

Fig. 1 Expression of Notch1 and Jagged1 in auditory epithelia of embryonic and adult auditory epithelia with or without ototoxic treatment. The embryonic auditory epithelium exhibits immunoreactivity for Notch1 and Jagged1 (Jagged1) in the greater epithelial ridge (GER) and the supporting cells (arrows in a, e), whereas neither expression is found in normal adult epithelia (b, f). The adult auditory epithelium on day 2 after kanamycin and ethacrynic acid application (KM + EA day 2) exhibits immunoreaction for Notch1 in the inner sulcus cells (arrow in c), and that for Jagged1 in the inner sulcus cells and the supporting cells (arrows in g), while neither expression is found in that obtained on day 7 (d, h). Red fluorescence shows immunoreactivity for myosin VIIa (myo), and blue shows DAPI. The locations of inner hair cells are indicated by asterisks and those of outer hair cells are indicated by arrowheads. Bars represent 25 μ m. DAPI, 4',6'-diamidino,2-phenylindole dihydrochloride.

ectopic myosin VIIa-positive cells were identified in the inner sulcus region of the basal turn of cochleae (Fig. 2b, c). Ectopic myosin VIIa-positive cells were found in four of seven experimental animals. The mean and SEM for numbers of ectopic myosin VIIa-positive cells was 0.71 and ± 0.29 (cells/200 μ m). The difference in numbers of ectopic myosin VIIa-positive cells between specimens with MDL treatment and those KM and EA alone was statistically significant ($P=0.028$, Fig. 2d).

Discussion

In this study, we examined the activation of Notch signaling in adult and embryonic guinea pig auditory epithelia, with or without systemic KM and EA application. Notch1 and Jagged1 immunohistochemistry indicated a quiescent state of Notch signaling in the nonaffected auditory epithelia of adult guinea pigs and the activation of Notch signaling in damaged auditory epithelia. Strong immunoreactivity for Notch1 and Jagged1 was found in the auditory epithelia on days 2 and 4 after systemic KM and EA application. Immunoreactivity for these molecules then returned to the levels seen in normal adult tissues on day 7. These findings indicate that transient activation of Notch signaling might occur in adult auditory epithelia after systemic KM and EA application.

The nonaffected auditory epithelia of adult guinea pigs exhibited no ectopic myosin VIIa-positive cells following local MDL application, which supported the present immunohistochemical findings for Notch1 and Jagged1. By contrast, local MDL application to cochleae on day 4 after systemic KM and EA treatment, which demonstrated Notch1 and Jagged1 expression, induced the appearance of ectopic myosin VIIa-positive cells in the auditory epithelia. Notch1 and Jagged1 expression was found in the inner sulcus region of damaged auditory epithelia, and a limited number of ectopic myosin VIIa-positive cells were identified in this region. These findings indicate that pharmacological inhibition of Notch signaling by a γ -

secretase inhibitor generates the appearance of ectopic HCs in adult auditory epithelia.

In this study, we applied an ototoxic treatment that was used previously in a study of Atoh1 overexpression by virus vectors [9]; we also introduced a γ -secretase inhibitor at the time point when the virus inoculation occurred in the previous report [9]. Atoh1 overexpression by virus vectors induced the generation of a number of new HCs in various portions of the auditory epithelia, whereas local MDL application resulted in a limited number of ectopic HCs in the inner sulcus region. In addition, viral overexpression of Atoh1 generated some ectopic HCs in normal adult guinea pig cochleae [8]. Atoh1 might have had a direct effect on the transdifferentiation of SCs into HCs, whereas the pharmacological inhibition of Notch signaling indirectly induced an increase in Atoh1 expression, which might explain the difference in effect on ectopic HCs. Atoh1 overexpression in auditory epithelia, however, requires viral vectors with their associated risk of toxicity, whereas pharmacological inhibition of Notch signaling requires only local drug application to the cochlea. We therefore consider pharmacological inhibition of Notch signaling to be preferable for clinical applications, although its effect on the generation of new HCs is limited.

In this study, the expression of Notch1 and Jagged1 and the generation of ectopic HC-immunophenotypes were observed in the inner sulcus region of the auditory epithelia. The greater epithelial ridge of embryonic and neonatal auditory sensory epithelia corresponds to the inner sulcus region in mature auditory epithelia, and is necessary for the normal development of the auditory epithelium [16]. Several cell-culture studies have demonstrated the existence of progenitor cells, even in adult auditory epithelia, with the potential to differentiate into HCs [2,3,17]. In addition, Malgrange *et al.* [17] reported on the preservation of such progenitor cells in the inner sulcus region of adult animals, suggesting that the inner sulcus cells might be important for the restoration of adult auditory epithelia. Future investigations should elucidate the unique characteristics of these

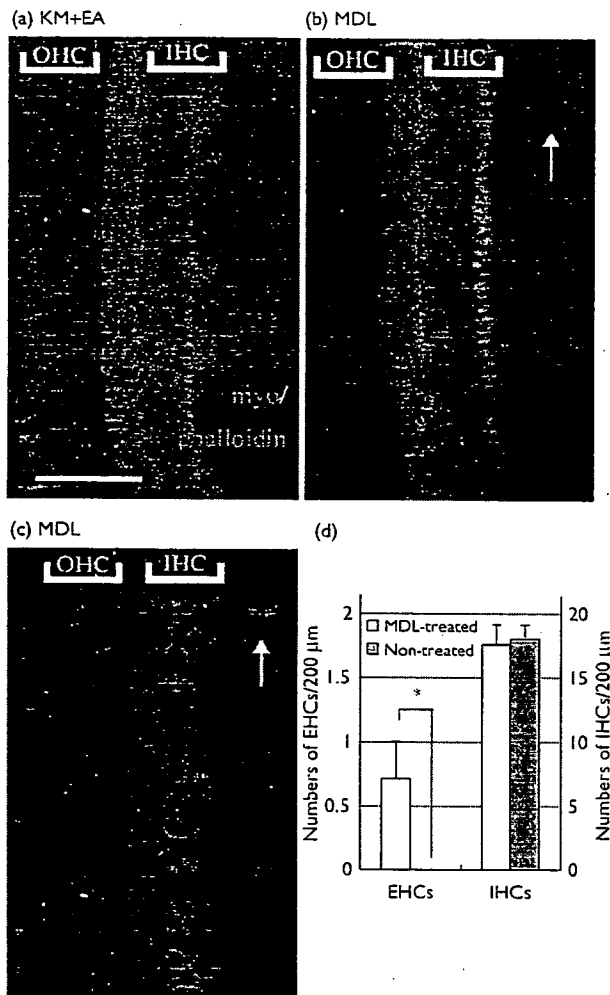


Fig. 2 Ectopic hair cell-immunophenotypes in damaged auditory epithelia. An auditory epithelium affected by kanamycin (KM) and ethacrynic acid (EA) exhibits no ectopic myosin VIIa (myo)-positive cells (a). In auditory epithelia treated with systemic KM and EA treatment followed by local MDL application, ectopic myo-positive cells are found in the inner sulcus region (arrows in b, c). IHC indicates the location of inner hair cells and OHC indicates that of outer hair cells. Bars represent 50 μm. The numbers of ectopic hair cells (EHCs) and inner hair cells (IHCs) in the midbasal portion of MDL-treated and nontreated cochleae following KM and EA application are shown in d. The difference in EHC numbers between two groups was significant (* $P=0.028$ in d). No significant difference in IHC numbers was found. Bars represent SEM.

cells in relation to the temporary activation of Notch signaling, which will contribute to the optimization of the pharmacological inhibition of Notch signaling.

Conclusion

The present findings demonstrate that pharmacological inhibition of Notch signaling has the potential to generate ectopic HCs in the damaged auditory epithelia of adult guinea pigs. The functionality of these ectopic HC immuno-

phenotypes, however, remains to be determined. In addition, an increase in the number of new HCs will be necessary for functional recovery. We therefore aim to determine the optimal conditions for the pharmacological inhibition of Notch signaling in our future work.

