信号を中枢に伝える1次ニューロンの障害が主因と考えられている(図1)。鳥類では、有毛細胞が再生し、機能も回復することが知られているが<sup>(1,2)</sup>、哺乳類では、有毛細胞やラセン神経節細胞は、再生しない、あるいは、ごく限られた再生能力しかもたないとされている。

有毛細胞から1次ニューロンへの伝達障害としては、強大音響暴露後の一時的な聴覚障害のメカニズムがよく知られている<sup>(3)</sup>。これは可逆性であるが、ほかの障害機構は一般的に不可逆である。平衡覚を司る前庭系では、末梢性の障害は中枢で代償されて、機能障害の多くは回復するが、聴覚系では恒久的な感音難聴が残る。このような背景から、内耳における再生研究は、蝸牛有毛細胞、ラセン神経節細胞(1次ニューロン)を中心に展開してきた。

内在性細胞による再生

鳥類では、有毛細胞消失後、隣接する支持細胞が分裂、増殖し、一部が有毛細胞へと分化することによって、有毛細胞が再生されることが報告されている<sup>(1,2)</sup>。哺乳類でも鳥類と同様に支持細胞の分裂を誘導し、有毛細胞を再生しようという試みがなされている。また、残存している支持細胞を分化転換させて有毛細胞を再生させる方法も研究されている。この方法は、発生段階における有毛細胞への分化運命決定機構の知見を応用している。以上は、内耳に内在する細胞を用いて、有毛細胞を再生しようとするものであるが、外部から再生能力がある細胞を内耳に移植し、再生を誘導するという方法も研究されている(図2)。

① p27 と skp2 による細胞増殖と分化制御機構

哺乳類における支持細胞増殖誘導の手段としては、増殖活性を高める方法と増殖を停止させている機構を解除する方法が考えられる。内耳の発生段階における細胞増殖制御機構の分子生物学的な知見から、後者の方向性、すなわち増殖を停止させるシグナルを解除する方法が有効と考えられている。

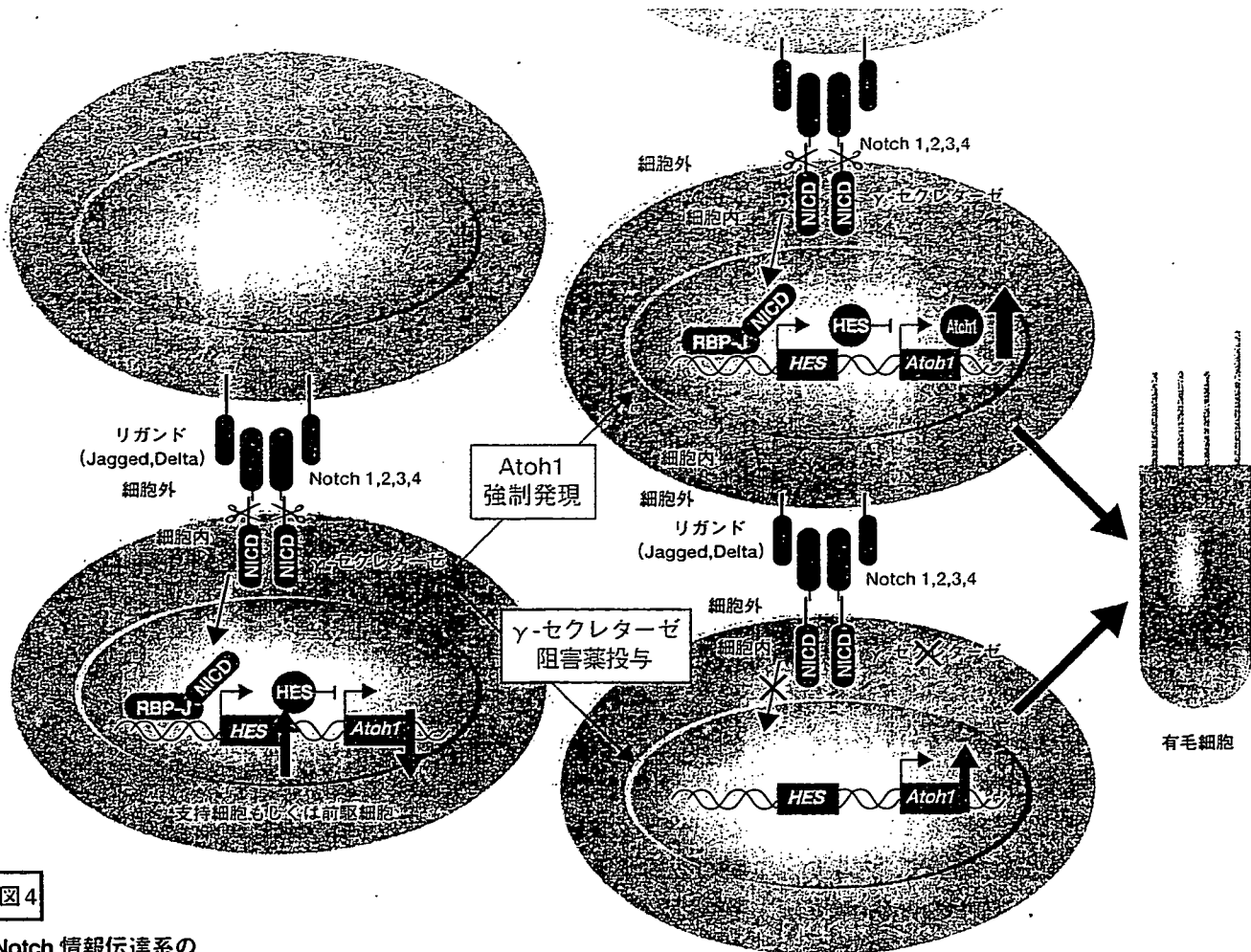


図 4

**Notch 情報伝達系のコントロールによる有毛細胞再生**

Notch 情報伝達系に関連する転写因子である Atoh1 の強制発現、あるいは  $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬による Notch 情報伝達系抑制、これら二つの方法で支持細胞から有毛細胞への分化転換を誘導できる。

