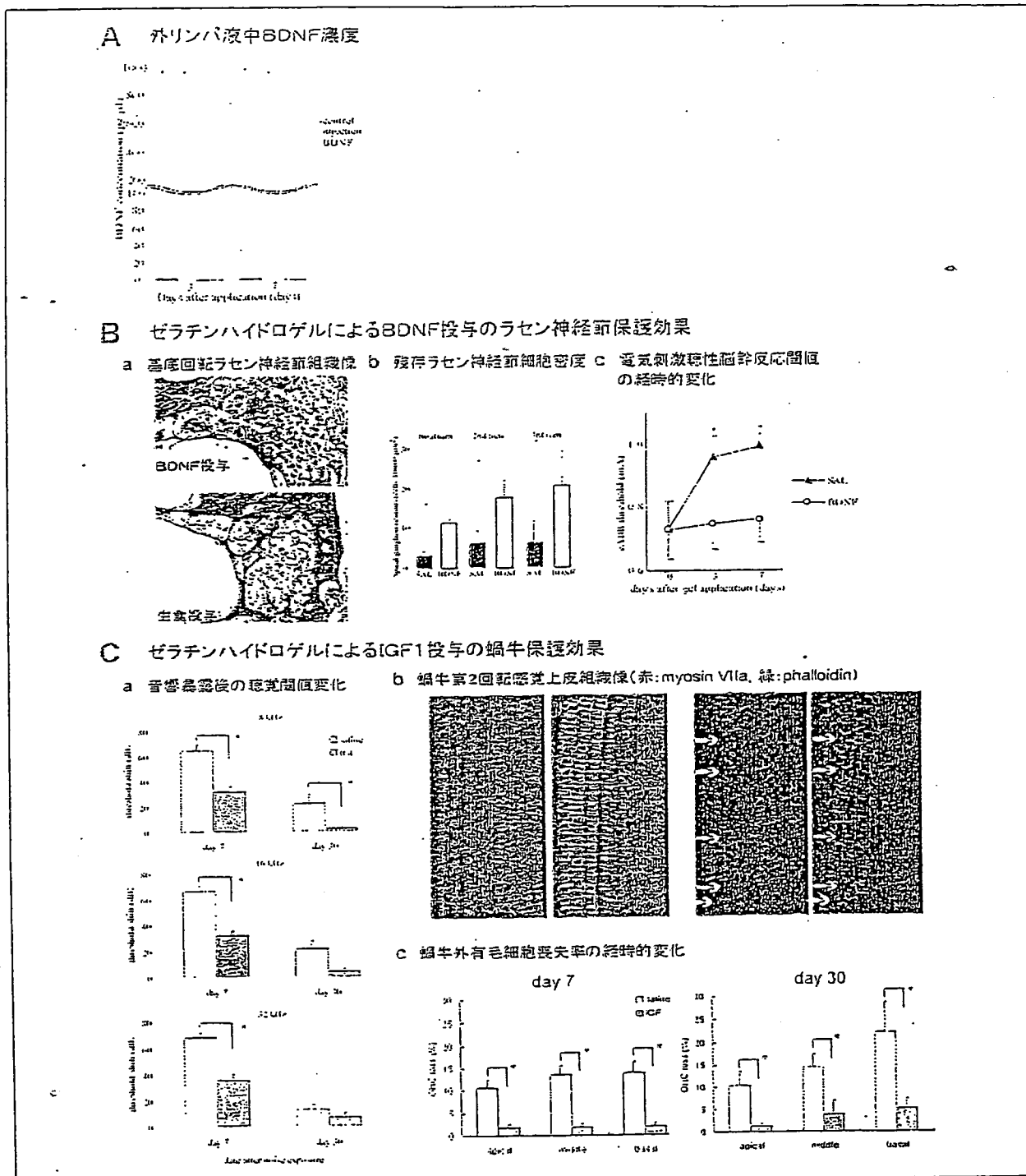


図15 ゼラチンハイドロゲルによる内耳薬物投与



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⁷⁰⁾。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 T, 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, Huibregtse 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⁺-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 PA, Baba K, Kariya S, Paparella MM: Age-related histopathologic changes in the human cochlea: a temporal bone study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131: 897-903, 2004.
- 25) Spicer SS, Schulte BA: 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 VM: 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 WJ: Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 48 (2): 234-239, 2005.
- 30) Tzeng SF, Huang HY: 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 DE, 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 WE: 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 DW, Rubel EW: 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 DN, Kil J, Zinn C, Gultig K, Fero ML, Frost D, Gummer AW, Roberts JM, Rubel EW, Hackney CM, Zenner HP: 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 TS, 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 YS, 