Acknowledgements

The authors thank Y.S. Kikkawa and T. Okano for critical reviews of the manuscript and N. Yamamoto for technical advice. This study was supported by a Grant-in-Aid for Researches on Sensory and Communicative Disorders from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and in part by a Grant-in-Aid for Regenerative Medicine Realization from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture and Technology of Japan.

References

- Roberson DW, Rubel EW. Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *Am J Otol* 1994; 15:28–34.
- White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, Groves AK, Segil N. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* 2006; 22:984–987.
- Oshima K, Grimm CM, Corrales CE, Senn P, Martinez Monedero R, Geleoc GS, et al. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007; 8:18–31.
- Lanford PJ, Lan Y, Jiang R, Lindsell C, Weinmaster G, Cridley T, et al. Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* 1999; 21:289–292.
- Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, Vollrath MA, Ben-Arie N, Eatock RA, et al. Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 1999; 284:1837–1841.
- Brooker R, Hozumi K, Lewis J. Notch ligands with contrasting functions: Jagged1 and Delta1 in the mouse inner ear. *Development* 2006; 133:1277–1286.
- Zheng JL, Gao WQ. Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat Neurosci* 2000; 3:580–586.
- Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci* 2003; 23:4395–4400.
- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005; 11:271–276.
- Jarrault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995; 377:355–358.
- Kato H, Sakai T, Tamura K, Minoguchi S, Shirayoshi Y, Hamada Y, et al. Functional conservation of mouse Notch receptor family members. *FEBS Lett* 1996; 395:221–224.
- 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 U S A* 2001; 98:9026–9031.
- Takebayashi S, Yamamoto N, Yabe D, Fukuda H, Kojima K, Ito J, et al. Multiple roles of Notch signaling in cochlear development. *Dev Biol* 2007; 307:165–178.
- 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* 2006; 84:37–45.
- Murata J, Tokunaga A, Okano H, Kubo T. Mapping of Notch activation during cochlear development in mice: implications for determination of prosensory domain and cell fate diversification. *J Comp Neurol* 2006; 497:502–518.
- Pirvola U, Ylikoski J, Trokovic R, Hebert JM, McConnell SK, Partanen J. FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium. *Neuron* 2002; 35:671–680.
- Malgrange B, Belachew S, Thiry M, Nguyen L, Rogister B, Alvarez ML, et al. Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev* 2002; 112:79–88.

Novel Therapy for Hearing Loss: Delivery of Insulin-Like Growth Factor 1 to the Cochlea Using Gelatin Hydrogel

*‡Kyu Yup Lee, *Takayuki Nakagawa, *Takayuki Okano, *Ryusuke Hori,
*Kazuya Ono, †Yasuhiko Tabata, ‡Sang Heun Lee, and *Juichi Ito

*Department of Otolaryngology—Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, and †Department of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University, Kyoto, Japan; and ‡Department of Otolaryngology, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea

Hypothesis: Local application of recombinant human insulin-like growth factor 1 (rhIGF-1) via a biodegradable hydrogel after onset of noise-induced hearing loss (NIHL) can attenuate functional and histologic damage.

Background: The biodegradable gelatin hydrogel makes a complex with drugs by static electric charges and releases drugs by degradation of gelatin polymers. We previously demonstrated the efficacy of local rhIGF-1 application via hydrogels before noise exposure for prevention of NIHL.

Methods: First, we used an enzyme-linked immunosorbent assay to measure human IGF-1 concentrations in the cochlear fluid after placing a hydrogel containing rhIGF-1 onto the round window membrane of guinea pigs. Second, the functionality and the histology of guinea pig cochleae treated with

local rhIGF-1 application at different concentrations after noise exposure were examined. Control animals were treated with a hydrogel immersed in physiologic saline alone.

Results: The results revealed sustained delivery of rhIGF-1 into the cochlear fluid via the hydrogel. The measurement of auditory brainstem responses demonstrated that local rhIGF-1 treatment significantly reduced the threshold elevation from noise. Histologic analysis exhibited increased survival of outer hair cells by local rhIGF-1 application through the hydrogel.

Conclusion: These findings indicate that local rhIGF-1 treatment via gelatin hydrogels is effective for treatment of NIHL.

Key Words: Biomaterial—Drug delivery—Growth factor—Noise trauma—Round window.

Otol Neurotol 28:976–981, 2007.

Sensorineural hearing loss (SNHL) is one of the most common disabilities, but therapeutic options are limited to hearing aids and cochlear implants. Many investigations have therefore examined novel therapeutic molecules for SNHL and have discovered several agents exerting therapeutic activity against SNHL. Despite such progress in basic research, translation of these basic findings into clinical use is very rare. The lack of safe and effective methods for drug delivery to

the cochlea has formed a considerable obstacle to clinical applications. Systemically applied drugs have great difficulty reaching cochlear cells because of 1) the blood-labyrinth barrier (1) acting as an obstacle to the transfer of drugs from serum to cochlear cells and 2) the limited blood flow to the cochlea (2). The development of local drug delivery systems to the cochlea thus remains crucial for the clinical application of basic findings in this field.

Several methods of local drug delivery to the cochlea have been reported (3). Implantable minipumps have frequently been used for local drug delivery to the cochlea in animal experiments (4). In addition, several clinical reports have described the efficacy of local steroid application using a semi-implantable minipump (5,6). However, the use of implantable minipumps has not been widely adopted because of the need for surgical procedures similar to tympanoplasty. Local drug delivery using biodegradable polymers has thus gained attention as an alternative to implantable minipumps. In general, biodegradable polymers containing therapeutic molecules are

Address correspondence and reprint requests to Takayuki Nakagawa, M.D., Ph.D., Department of Otolaryngology—Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, 606-8507 Kyoto, Japan; E-mail: tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

This study was supported by a grant-in-aid for Regenerative Medicine Realization Project from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture, and Technology of Japan and by a grant-in-aid for Researches on Sensory and Communicative Disorders from the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

placed on the round window membrane (RWM), and therapeutic molecules released from the polymers transfer into the perilymph of cochleae through the RWM (3,7). We have reported the efficacy of gelatin hydrogel for sustained delivery of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to the cochlear perilymph in guinea pigs (8). Brain-derived neurotrophic factor delivered by gelatin hydrogels efficiently protect spiral ganglion neurons from secondary degeneration caused by hair cell loss. However, BDNF is not currently clinically applicable. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is a mitogenic peptide that plays essential roles in the regulation of growth and development in the inner ear. The gelatin hydrogel system was examined as a vehicle to deliver recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) to the cochlea because this drug has already been approved for clinical use. Local rhIGF-1 application through the gelatin hydrogel before noise exposure significantly protects cochleae from functional and histologic losses induced by noise trauma (9).

Our goal is the clinical use of local rhIGF-1 application via the gelatin hydrogel as a therapeutic option for the treatment of SNHL. The current study examined whether posttraumatic application of rhIGF-1 to the cochlea through gelatin hydrogel attenuates noise-induced hearing loss (NIHL). In addition, we examined IGF-1 concentrations in cochlear perilymph after placing rhIGF-1-containing hydrogel onto the RWM of guinea pigs to determine the efficiency of the gelatin hydrogel system for cochlear application of rhIGF-1.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Twenty-six adult female Hartley guinea pigs weighing 250 to 300 g (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) served as experimental animals. Animal care was conducted under the supervision of the Institute of Laboratory Animals at the Graduate School of Medicine, Kyoto University. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

Biodegradable Gelatin Hydrogel

A biodegradable hydrogel has been developed for sustained delivery of peptides, including growth and trophic factors (10). In this approach, a positively charged protein is electrostatically complexed with negatively charged polymer chains, which form the components of the biodegradable hydrogel. The biodegradation of the polymer chains leads to the release of peptide. Biodegradable hydrogels are generated by glutaraldehyde cross-linking of gelatin. The rates of degradation are determined according to the concentration of glutaraldehyde. A previous analysis of in vitro IGF-1 release profiles from hydrogels has demonstrated that a hydrogel made with 10-mmol/L glutaraldehyde allows for optimal IGF-1 delivery (11). We therefore used this type of hydrogel in the present study.