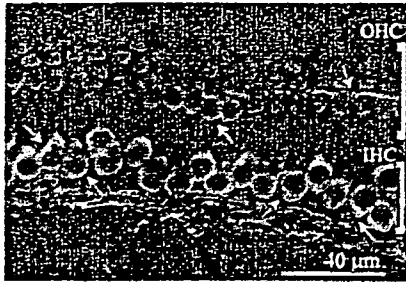
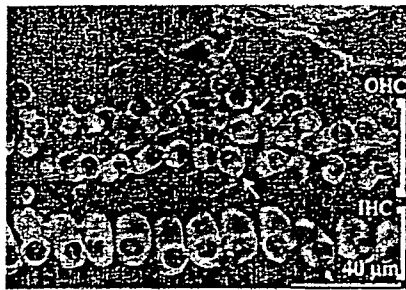
が報告され<sup>(13)</sup>、さらに機能回復が期待できることが示唆され<sup>(14)</sup>、有毛細胞再生への有望なストラテジーとして脚光をあびている。 $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬による Notch 情報伝達系の抑制でも(図4)、相対的な Atoh1 発現の上昇がみとめられ、同様の結果が得られることが器官培養系の実験で示されている<sup>(15)</sup>。薬物による伝達系の抑制は、遺伝子導入に比べてより臨床に近い手法であり、今後の研究発展による臨床応用が期待できる。最近の報告では、*in vivo*でも効果は限られるものの、薬物による Notch 情報伝達系の抑制によって有毛細胞の新生が誘導されることが観察されている<sup>(16)</sup>。

**細胞移植による再生**

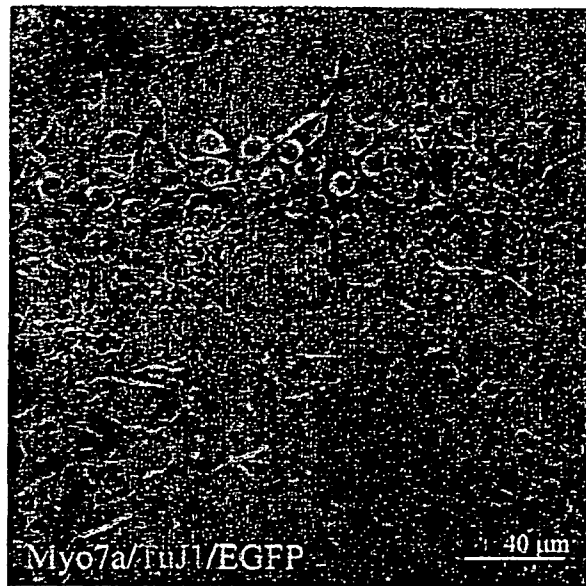
種々の幹細胞の発見とその能力が明らかにされるにしたがい、細胞移植が内耳再生でも応用され始めた。最初の内耳への細胞移植実験は、内耳と同じ外胚葉系の幹細胞である神経幹細胞

を用いたものである<sup>(17)</sup>。有毛細胞障害を惹起した内耳に神経幹細胞を移植すると、内耳組織内に移植細胞の侵入を示唆する所見がみとめられた。また、ごく限られてはいるが、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ミオシン7aを発現している所見がみとめられた<sup>(18)</sup>。この結果は、神経幹細胞は障害を受けた内耳感覚上皮には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するものとして内外の注目を集めた。

しかしながら、機能面を論ずるレベルまで、ミオシン7a陽性の移植細胞数を増やすことは困難であった。ほかの細胞、内耳組織由来の細胞<sup>(19)</sup>や胚性幹細胞由来の細胞移植<sup>(20)</sup>でも、感覚上皮内に移植細胞が侵入し、有毛細胞様の細胞に分化することが報告されているが、機能再生をみとめた報告はない。いかに、有毛細胞や支持細胞といった感覚上皮特有の細胞に効率



蝸牛



前庭

図5

ES細胞由来神経細胞を用いた1次ニューロンへの分化誘導

ES細胞由来神経細胞(EGFPにより緑色に標識)は蝸牛および前庭感覚上皮と共培養すると、有毛細胞(Myo 7a: ミオシン 7aにより青色で標識)に向かって神経突起(Tuj1により赤色で標識)を伸長する。OHC: 蝸牛外有毛細胞, IHC: 蝸牛内有毛細胞を示す。