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 EP, Arsura M, Cotanche DA: 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 MA, Zhang DS, Garcia-Anoveros J, Hinds PW, Corwin JT, Corey DP, Chen ZY: 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, Fritzsche B, Zackenhaus 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 β -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 β -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) Bermingham 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 HJ, 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 T S, 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 T S, 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 Ito¹, Takayuki Nakagawa¹, Norio Yamamoto²

¹ Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery,
Graduate School of Medicine, Kyoto University

² Department of Medical Chemistry and Molecular Biology,
Graduate School of Medicine, Kyoto University

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, 伊藤壽一

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

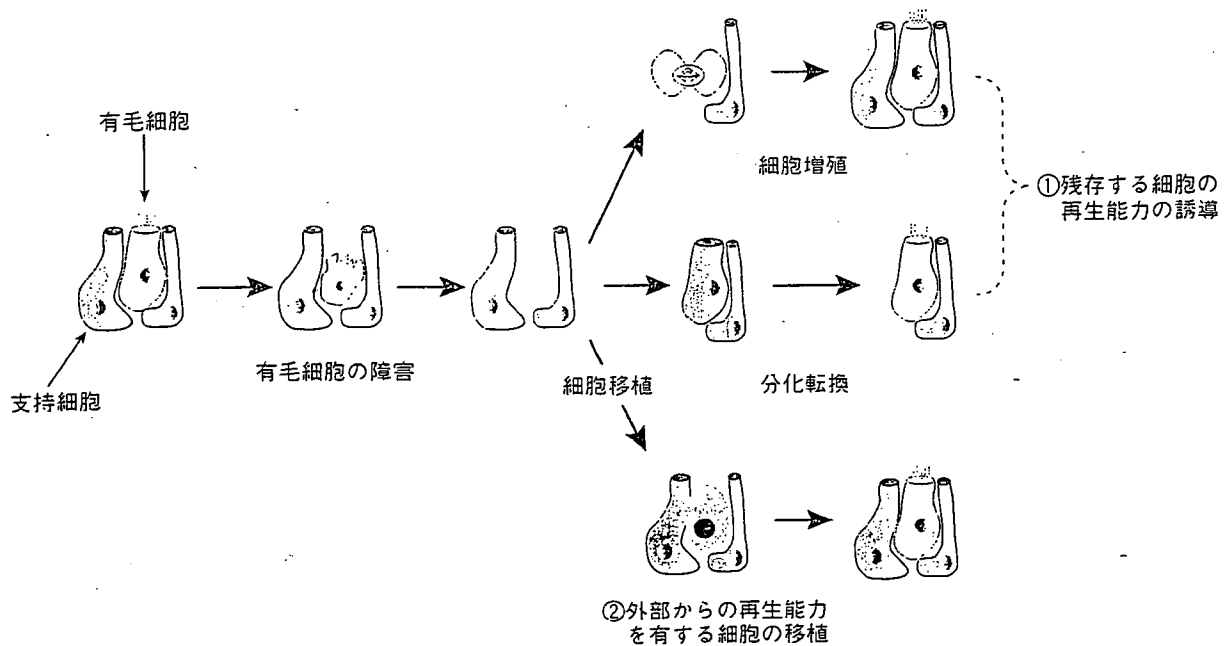
音響刺激は、空気疎密波として、鼓膜を振動させる。鼓膜の振動は、中耳にある3つの耳小骨を介して蝸牛に伝えられる。耳小骨の振動は、蝸牛の感覚上皮（コルチ器）を振動させ、感覚上皮の感覚細胞（有毛細胞）が振動エネルギーを神経信号に変換し、蝸牛軸に存在する蝸牛の一次神経節であるラセン神経節細胞を興奮させ、音響刺激は中枢に伝達される（図）。