In Vivo IGF-1 Release Profile

Guinea pigs were anesthetized using ketamine (dose, 80 mg/kg intramuscularly; Sankyo, Tokyo, Japan) and xylazine (dose, 9 mg/kg intramuscularly; Bayer, Tokyo, Japan). A sheet of hydro-

gels in dried condition was cut to a size of 1.5 to 2 mm³ under microscopy. A piece of hydrogel immersed in rhIGF-1 (amount, 400 µg dissolved in 40-µL physiologic saline; Astellas, Tokyo, Japan) was positioned on the left RWM of each animal in the treated group. Perilymph was collected on Days 1, 3, or 7 (n = 4 each) after drug application in treated groups and from nontreated animals (n = 4). For each animal, a small hole was made in the basal turn of the cochlea 2 mm from the RWM, under general anesthesia, and 3 µL of perilymph was collected through the hole using a micropipette. The same amounts of cerebrospinal fluid (CSF) and serum were obtained from each animal. Insulin-like growth factor 1 proteins were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), performed using a Quantikine human IGF-1 immunoassay kit according to standard protocols (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Triplicate measurements were averaged.

Noise Exposure and Drug Application

Baseline auditory brainstem response (ABR) thresholds were measured within 7 days before initial noise exposure. Animals were then exposed to 4-kHz octave band noise at 120-dB sound pressure level for 5 hours in a ventilated sound exposure chamber. Sound levels were monitored and calibrated at multiple locations within the sound chamber to ensure stimulus uniformity. Under general anesthesia with ketamine and xylazine, a piece of hydrogel immersed in rhIGF-1 at a concentration of 1 or 10 µg/µL in 40 µL physiologic saline (n = 5 for each concentration) was placed on the RWM in the left ear of animals 5 hours after noise exposure; then, the hydrogel immersed in physiologic saline was placed on the RWM of the right ear.

Functional Analysis

Auditory function was assessed by using ABR recordings. Measurements of ABR thresholds were performed at frequencies of 4, 8, and 16 kHz before noise exposure and on Days 3, 7, 14, and 21 after drug application. The animals were anesthetized using ketamine and xylazine and were kept warm with a heating pad. Generation of acoustic stimuli and subsequent recording of evoked potentials were performed using a PowerLab/4SP data acquisition system (ADInstruments, Castle Hill, Australia). Acoustic stimuli, consisting of tone-burst stimuli (0.1-ms cos 2 rise/fall and 1-ms plateau), were delivered monaurally through a speaker (ES1spc; Bioresearch Center, Nagoya, Japan) connected

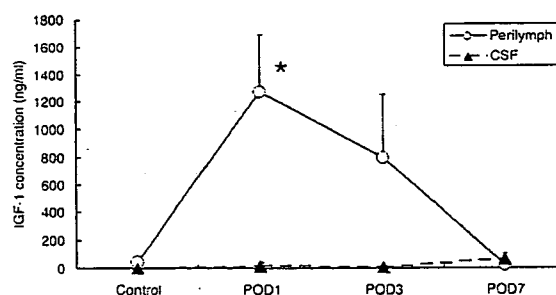


FIG. 1. Graph showing concentrations of human IGF-1 in cochlear perilymph and CSF. A significant increase in concentration of IGF-1 is found on postoperative Day 1 for perilymph (* $p < 0.05$), whereas no significant changes are observed in concentrations of IGF-1 in CSF. Bars represent SEM. POD indicates postoperative day.

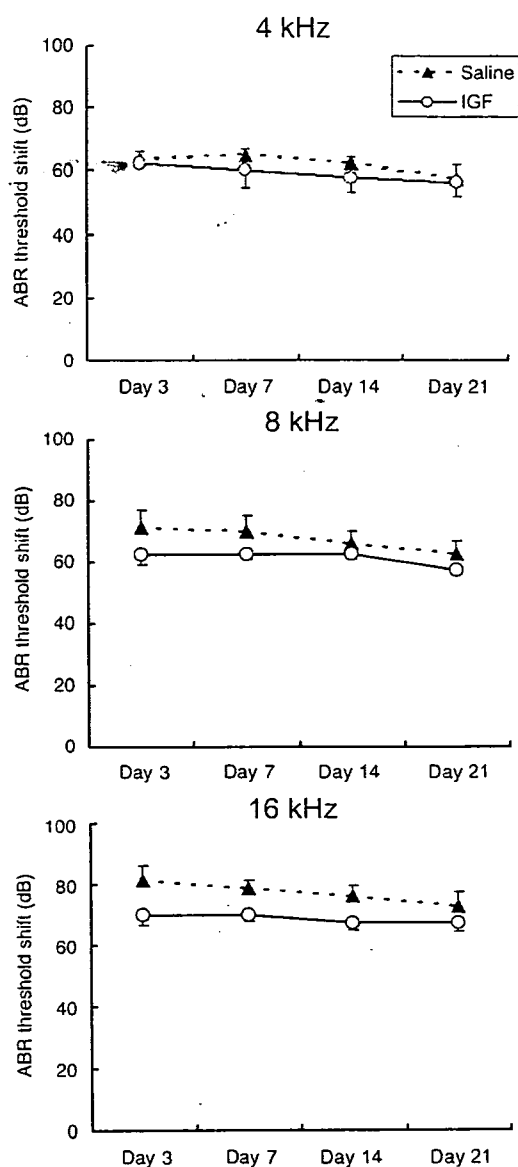


FIG. 2. Graphs showing time courses of alterations in threshold shifts of ABRs in cochleae treated with 1-µg/µL rhIGF-1 and cochleae treated with saline at frequencies of 4, 8, and 16 kHz. No significant differences are present in ABR threshold shifts between rhIGF-1- and saline-treated cochleae at any frequencies. Bars represent SEM.

to a funnel fitted into the external auditory meatus. To record bioelectric potentials, subdermal stainless steel needle electrodes were inserted at the vertex (ground), ventrolateral to the measured ear (active), and contralateral to the measured ear (reference). Stimuli were calibrated against a ¼-inch free-field microphone (ACO-7016; ACO Pacific, Belmont, CA, USA) connected to an oscilloscope (DS-8812 DS-538; Iwatsu Electric, Tokyo, Japan) or a sound level meter (LA-5111; Ono Sokki, Yokohama, Japan).

Otology & Neurology, Vol. 28, No. 7, 2007

The responses between the vertex and the mastoid subcutaneous electrodes were amplified using a digital amplifier (MA2; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA). Thresholds were determined from a set of responses at varying intensities with 5-dB sound pressure level intervals; then, electric signals were averaged for 1,024 repetitions. The thresholds at each frequency were verified at least twice.