よく分化する細胞を開発するか、また、移植した細胞をいかにして感覚上皮内へと誘導するかが、解決すべき問題点として残されている。

内耳障害に対する再生医学研究で、内耳有毛細胞が主役であることに異論はないが、聴覚刺激を中枢に送るラセン神経節細胞も重要なターゲットの一つである。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、人工内耳を埋め込んでもラセン神経節細胞に障害がある場合、良好な聞き取りは得られない。細胞移植によって、ラセン神経節細胞が再生すれば、人工内耳での聞き取りも向上すると期待される。このような臨床的背景に加え、神経細胞は種々の細胞から比較的分化誘導しやすいことから、細胞移植によるラセン神経節細胞再生実験は数多くおこなわれている。神経幹細胞の移植では、移植細胞の蝸牛軸や内耳道での生着および神経細胞への分化が報告されている<sup>(21,23)</sup>。しかし分化効率は低く、さらに機能的な解析はなされていない。背側神経節細胞由来の細胞株の移植実験もおこなわれていたが、組織学的な解析にとどまっている<sup>(24)</sup>。

高率に神経細胞に分化する移植細胞が望ましいとの発想から、胚性幹細胞(ES細胞)が目玉された。ES細胞では、高率に神経細胞へと分

化誘導する方法が確立されており、*in vitro, in vivo*での移植実験がいくつかおこなわれている。いずれの実験系でも移植細胞由来の神経細胞の局在が、元々ラセン神経節細胞あるいは蝸牛神経が存在する部位で確認されている<sup>(25,26)</sup>。機能的な側面としては、*in vitro*での解析であるが、内耳有毛細胞との間にシナプスを形成する能力があることを示す所見も得られている<sup>(27,28)</sup>(図5)。もっとも注目すべき点としては、*in vivo*の移植実験で機能回復を示唆する所見がみとめられているという点である。

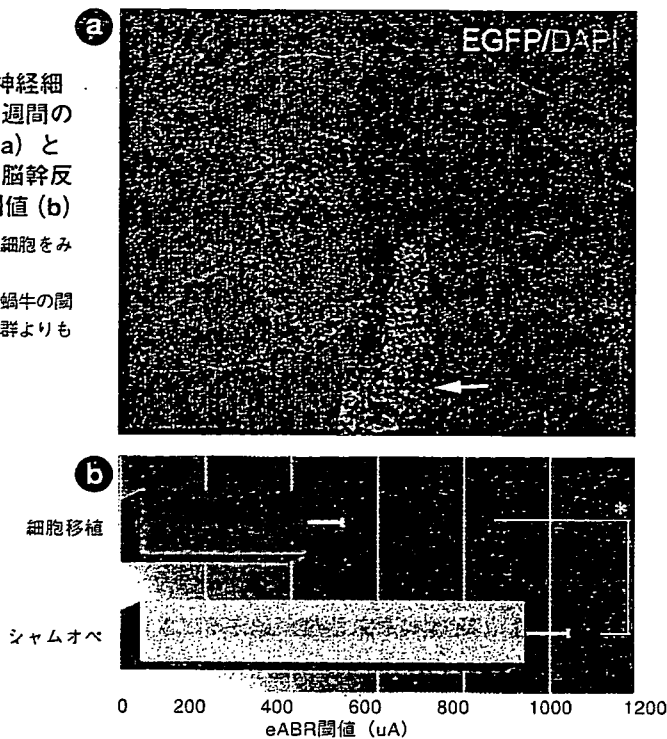
SDIA法<sup>\*2(29)</sup>を用いて神経細胞へ分化誘導したマウスES細胞を、ラセン神経節変性をあらかじめ誘導したモルモットに移植し、4週間後に、電気刺激聴性脳幹反応にて機能評価したところ、コントロールとしたシャムオペ(偽手術)群よりも有意に機能が回復していることがみとめられた(図6)。組織学的にも、移植細胞由来神経細胞の蝸牛軸での局在が確認されている<sup>(30)</sup>。その後の追加実験で、ES細胞由来の神経細胞を移植した動物では、経時的に電気刺激聴性脳幹反応の閾値が改善するのに対して、シャムオペをおこなった動物では明らかな改善傾向がみとめられないことを確認しており、ES細胞由来神経細胞移植は蝸牛機能再生に寄与すると考

\*2 stromal cell-derived inducing activity  
マウス骨髄細胞由来のストローマ細胞であるPA6細胞とES細胞を共存培養し、高い確率で神経細胞分化を誘導する方法。

図6

ES細胞由来神経細胞の移植後4週間の蝸牛組織像(a)と電気刺激聴性脳幹反応(eABR)閾値(b)

(a) 蝸牛軸に移植細胞をみとめる(矢印)。  
(b) 移植を受けた蝸牛の閾値は、シャムオベ群よりも有意に低い(\*).



えられる。今後、移植細胞由来神経細胞が直接的に機能回復に寄与しているのか、栄養因子の供給などの間接的な効果なのか検証が求められる。

### 今後の展開

内耳に再生医療を応用する場合、目的の組織(細胞)の自発的な再生を促すのがもっとも自然な方向であると思われる。今後、内耳の発生・再生に関連する遺伝子についての解明がさらに進み、臨床応用可能な遺伝子導入法が開発されれば、内在する細胞による再生研究は、大きく進展すると思われる。しかし、自発的な再生を誘導するためには内耳が完全に障害を受けていないことが条件となる。たとえば、有毛細胞に分化しうる支持細胞などが残存している必要がある。再生能力をもつ細胞が残存していない場合には、細胞移植が必要となる。

細胞移植による内耳再生に関しては、ラセン神経節細胞の再生が臨床応用にもっとも近い段階にあると考えられ、今後の展開として二つの方向性が考えられる。一つは、ES細胞をソ