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¹⁾。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²⁾、ノッチ情報伝達系が遮断されることにより、支

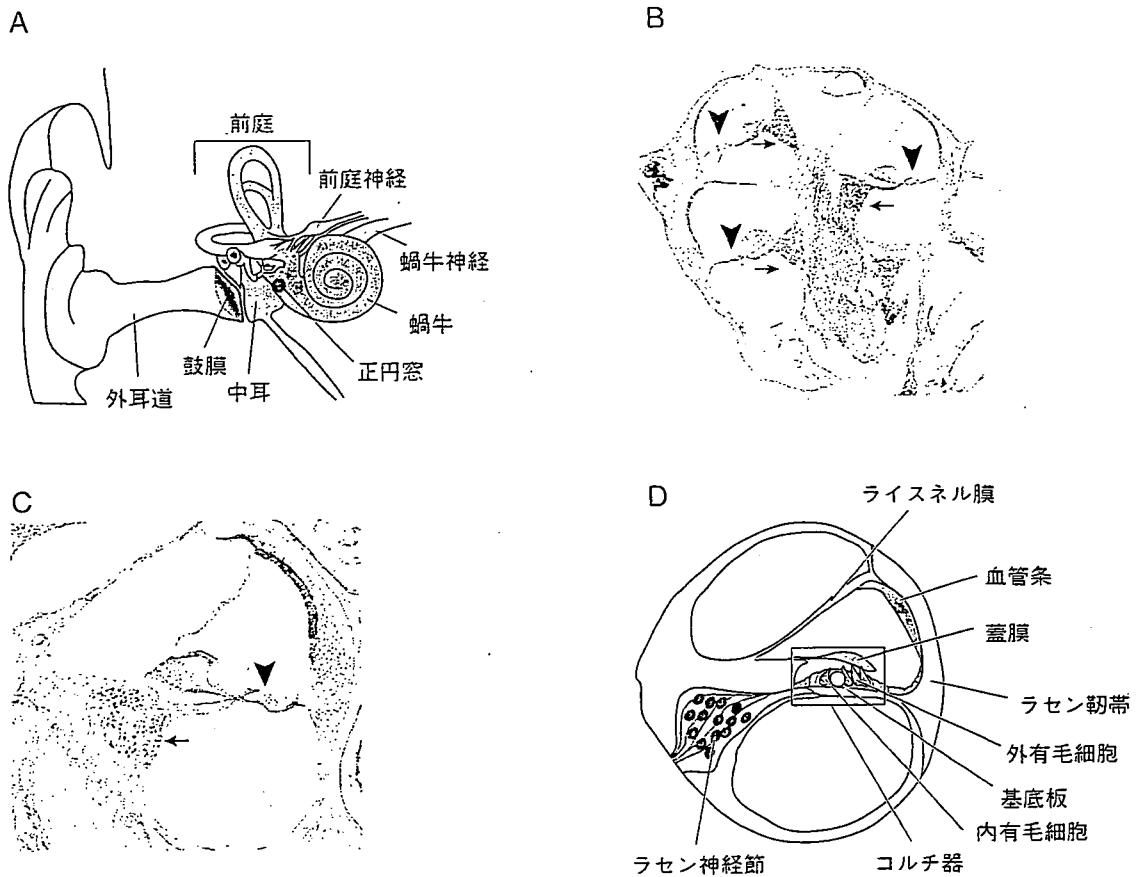


図 内耳、蝸牛の解剖

- 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³⁾。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⁴⁾。哺乳類でも、標的となる分子を操作することにより、同様の戦略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)	DNFB29		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⁵⁾、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⁶⁾。一方、山本ら²⁾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 γ 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⁷⁾。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適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^{Kip1} 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^{Kip1} 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^{Kip1}の発現制御メカニズムとしては、p27^{Kip1}遺伝子からの転写、翻訳レベルとp27^{Kip1}タンパク質の細胞内での分解レベルの2つがある。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1つであるskp2である。skp2はp27^{Kip1}のエピキチン化に関与し、skp2などの働きでエピキチンを付加されたp27^{Kip1}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ことで、内耳感覚上皮で細胞増殖が活発な時期には、skp2によりp27^{Kip1}の発現が抑制されており、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^{Kip1}の発現は支持細胞のみに限定され、有毛細胞では消失することが明らかになった。この有毛細胞でのp27の発現の消失にskp2は関与せず⁸⁾、遺伝子からの転写レベルよりも上流でp27^{Kip1}の発現が制御されている。したがって、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。養田らは、ウイルスベクターを用いたskp2の内耳感覚上皮での過剰発現が細胞増殖を誘導すると報告している⁹⁾。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¹⁰⁾、今後の検討が注目される。

内耳再生への試み②：細胞移植