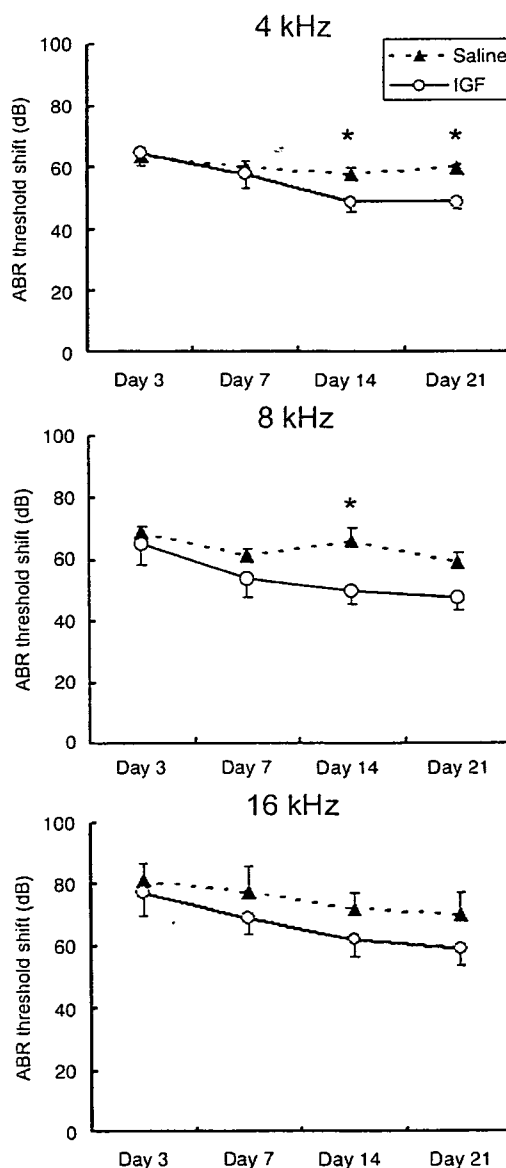


FIG. 3. Graph showing time courses of alterations in threshold shifts of ABRs in cochleae treated with 10-µg/µL rhIGF-1 and cochleae treated with saline at frequencies of 4, 8, and 16 kHz. The differences in ABR threshold shifts at 4 kHz between rhIGF-1- and saline-treated cochleae on Days 14 and 21 are significant, and the difference in ABR threshold shifts at 8 kHz on Day 14 is significant (**p* < 0.05). Bars represent SEM.

Histologic Analysis

On Day 21 after drug application, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine, and the cochleae were exposed. After removal of the stapes, 4% paraformaldehyde in 0.01-mol/L phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 was gently introduced into the perilymphatic space of the cochleae. Temporal bones were then excised and immersed in the same fixative at a temperature of 4°C for 4 hours. After rinsing with PBS, cochleae were dissected from temporal bones and were subjected to histologic analysis in whole mounts. Three regions of cochlear sensory epithelia were used at a distance of 30 to 50% (apical), 50 to 70% (middle), or 70 to 90% (basal) from the apex for quantitative assessments of hair cell loss.

Immunohistochemistry for myosin VIIa and F-actin labeling by phalloidin were used to label the surviving inner hair cells (IHCs) and the outer hair cells (OHCs). Anti-myosin VIIa rabbit polyclonal antibody (dilution, 1:500; Proteus BioSciences, Ramona, CA, USA) was used as the primary antibody, and Alexa 546-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (dilution, 1:400; Molecular Probe, Eugene, OR, USA) was the secondary antibody. After immunostaining for myosin VIIa, the specimens were stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated phalloidin (dilution, 1:300; Molecular Probe). Specimens were viewed under confocal microscopy (TCS SP2; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Nonspecific labeling was tested by omitting the primary antibody from the staining procedures. The numbers of IHCs and OHCs in 0.2-mm-long regions of the apical, middle, or basal portion of cochleae were counted by the 3 authors (K.Y.L., T.N., and T.O.). The average of the values was used as the data for the animal.

Adverse Effects

We examined the incidence of loss of body weight at times of sample collection compared with weight at the beginning of the experiments. As a local adverse effect, incidence of otitis media was examined at times of sample collection. Otitis media was considered present if effusion was identified in the middle ear cavity.

Statistics

The overall effects of rhIGF-1 application on ABR threshold shifts were examined using two-way factorial analysis of variance. When interactions were significant, multiple comparisons using the Fisher protected least significant difference test were performed for pairwise comparisons. Differences in IHC and OHC numbers in each region of the cochlea between rhIGF-1- and saline-treated cochleae were examined using Student *t* test. Values of *p* less than 0.05 were considered statistically significant. Values are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

In Vivo IGF-1 Release Profile

Enzyme-linked immunosorbent assay analysis of human IGF-1 proteins of the perilymph was performed to examine in vivo IGF-1 release profiles of hydrogels (Fig. 1). Very limited levels (mean \pm SEM, 45.4 \pm 31.0 ng/mL) of IGF-1 proteins were detected in samples obtained from nontreated cochleae. A marked increase in IGF-1 protein levels was observed on postoperative Days 1 (mean \pm SEM, 1278 \pm 413 ng/mL) and 3 (mean \pm SEM, 801.6 \pm 456 ng/mL). The IGF-1 protein levels then decreased to the control level by postoperative Day 7 (mean \pm SEM, 23.7 \pm 17 ng/mL). Differences in IGF-1 protein level between control and postoperative Day 1 and between postoperative Days 1 and 7 were significant (control versus postoperative Day 1, *p* = 0.019; postoperative Days 1 versus 7, *p* = 0.017). Level of IGF-1 protein in the CSF of each experimental group was almost the same as that in the perilymph of control animals (Fig. 1), and no significant differences in IGF-1 protein level were observed among experimental groups. The IGF-1 protein levels in the serum were undetectable in each experimental group.

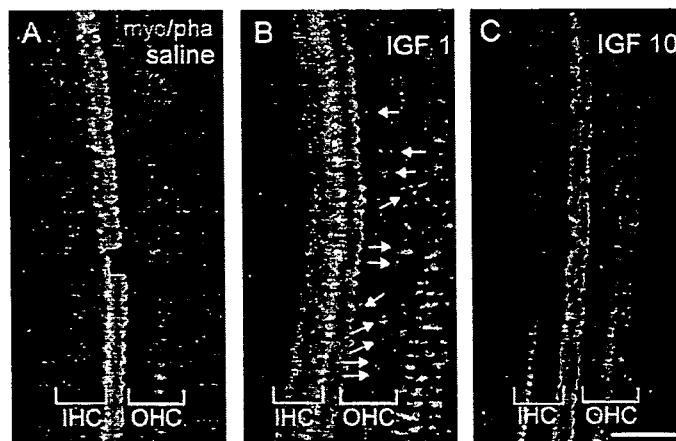


FIG. 4. Image showing immunostaining for myosin VIIa (*myo* [red]) and F-actin labeling with phalloidin (*pha* [green]) of cochlear sensory epithelia in the basal portion of cochleae. Severe loss of OHCs is observed in the saline-treated cochlea (A). Surviving OHCs in the specimen treated with 1- μ g/ μ l recombinant human insulin-like growth factor 1 (rhIGF-1) exhibit scattered distribution (B; arrows). In cochleae treated with 10- μ g/ μ l rhIGF-1, OHCs are comparably preserved (C). Bar represents 50 μ m.

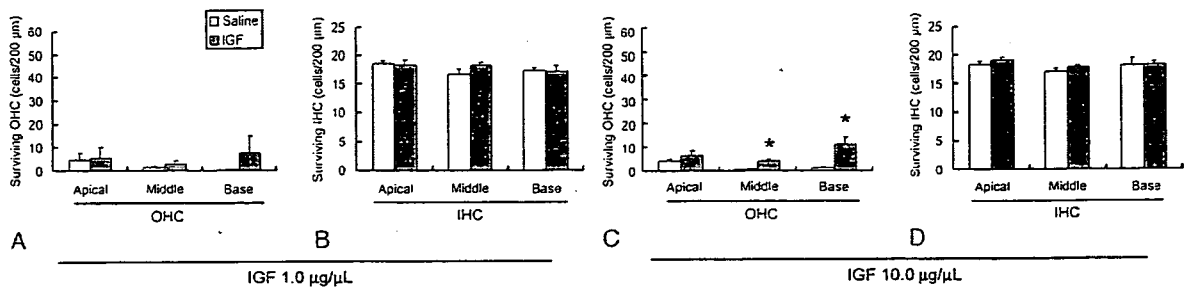


FIG. 5. Graphs showing numbers of surviving inner and outer hair cells in apical, middle, and basal portions of cochleae. No significant differences in numbers of OHCs (A) or IHCs (B) are found between saline- and 1- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ rhIGF-1-treated cochleae. Differences in numbers of surviving OHCs between saline- and 10- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ rhIGF-1-treated cochleae are significant in basal and middle portions of cochleae (C; * $p < 0.05$), whereas significant differences in numbers of IHCs are not found between the 2 groups (D). Bars represent SEM.