ースとした移植研究がサルES細胞での研究を経て、ヒトES細胞に進むという方向性である。ES細胞はほかの幹細胞に比べて、均一な性質をもつ細胞を大量に準備することが可能で、ラセン神経節細胞再生に関しても現在のところもっとも能力の高い細胞といえる。

しかし、日本では、ヒトES細胞を使用した研究承認へのハードルはきわめて高く、将来の臨床応用に関しては、まったく予想ができないのが現状である。したがって、もう一つの展開として、ES細胞をソースとした研究で得られた成果をほかの自己由来細胞で実現しようとする方向性が考えられる。骨髄や脂肪組織由来の間葉系細胞がこのような研究開発の主役になると推測される。一方で、線維芽細胞からES細胞と同様の性質をもった細胞を作製することも報告されている<sup>(31)</sup>。自己由来細胞からES細胞様の細胞を作ることが可能となれば、大きく展開は変わる可能性がある。

### Profile

なかがわ・たかゆき

1989年大阪市立大学医学部卒業、1995年同大学院医学研究科修了、内耳有毛細胞再生研究にて、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、内耳再生および保護に関する基礎的研究およびトランスレーショナル研究をおこなっている。内耳細胞移植、内耳薬物投与システム開発が中心的研究テーマ。

#### 参考文献

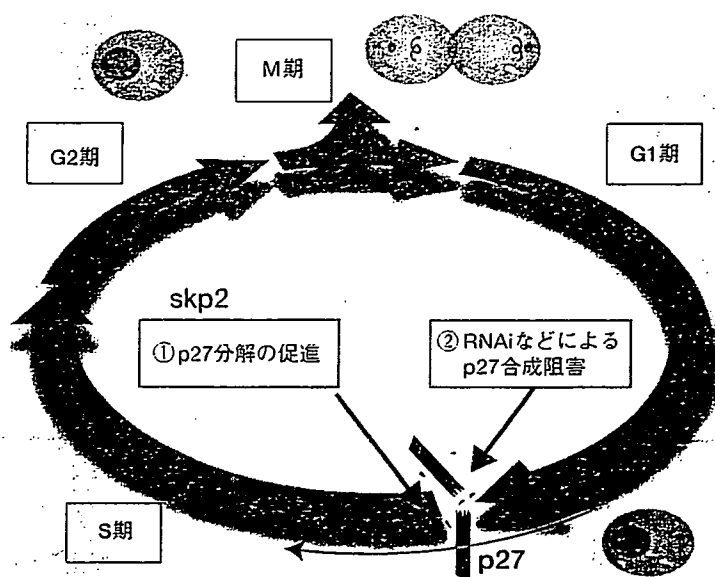
- [1] Corwin JT & Cotanche DA : Science 240 (1988) 1772-1774
- [2] Ryals BM & Rubel EW : Science 240 (1988) 1774-1776
- [3] Puel JL et al : J Comp Neurol 341(1994) 241-256
- [4] Chen P & Segil N : Development 126 (1999) 1581-1590
- [5] Lowenheim H et al : Proc Natl Acad Sci USA 96 (1999) 4084-4088
- [6] Dong Y et al : Neuroreport 14 (2003) 759-761
- [7] Lee YS et al : Development 133 (2006) 2817-2826
- [8] Sage C et al : Science 307 (2005) 1114-1118
- [9] Mantela J et al : Development 132 (2005) 2377-2388
- [10] Sage C et al : Proc Natl Acad Sci USA 103 (2006) 7345-7350
- [11] Lanford PJ et al : Nat Genet 21(1999) 289-292
- [12] Birmingham NA et al : Science 284 (1999) 1837-1841
- [13] Kawamoto K et al : J Neurosci 23 (2003) 4395-4400
- [14] Izumikawa M et al : Nat Med 11(2005) 271-276
- [15] Yamamoto N et al : J Mol Med 84 (2006) 37-45
- [16] Hori R et al : Abstracts of the 30th Annual Mid Winter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology (2007)
- [17] Ito J et al : Acta Otolaryngol 121 (2001) 140-142
- [18] Tateya I et al : Neuroreport 14 (2003) 1677-1681
- [19] Kim TS et al : Acta Otolaryngol Suppl 551 (2004) 34-38
- [20] Li H et al : Proc Natl Acad Sci USA 100 (2003) 13495-13500
- [21] Iguchi F et al : Neuroreport 14 (2003) 77-80
- [22] Tamura T et al : Acta Otolaryngol Suppl 551 (2004) 65-68
- [23] Hu Z et al : Exp Cell Res 302 (2005) 40-47
- [24] Hu Z et al : Brain Res 1026 (2004) 68-73
- [25] Corrales CE et al : J Neurobiol 66 (2006) 1489-1500
- [26] Sekiya T et al : Exp Neurol 198 (2006) 12-24
- [27] Matsumoto M et al : Neuroreport 16 (2005) 787-790
- [28] Kim TS et al : Brain Res 1057 (2005) 127-133
- [29] Kawasaki H et al : Neuron 28 (2000) 31-40
- [30] Okano T et al : Neuroreport 16 (2005) 1919-1922
- [31] Takahashi K & Yamanaka S : Cell 126 (2006) 663-676

支持細胞の増殖停止機構として、細胞周期を抑制するサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質である p27 の役割がもっとも注目されている。蝸牛感覚上皮で p27 は、発生後期から支持細胞に選択的に発現している<sup>(4)</sup>。また p27 ノックアウトマウスでは、生後も支持細胞の増殖が継続することが示されている<sup>(5)</sup>。したがって、生後の蝸牛感覚上皮においても支持細胞の p27 の発現を抑制することができれば、支持細胞が再び分裂、増殖する可能性がある。

p27 の発現制御メカニズムとしては、p27 遺伝子からの転写、翻訳レベルと p27 タンパク質の細胞内での分解レベルの二つがある (図3)。後者のメカニズムにかかわるのが、F ボックスタンパク質の一つである skp2 である。skp2 は p27 のユビキチン化に関与し、skp2 などの働きでユビキチンを付加された p27 はプロテアソームにて分解される。

発達段階に応じてマウス内耳感覚上皮での skp2 の発現変化を組織学的に解析すると、マウス内耳感覚上皮予定領域での細胞増殖が盛んな胎生期 12 日目までは、内耳感覚上皮予定領域で強い発現がみとめられ、p27 が内耳感覚上皮予定領域に発現すると同時に skp2 の発現は消失する<sup>(6)</sup>。つまり、内耳感覚上皮での p27 の発現制御に skp2 が関与していると考えられる。一方、内耳感覚上皮で有毛細胞、支持細胞への分化運命が決定されるタイミングにおいては、p27 の発現は支持細胞だけに限定され、有毛細胞では消失する。この有毛細胞での p27 の発現の消失に skp2 は関与していない<sup>(6)</sup>。すなわち、有毛細胞では、遺伝子からの転写レベルよりも上流で p27 の発現が制御されている。

最近、転写レベルでの p27 発現制御が、とくに有毛細胞への分化調節で重要な役割を果たすことが報告されている<sup>(7)</sup>。成熟した内耳感覚上皮支持細胞での p27 発現抑制には、skp2 過剰発現によるタンパク質分解の促進もしくは RNA 干渉による翻訳の抑制が有効な手段と推察される。しかし、細胞周期にリエントリーすること



は、細胞死の誘導につながる可能性もあり、今後の検討が注目される。また、内耳感覚上皮の細胞増殖制御については、Rb/E2F 系<sup>\*1</sup>も重要な役割を果たすことが報告されており<sup>(8-10)</sup>、成熟した蝸牛感覚上皮での再生実験への応用が期待される。

### ② Notch 情報伝達系による細胞分化運命決定機構

残存する支持細胞を分化転換し有毛細胞を再生させる方法は、発生段階における有毛細胞と支持細胞への分化運命決定機構についての分子生物学的な知見を応用している。なかでも、内耳有毛細胞の分化における Notch 情報伝達系の応用が試みられている。Notch 情報伝達系は、内耳感覚上皮における有毛細胞と支持細胞の分化運命決定機構に関与している<sup>(11,12)</sup>。

内耳感覚上皮において Notch 情報伝達系が活性化すると、抑制性 bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子 HES が発現する。HES は有毛細胞への分化に関与する bHLH 型転写因子 Atoh1 の発現を抑制し、これによって有毛細胞への分化が阻害されて、支持細胞へと分化する (図4)。

ウイルスベクターを用いて Atoh1 を成熟後の蝸牛感覚上皮で過剰発現させた場合 (図4)、支持細胞から有毛細胞への分化転換がおこること

図3

### 蝸牛支持細胞増殖誘導方法

支持細胞の細胞周期を停止させている p27 の発現を抑制する方法として、① p27 タンパク質を分解する skp2 の発現を亢進させる、② RNAi などを用いて p27 を翻訳レベルで阻害する、という二つの方法が考えられる。

\* 1

Rb, E2F は両方とも細胞周期の制御にかかわる分子。Rb は非リン酸化時に標的分子と結合して、その働きを阻害する。また S 期、M 期の前にリン酸化されて、標的分子と解離する。E2F は Rb の標的となる転写因子の一つで、G1 期、G2 期は Rb と結合し、S 期、M 期では応答配列と結合し、遺伝子の発現を制御する。



基礎研究の新たな方向性を解く37

# 疾患解明 Overview

## 内耳性難聴： 新しい治療法開発への展望

中川隆之、吉川弥生、伊藤喜一

### 疾患の概要

感音難聴は、最も頻度の高い身体障害であり、感音難聴の多くは内耳の蝸牛障害に起因し、内耳性難聴とよばれる。哺乳類の場合、内耳の感覚細胞である有毛細胞や一次ニューロンである神経節細胞は再生能力に乏しい。したがって、これらの細胞が障害を受けると難聴は恒久的なものとなる。発生学や分子生物学的な知見を利用して、これらの細胞を再生させようという試みが進められている。

### はじめに

感音難聴は、最も頻度の高い身体障害の1つとされている。感音難聴は、空気の疎密波である音響刺激の中枢までの伝達経路のうち、蝸牛以降の過程が障害されたものを示すが、その多くは、内耳の蝸牛障害に起因し、内耳障害による感音難聴は内耳性難聴とよばれる。