Auditory Function

Time courses of alterations in ABR threshold shifts after drug application at 4, 8 and 16 kHz are shown in Figures 2 and 3. Local rhIGF-1 treatment at the concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ demonstrated no significant effects on ABR threshold shifts at each frequency, although a trend toward lower threshold shifts was observed in comparison with controls (Fig. 2). Conversely, the overall effect of rhIGF-1 application on ABR threshold shifts at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was significant at 4 and 8 kHz, but not at 16 kHz (Fig. 3; $p = 0.014$ for 4 kHz, 0.005 for 8 kHz, and 0.074 for 16 kHz). Differences in threshold shifts at 4 kHz between 10- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ rhIGF-1- and saline-treated cochleae on Days 14 and 21 were significant at multiple comparisons using the Fisher protected least significant difference test (Day 14, $p = 0.01$; Day 28, $p = 0.01$), and the difference in threshold shifts at 8 kHz on Day 14 was significant ($p = 0.016$).

Histologic Damage

Immunostaining for myosin VIIa and phalloidin staining demonstrated severe degeneration of OHCs in the apical, middle, and basal portions of saline-treated cochleae. Surviving OHCs were rarely found in middle and basal portions of saline-treated specimens (Fig. 4A). Outer hair cells degeneration in 1- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ rhIGF-1-treated specimens was also severe. Surviving OHCs exhibited scattered distribution (Fig. 4B). In specimens treated with 10- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ rhIGF-1, loss of OHCs was still observed; however, the degree of OHC degeneration was moderate (Fig. 4C). Inner hair cells were well maintained in all the experimental groups (Fig. 4, A–C). Quantitative assessments revealed no significant differences in numbers of surviving OHCs in any cochlear portion between saline- and 1- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ rhIGF-1-treated cochleae (Fig. 5A). Differences in numbers of surviving OHCs between saline- and 10- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ rhIGF-1-treated cochleae were significant in basal and middle portions of cochleae but not in the apical portion (Fig. 5C; basal and middle turns, $p = 0.009$; apical turn, $p = 0.387$). No significant differences were observed in numbers of sur-

ving IHCs between saline- and 1- or 10- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ rhIGF-1-treated cochleae (Fig. 5, B and D).

Incidence of Adverse Effects

No experimental animals exhibited loss of body weight. Scar formation was identified at the surgical site of the bulla, but no cochleae exhibited collection of effusion in the middle ear cavity indicative of otitis media.

DISCUSSION

These findings demonstrate that local rhIGF-1 treatment using gelatin hydrogel is effective for the treatment of NIHL in guinea pigs. Enzyme-linked immunosorbent assay in the present study revealed sustained delivery of rhIGF-1 to the cochlear fluid for 3 days, which is reasonable given the previous findings regarding the in vitro release profile of the hydrogel (11). The hydrogel used in the present study releases approximately 80% of IGF-1 into PBS for 3 days in the presence of collagenase, which is also present in the middle ear (12,13). The present findings from ELISA measurements also demonstrated no influences of cochlea rhIGF-1 application on levels of IGF-1 in CSF or serum. In addition, no systemic or local adverse effects were found in experimental animals. These findings indicate that rhIGF-1 application using the hydrogel offers safe and efficient delivery to the cochlea.

In the present study, ABR measurements exhibited significant effects of local rhIGF-1 treatment through gelatin hydrogels on attenuation of threshold shifts due to noise exposure. Although a tendency toward reduced threshold shifts was observed, local rhIGF-1 application at 1- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ concentration showed no significant reduction in threshold shifts, whereas local rhIGF-1 application at 10- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ concentration (the concentration recommended by the supplier for clinical use) exhibited significant attenuation of threshold shifts at frequencies of 4 and 8 kHz. Local rhIGF-1 application via hydrogels also exhibited significant histologic protection. Similar to functional protection, local rhIGF-1 treatment at a

concentration of 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ significantly increased the numbers of surviving OHCs, whereas treatment at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ had no significant effect on the numbers of surviving OHCs. These findings indicate dose dependency for the effects of local rhIGF-1 treatment on the attenuation of NIHL.

Previous studies have demonstrated that several agents ameliorate NIHL when they are applied before noise exposure; however, only limited agents show protective effects by postexposure administration. Local application of D-JNK-1 peptide, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase, 12 hours after noise exposure attenuates NIHL (14). The efficacy of D-JNK-1 peptide has been demonstrated by application via an osmotic minipump or a hyaluronic acid gel. Postexposure administration of edaravone, a free-radical scavenger, also rescues cochleae from NIHL (15). Locally applied edaravone via an osmotic minipump can rescue OHCs even when it is applied 21 hours after noise exposure. In addition, these agents offer stronger protection of cochleae than does rhIGF-1. The drug delivery system via a gelatin hydrogel may be used for cochlear delivery of D-JNK-1 peptide because the gelatin hydrogel is suitable for sustained delivery of peptides (7–11). However, D-JNK-1 peptide is not clinically applicable. On the other hand, edaravone is clinically available; however, how to deliver edaravone into the cochlea continuously is an obstacle for clinical use. Gelatin hydrogels are not suitable for sustained delivery of edaravone because edaravone is not soluble in water (7). Therefore, other drug delivery systems that are fit for delivery of water-insoluble agents, including encapsulating in polylactic/glycolic acid particles (16), may be required for sustained delivery of edaravone.

The present findings indicate the effectiveness and safety of local rhIGF-1 treatment using gelatin hydrogels for NIHL. Clinical use of gelatin hydrogel as a drug delivery system has already started for angiogenesis of the inferior limb in Japan (17). In addition, rhIGF-1 is clinically applicable. The present findings may help advance the clinical application of local rhIGF-1 treatment using gelatin hydrogel for the treatment of SNHL.

REFERENCES

- Juhn SK, Rybak LP. Labyrinthine barriers and cochlear homeostasis. *Acta Otolaryngol* 1981;91:329–34.
- Angelborg C, Hillerdal M, Hultcrantz E, Larsen HC. The microsphere method for studies of inner ear blood flow. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1998;50:355–62.
- Salt AN, Plontke S. Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug Discov Today* 2005;10:1299–306.
- Takemura K, Komeda M, Yagi M, et al. Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea pig. *Hear Res* 2004;196:58–68.
- Lefebvre PP, Staeker H. Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol* 2002;122:698–702.
- 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* 2005;125:830–9.
- Nakagawa T, Ito J. Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol* 2007;557:30–5.
- Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al. A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 2005;115:2000–5.
- Iwai K, Nakagawa T, Endo T, et al. Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 2006;116:526–33.
- Young S, Wong M, Tabata Y, et al. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Control Release* 2005;109:256–74.
- Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly[ethylene glycol] fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage engineering. *J Control Release* 2005;101:111–25.
- Antonelli PJ, Schultz GS, Kim KM, et al. Alpha 1-antitrypsin and ilomastat inhibit inflammatory proteases present in human middle ear effusions. *Laryngoscope* 2003;113:1347–51.
- Jang CH, Shin SH, Cho HH, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 and -2 in pediatric chronic otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:1155–8.
- Wang J, Ruel J, Ladrech S, et al. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase-mediated mitochondrial cell death pathway restores auditory function in sound-exposed animals. *Mol Pharmacol* 2007;71:654–66.
- Tanaka K, Takemoto T, Sugahara K, et al. Post-exposure administration of edaravone attenuates noise-induced hearing loss. *Eur J Pharmacol* 2005;522:116–21.
- Tamura T, Kita T, Nakagawa T, et al. Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 2005;115:2000–5.
- Arai Y, Marui A, Komeda M. Regenerative medicine with the sustained release system of basic fibroblast growth factor. *Nippon Rinsho* 2006;64:2142–7.