内耳性難聴の原因としては、音響外傷、耳毒性薬物、遺伝子異常、老化などがある。聾（ろう）もしくは高度難聴は新生児の1,000人に1人認められ、2,000人に1人は成人するまでに発症する。70歳を超えた人口の6割には、高度感音難聴が存在する。このような高い有病率にもかかわらず、症状が固定した慢性期の内耳性難聴に関して現在臨床で使える治療法は補聴器と人工内耳に限られている。1980年代に導入された人工内耳は、刺激電極を蝸牛に挿入し、直接ラセン神経節を刺激する治療法であり、多くの高度難聴者にとって、聴覚を獲得することができる医療として完全に定着している。しかし、これらの治療法は対症療法

でしかなく、また、失われた聴力を完全に補償するものではない。

このような背景から、内耳性難聴を克服すべく、多くの基礎的研究が展開されている。本稿では、新しい治療法の開発という視点から、最近の知見および研究の方向性について、①内耳発生に関する分子生物学的研究成果を応用し、成熟した内耳に残存している再生能力を誘導する、②再生能力が乏しい哺乳類内耳に再生能力がある細胞を外部から導入する（細胞移植）、といった内容を中心に述べる（概念図）。

### 遺伝子・分子レベルでの知見

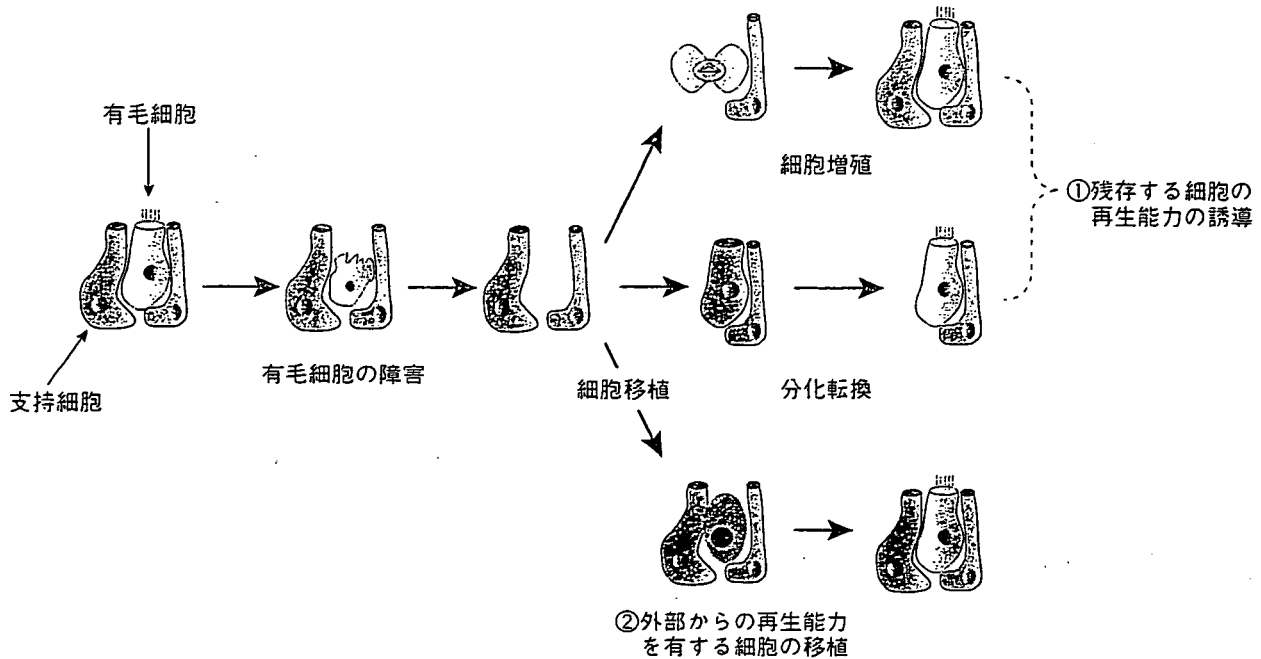
音響刺激は、空気の疎密波として、鼓膜を振動させる。鼓膜の振動は、中耳にある3つの耳小骨を介して蝸牛に伝えられる。耳小骨の振動は、蝸牛の感覚上皮（コルチ器）を振動させ、感覚上皮の感覚細胞（有毛細胞）が振動エネルギーを神経信号に変換し、蝸牛軸に存在する蝸牛の一次神経節であるラセン神経節細胞を興奮させ、音響刺激は中枢に伝達される（図）。

近年、先天性難聴のみならず、多くの内耳性難聴に

Novel strategies for the treatment of sensorineural hearing loss

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

●概念図● 内耳再生へのストラテジー



感覚上皮における有毛細胞再生へのストラテジーを示す。内在する再生能力を誘導する方法として、①残存する支持細胞の増殖を誘導し、増殖した支持細胞を有毛細胞に分化させる、あるいは残存する支持細胞を直接有毛細胞へ分化転換する方法が挙げられる。有毛細胞の再生には②外部から再生能力を有する細胞を内耳に移植する方法（細胞移植）も考えられる。

は遺伝子異常が関与していることが明らかにされつつある。難聴家系調査やゲノムプロジェクト、突然変異マウスなどの研究により、多くの難聴にかかわる遺伝子がこれまでに判明している。代表的なものを表に示す。また、インターネット上に難聴遺伝子データベースが公開されており、新しいデータが逐次報告されている (<http://webhost.ua.ac.be/hhh/>)。これらには転写因子や分子モーター、ギャップジャンクションタンパク質、イオンチャネルタンパク質、細胞外マトリクス分子など多種の遺伝子が含まれており、このような多数の難聴遺伝子の存在は、それだけ内耳の発生、機能が複雑に制御されていることを示している。こうした原因遺伝子を同定し、そのタンパク質の機能を解析することは、該当する遺伝性難聴の治療法の開発や遺伝子スクリーニングなど臨床面においても重要であるが、内耳発生、特に聴覚に関連する細胞の発生、分化機構を解明する点でも重要な意味をもつ。

近年の内耳発生に関する研究成果のなかで、ノッチ情報伝達系に関する知見は、内耳有毛細胞再生へ新しい手がかりを提供した画期的なものといえる<sup>1)</sup>。内耳感覚上皮の発達過程において、1列の内有毛細胞、3列の外有毛細胞、分化した支持細胞など、蝸牛の複雑な細胞構成の構築にはノッチ情報伝達系による側方抑制が機能していることが、ノッチ情報伝達系のリガンドや関連する転写因子のノックアウトマウスの解析により示されている。ノッチ受容体は隣接細胞が発現するリガンドが結合するとセクレターゼ活性により細胞膜内領域で切断され、その細胞内領域が核内に移行し、核内の transactivator である RBP-J と結合し、標的遺伝子の転写を開始する。Cre/loxP システムを利用した RBP-J 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの系では、外有毛細胞の外側、つまり通常は支持細胞の存在する領域に、有毛細胞が認められ<sup>2)</sup>、ノッチ情報伝達系が遮断されることにより、支

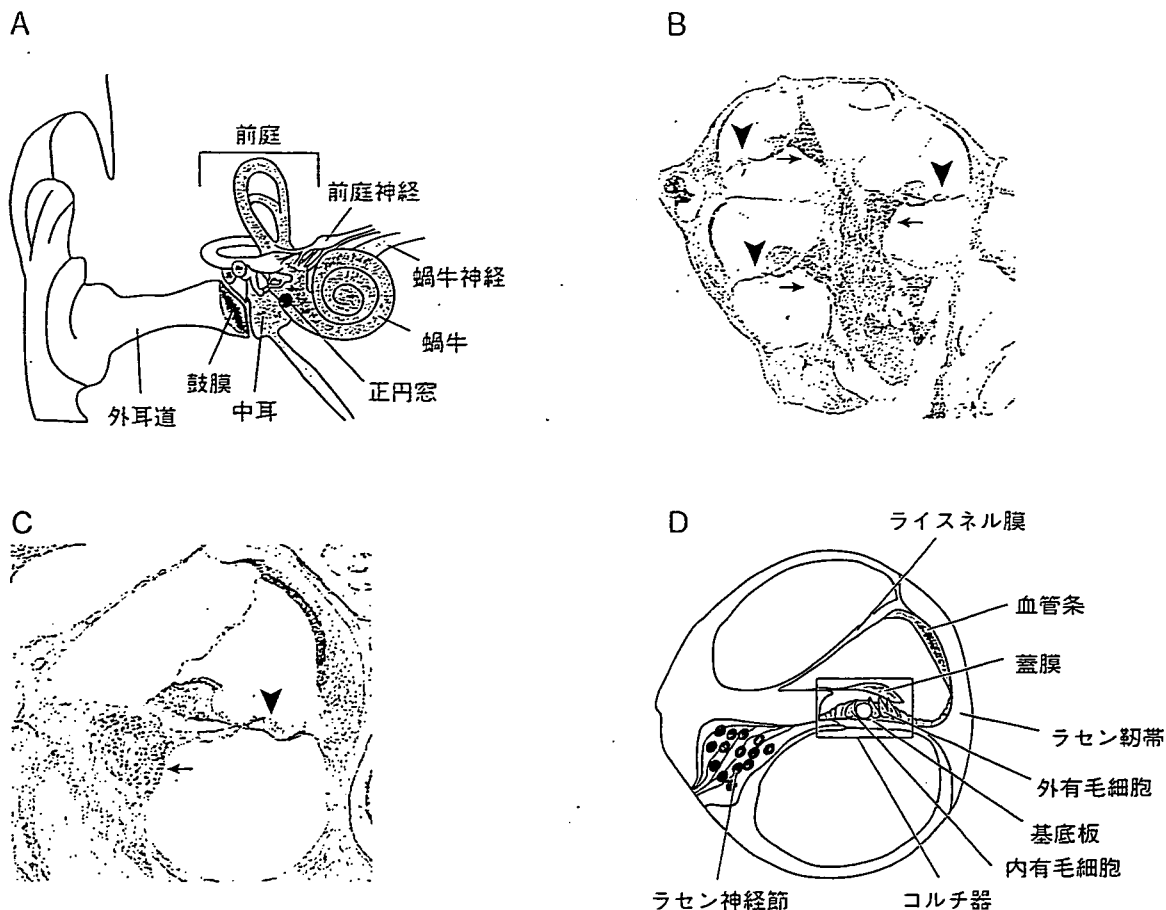


図 内耳、蝸牛の解剖

- A) 音響は外耳道を通り、鼓膜を振動させ、中耳に存在する耳小骨を振動させる。耳小骨の振動は内耳にある蝸牛に伝達される。  
 B, C) マウス蝸牛断面図、蝸牛軸にそってラセン神経節(矢印)が存在する。矢頭は感覚上皮(コルチ器)の位置を示す。  
 D) 蝸牛断面模式図