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**¹ 中川 隆之*¹ 山本 典生*²

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

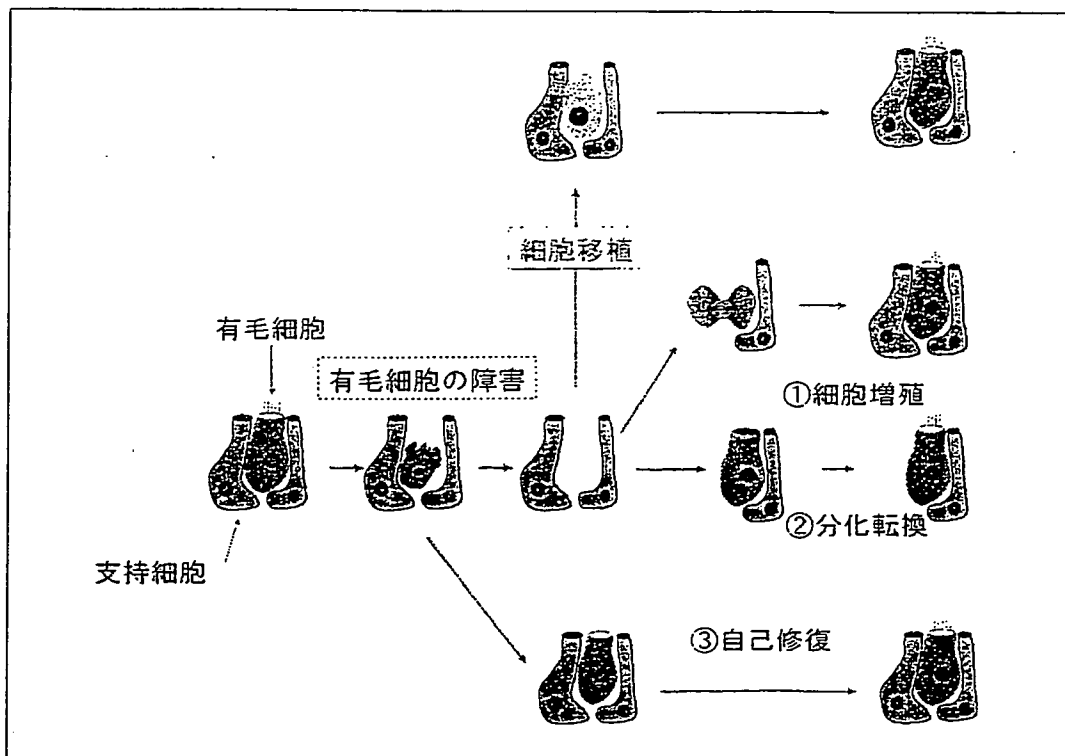
I. 緒 言

- 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²⁾。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³⁾。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、克服しなくてはなら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2A)。マウス蝸牛では、蝸牛基底回転上を鍍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³⁾。

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⁴⁾。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

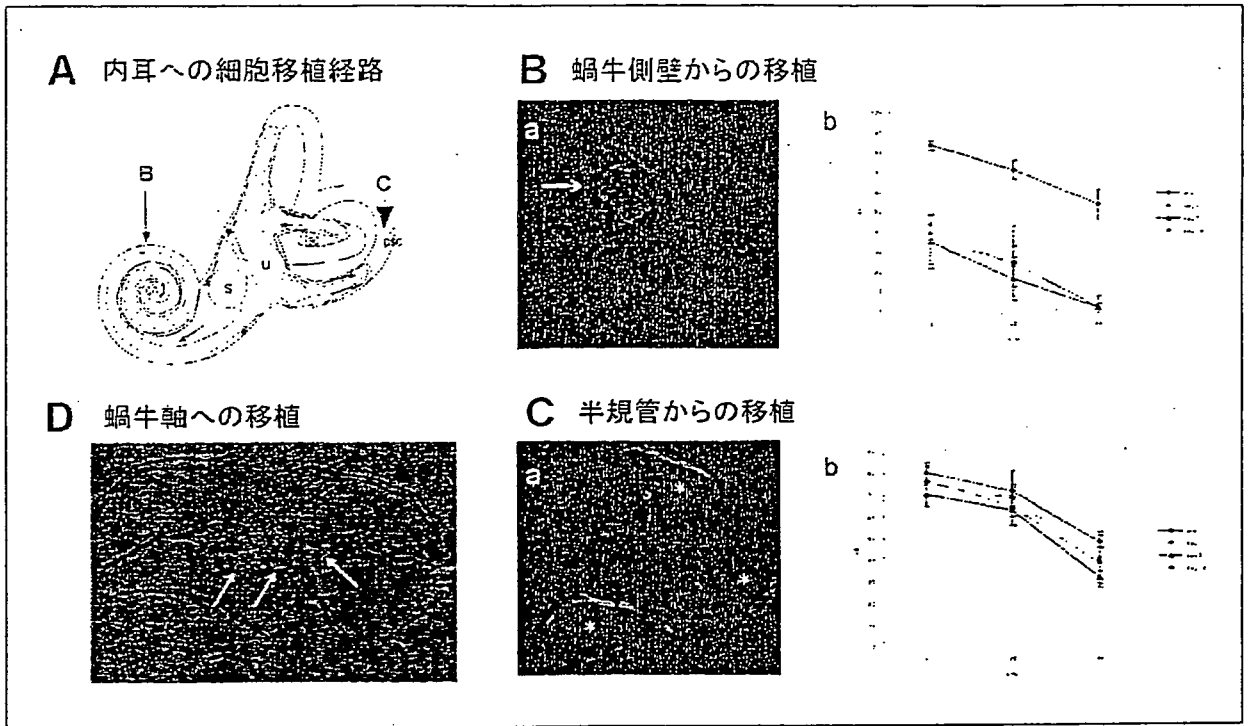
神経幹細胞の内耳移植細胞としての能力を評価する目的で、生後3週の内耳機能の成熟したマウスに前処置を加えることなく、半規管からGFPにて標識した胎仔間脳由来の神経幹細胞を移植し、4週間後に組織学的解析を行った。移植細胞は蝸牛の外リンパ腔に認められ、蝸牛組織内に侵入する細胞は認められなかった(図3A)。網膜への移植実験でも、障害を惹起していない正常の網膜には、神経幹細胞は侵入しないことが示されており、これに合致する所見と考えられる。一方、移植細胞は、蝸牛の基底

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³⁾。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⁶⁾、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。灰色の部分には膜迷路を示す。
 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⁷⁾。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