持細胞が有毛細胞に分化することが示されている。

内耳発生段階における細胞周期制御機構に関連する一連の報告も、内耳再生に多くの示唆を与えるものといえる。発達段階のマウス内耳感覚上皮予定領域では、胎生期13日前後で細胞増殖が停止し、急速に有毛細胞、支持細胞の分化が誘導される。つまり、この時期の前後で発現変化の認められる細胞増殖に関連する因子が細胞増殖の停止に関連することが推察される。サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質の1つである  $p27^{Kip1}$  がこの時期の感覚上皮予定領域の細胞増殖が停止に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、 $p27^{Kip1}$  をノックアウトしたマウスでは過剰に有毛細胞が出現し、生後も細胞増殖が認められることが示された<sup>3)</sup>。内耳感覚上皮の細胞増殖制御については、RBP/E2F系などいくつかの因子が関与している

ことが示されているが、 $p27^{Kip1}$  は支持細胞に比較的特異的に発現することから、支持細胞の増殖誘導について鍵を握る因子と考えられている。

### 内耳再生への試み①： 内在する細胞による再生

鳥類では、哺乳類と異なり、内耳有毛細胞が再生することが知られているが、そのメカニズムとして①支持細胞の増殖、分化による再生と②残存する支持細胞が有毛細胞に分化転換する、2つの経路があることが知られている<sup>4)</sup>。哺乳類でも、標的となる分子を操作することにより、同様のストラテジーで再生を誘導できる可能性がある。

前述したノッチ情報伝達系の転写因子を過剰発現することにより、生後の成熟した哺乳類蝸牛感覚上皮で

表 難聴遺伝子

分子名	ヒト遺伝子名	遺伝性難聴の種類	変異マウス	タンパク質の機能
Pou4f3 (Brn3c)	POU4F3	DFNA15		転写因子
Pax3	PAX3	Waardenburg症候群 type I, III	Splotch	転写因子
Myosin VIIa	MYO VIIa	Usher症候群1B DFNB2 DFNA11	Shaker-1	分子モーター
Myosin XV	MYO XV	DFNB3	Shaker-2	分子モーター
Connexin26	GJB2 (CX26)	DFNA3		ギャップジャンクション タンパク質
Claudin14	CLDN14 (Claudin14)	DFNB29		タイトジャンクション タンパク質
KCNQ4 (potassium channel)	KCNQ4	DFNA2		チャネルタンパク質
Cadherin23	CDH23	Usher症候群1D	Waltzer	細胞膜接着因子
Protocadherin15	PCDH15	Usher症候群1F	Ames waltzer	細胞膜接着因子
Usherin	Usherin	Usher症候群2A		細胞膜接着因子
Alpha-tectorin		DFNA8 DFNA12 DFNB21		蓋膜構成タンパク質
Collagen	COL4A5	Alport症候群		細胞外マトリクス分子

代表的な難聴遺伝子と遺伝性難聴の種類、変異マウス、遺伝子がコードするタンパク質の機能を示す

も支持細胞から有毛細胞への分化転換誘導が可能であることが示された。ミシガン大学のRaphaelのグループは、成体モルモットの蝸牛感覚上皮にノッチ情報伝達系の転写因子である *Atoh1* をアデノウイルスを用いて過剰発現させることにより、支持細胞から有毛細胞への分化転換が起こりうることを示し<sup>5)</sup>、アミノ配糖体で聾としたモルモットでも同様の操作により、残存する支持細胞から有毛細胞への分化転換誘導が可能であることを示した<sup>6)</sup>。一方、山本ら<sup>2)</sup>は、ノッチ情報伝達系の遮断により、内耳感覚上皮での *Atoh1* 発現が亢進し、支持細胞から有毛細胞への分化転換が起こりうることを器官培養系の実験で示した。そこでわれわれは、Raphaelらのグループが用いたモルモット障害モデルを使用し、薬物の内耳局所投与によるノッチ情報伝達系阻害による支持細胞から有毛細胞への分化転換について調べた。ノッチ情報伝達系阻害薬としては、山本らが培養系で有効性を確認した  $\gamma$  セクレターゼ阻害剤である MDL28170 を用いた。結果、支持細胞から有毛細胞への分化転換を示唆する所見が認められた<sup>7)</sup>。障害後に認められた新生有毛細胞の数は、ウ

イルスベクターによる *Atoh1* 過剰発現に比較すると少なく、また新生有毛細胞が認められる部位も限定されていた。しかしながら、アデノウイルスベクターによる内耳への遺伝子導入という手法に比べ、内耳への薬物局所投与という方法は、臨床応用に近い手法といえ、ノッチ情報伝達系の操作による内耳有毛細胞再生を臨床応用するという観点からは、大きな前進といえる。近年、特定のタンパク質の機能制御を行う小分子化合物を用いた研究 (chemical genetics) が注目を集めており、今後、遺伝子操作で得られた研究成果を「内耳への薬物投与」に置き換えることにより、臨床応用への可能性を高める工夫が積極的になされるであろう。

鳥類での内耳有毛細胞再生のメカニズムを哺乳類に応用するという観点から、哺乳類での支持細胞の増殖誘導も重要な研究アプローチといえる。支持細胞の増殖停止機構として、細胞周期を抑制するサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質である p27<sup>Kip1</sup> の役割が最も注目されている。生後の蝸牛感覚上皮においても支持細胞の p27<sup>Kip1</sup> の発現を抑制することができれば、支