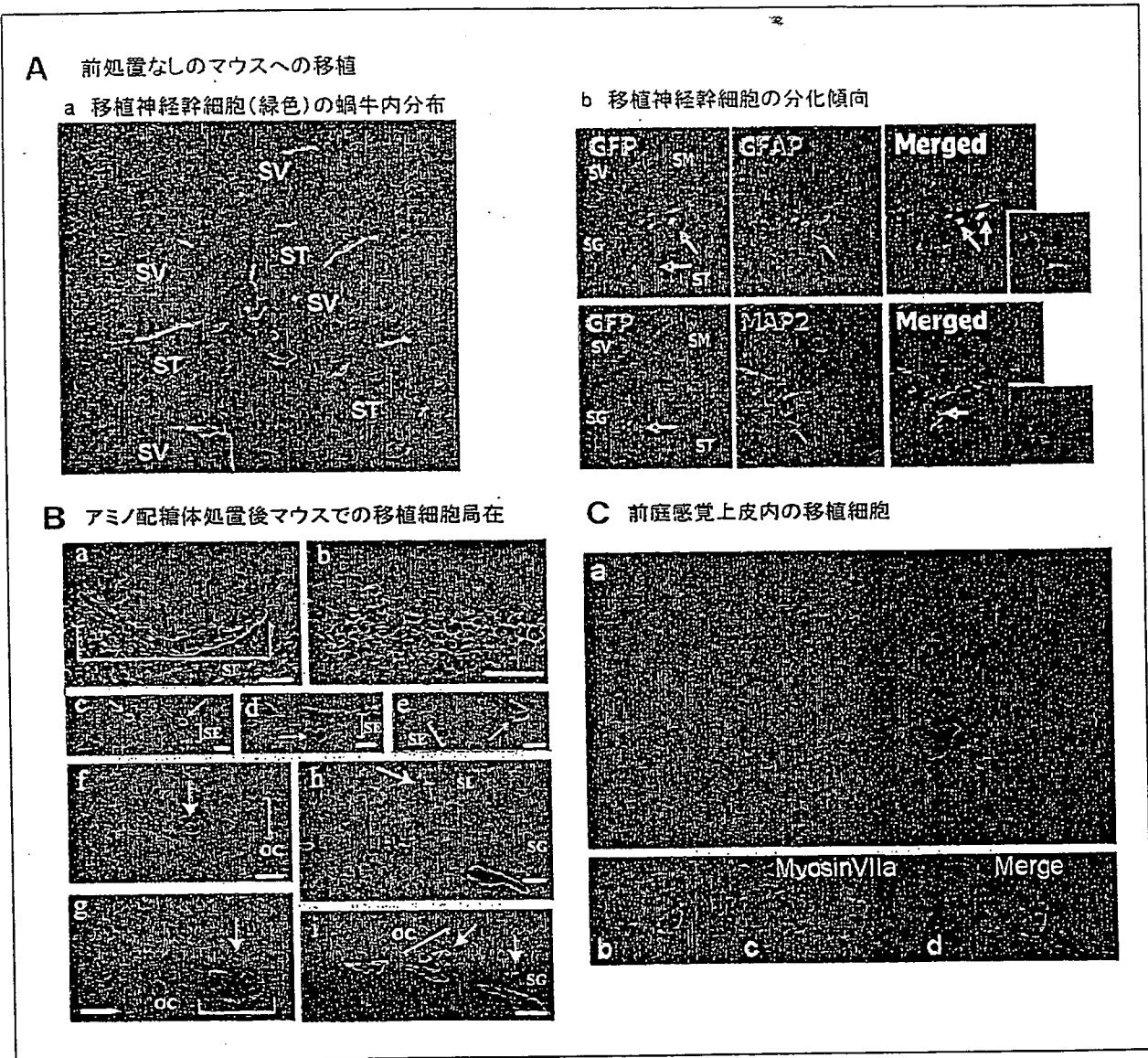
内耳再生を目的とした移植細胞について考えた場合、最も理想的な細胞ソースは内耳由来細胞であり、より未熟な胎児から採取された細胞が望ましい。われわれは「内耳幹細胞」、「内耳前駆細胞」とも呼べる細胞が分離・培養でき、また内耳への細胞移植のドナーとして使用できるかを検討した。

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は不明である。

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 日ラット内耳の耳胞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 : 卵形窓 (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タ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) のマーカタンパクを発現す

る細胞が出現した (図 4 B). 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²⁾.

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⁹⁾。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¹⁰⁾。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¹⁰⁾。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^{11,12}。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えることができる。

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¹³。

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

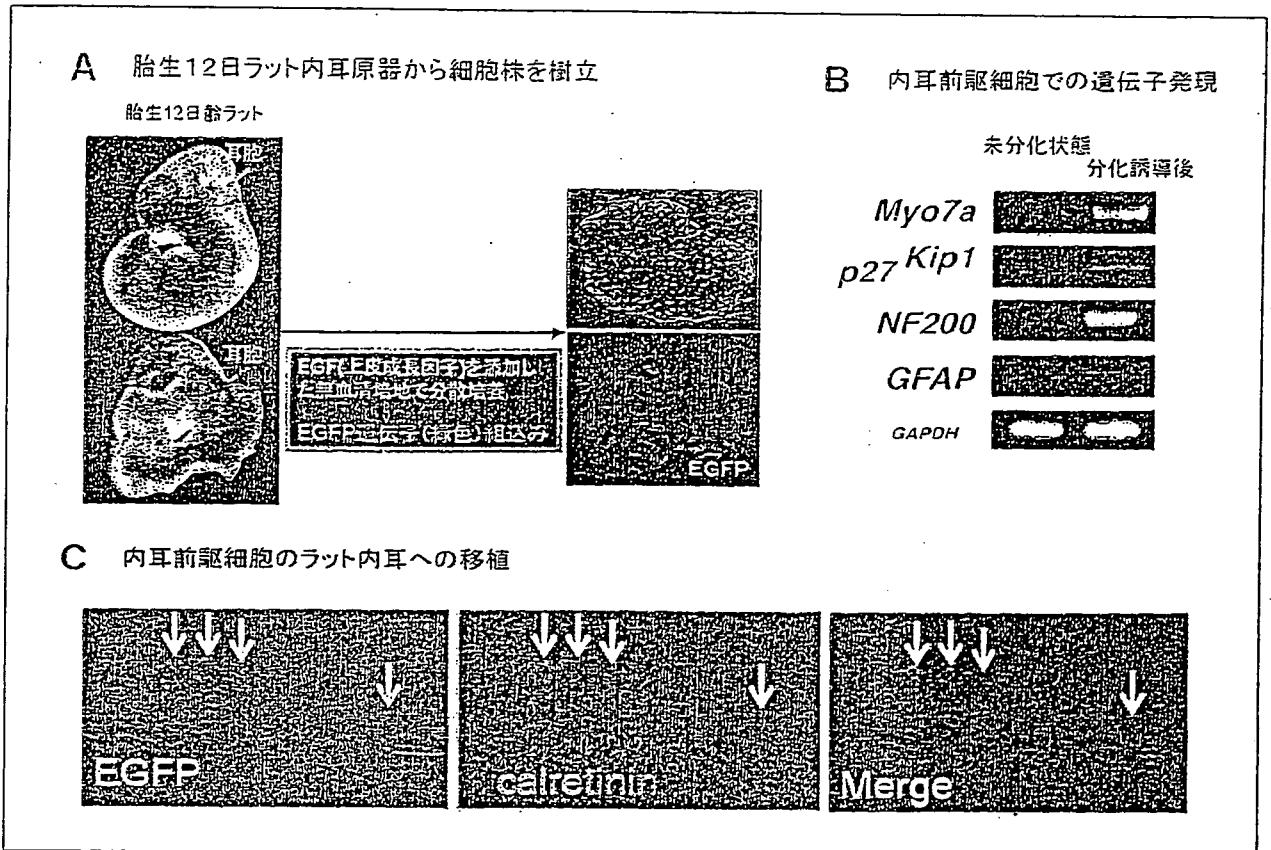
デルを用いた。アミノ配糖体であるカナマイシンと、利尿薬であるエタクリン酸を全身投与することにより、モルモットは 3-4 日で聾となる^{14,15}。この 3 週間後には、ラセン神経節細胞の変性、消失が誘導される¹⁵。このタイミングで、人工内耳手術のアプローチに準じ、蝸牛基底回転に開窓し、同部から蝸牛軸に ES 由来神経前駆細胞を移植した。移植 4 週間後に、ラセン神経を直接電気刺激し、脳波にて脳幹の反応を記録する eABR にて、ラセン神経節機能評価を行った後に内耳組織を採取した。移植細胞を含まない培養液のみを注入した動物をコントロールとした。eABR の閾値は、コントロールでは約 0.9mA 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¹³。

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¹⁶。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ため、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

図4 内耳前駆細胞の樹立とその移植



- A: 胎生 12 日ラットから耳胞 (内耳原器) を取り出し, 分散培養することにより, モノクローナルな細胞株を樹立し, CMV プロモーターに EGFP 遺伝子を組み込んだ。
- B: 培養系で分化誘導することにより, myosin VIIa (Myo7a), p27kip1, neurofilament 200kD (NF200), glial fibrillary acidic protein (GFAP) を発現する。
- C: 障害内耳に移植すると, 蝸牛感覚上皮内に生着し, 蝸牛有毛細胞のマーカーの一つである calretinin を発現した。

シスプラチンを浸透させたジェルフォームを蝸牛正円窓窩に充填し, 閉創した。術後 1-2 週間後には, シスプラチン局所投与を受けた耳では, ほぼ聾になっていることを ABR で確認した。両耳に同様の処置を行い聾としたカニクイザルを作製し, 一側耳にサル ES 由来神経前駆細胞の蝸牛軸への移植を行い, その後, ヒトにおける人工内耳手術と全く同様の方法で人工内耳電極を蝸牛鼓室階に挿入した。術後, 経時的に eABR を人工内耳電極を用いて記録した。術後 1 ヶ月の段階では eABR を記録することはできなかったが, 術後 2 ヶ月後には約 0.7mA で反応を得ることができた。さらに, 術後 3 ヶ月では約 0.5mA で反応記録が可能となり, 機

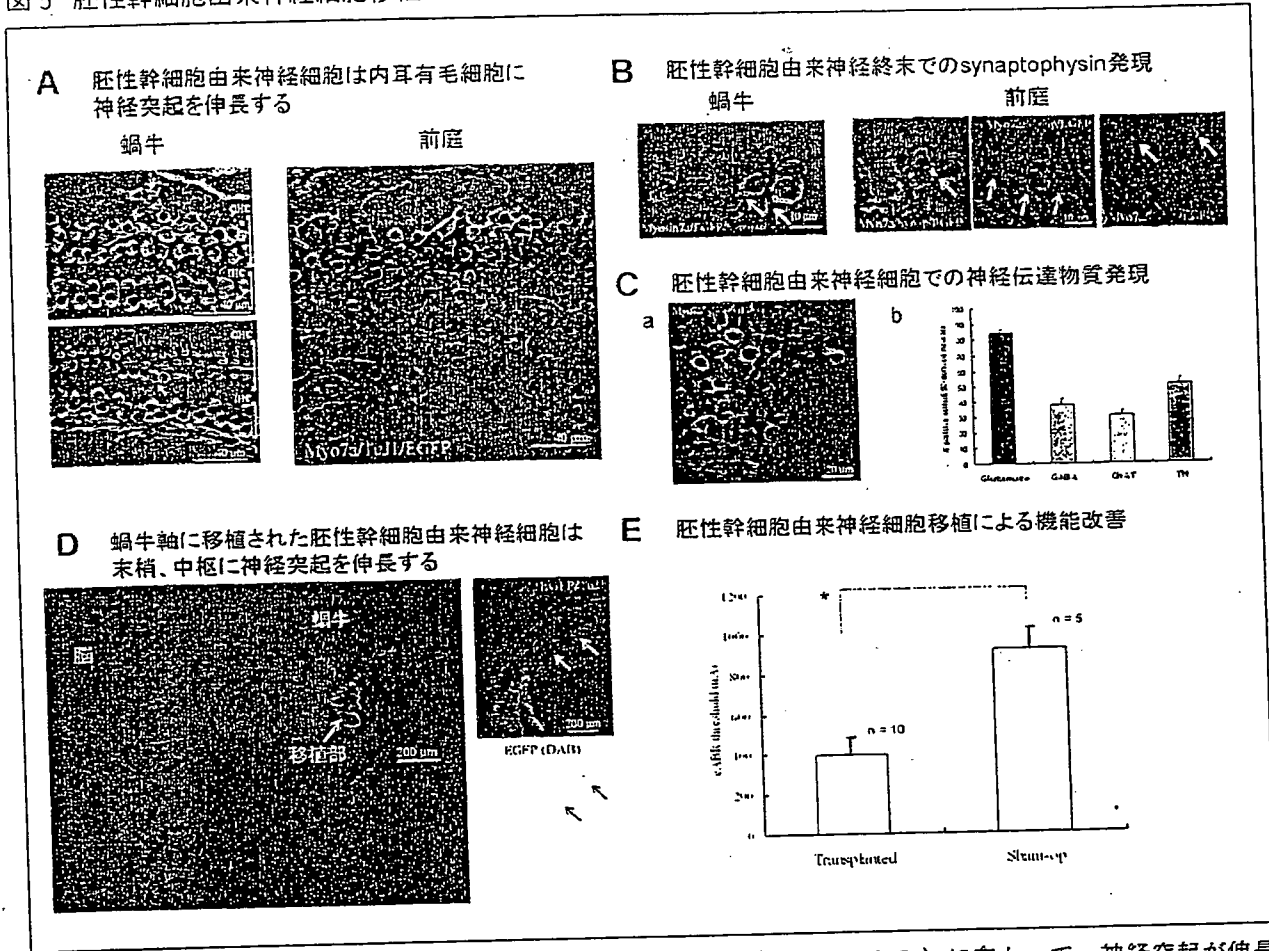
能回復傾向が認められた。この結果をヒトに応用できれば, 人工内耳を使用した言葉の聞き取りも飛躍的に向上するものと期待される。

霊長類を使用した本結果は, 細胞移植によるラセン神経節細胞再生の臨床応用に大きく近づいたものと考えられる。

5. 骨髄由来細胞移植

胚性幹細胞が最も潜在能力の高い細胞であるのに対して, 骨髄由来細胞は最も臨床応用に近い細胞ということが出来る。容易に自己由来の細胞を得ることができ, 体外での培養・増幅についても, 臨床で使用可能な方法が開発されつつある¹⁰⁾。骨髄には, 造血幹細胞, 間葉系幹細

図5 胚性幹細胞由来神経細胞移植



A: 胚性幹細胞由来神経細胞 (緑: EGFP) から内耳有毛細胞 (青: myosin7a) に向かって、神経突起が伸長されている [赤: beta III-tubulin (TuJ1)].

B: 胚性幹細胞由来神経終末 (緑: EGFP) は、内耳有毛細胞 (青: myosin7a) に近接する場所で synaptophysin (赤) を発現している (矢印).

C: 胚性幹細胞由来神経細胞 (緑: EGFP) の一部に NMDA 1型受容体 (赤) 発現を認める (a). 胚性幹細胞由来神経細胞では、glutamate 発現が最も高頻度に認められた.

D: 移植動物の蝸牛軸、脳幹に EGFP 発現を認める (右図).

E: 胚性幹細胞由来神経細胞移植を受けた蝸牛 (Transplanted) は、シャムオペ (Sham-op) 群より電気刺激聴性脳幹反応 (eABR) 閾値が有意に低い.

胞が存在するとされている。造血幹細胞移植は、骨髄移植として広く臨床で用いられている。一方で、聴覚機能における骨髄の関与を示唆する報告もいくつかなされているが¹⁷⁾¹⁸⁾、骨髄由来細胞の蝸牛における役割についての解析はほとんどなされていない。蝸牛における骨髄由来細胞の役割を検討することは、移植細胞として骨髄由来細胞を用いる場合にも、その応用の方向性を含め、有用な情報が期待できる。骨髄由来細胞を移植細胞とする場合の最大の

利点は、自己由来の細胞が使えるという点にある。そこで、われわれは、自己由来骨髄間葉系細胞を移植細胞とした実験を行った。神経への分化を期待し、ラセン神経節および蝸牛神経が存在する蝸牛軸に移植し、組織学的解析を行った。自己由来細胞を用いるため、大型の齧歯類であるチンチラを実験動物として用いた。チンチラの大腿骨から骨髄を採取し、プラスチックシャーレに接着する細胞のみを回収する方法で¹⁹⁾、骨髄由来間葉系細胞の培養を行った。3