哺乳類内耳の再生能力が限られているのならば、再生能力のある細胞を内耳に送り込んでやればよいのではないか、という発想で内耳への細胞移植実験は開始された。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。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認められた。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であるミオシン7aを発現している所見が認められた¹¹⁾。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できるということを示しており、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。内耳組織由来の細胞や胚

性幹細胞由来の細胞移植でも、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、機能再生に関連する報告はなされていない。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。

細胞移植による内耳再生研究では、ラセン神経節細胞が主な研究対象とされている。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により、細胞移植によるラセン神経節細胞再生に関する研究が活発に行われている。種々の細胞が移植細胞のソースとして用いられているが、最も神経細胞の再生能力が高い細胞が胚性幹細胞（ES細胞）といえる。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行われている。最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認められているという点である。

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ベ（偽手術）群よりも有意に機能が回復していることが認められた¹²⁾。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。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を検討する必要がある。

臨床応用への展望

第一に内耳に内在する細胞を活性化し、内耳の再生を誘導し、内耳性難聴の治療に応用する試みについては、内耳再生を妨げている因子を抑制し、再生を誘導する方法が最も臨床に近い方法といえる。しかしながら、この方法による機能回復に関する知見は、報告されておらず、今後の課題といえる。

細胞移植による内耳再生では、人工内耳とも深いかわりをもつラセン神経節細胞の再生が最も臨床応用に近い位置にある。すでに霊長類での実験が開始されている。最大の問題は、移植細胞ソースにかかわる倫理的な面といえる。ES細胞は他の幹細胞に比べて、均一な性質をもつ細胞を大量に準備することが可能であり、ラセン神経節細胞再生に関しても現在のところ最も能力の高い細胞といえる。しかし、わが国では、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い。このような背景から、ES細胞をソースとした研究で得られた成果を他の自己由来細胞で実現しようとする方向性が模索されている。最近、線維芽細胞からES細胞と同様の性質をもった細胞をつくることが可能であることも報告されており¹³⁾、自己由来細胞からES細胞様の細胞をつくるのが可能となれば、大きく展開は変わる可能性がある。

文献

- 1) Kelly, M. W. : Int. J. Dev. Biol. 51 : 571-583. 2007
- 2) Yamamoto, N. et al. : J. Mol. Med. 84 : 37-45. 2006
- 3) Lowenheim, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 : 4084-4088. 1999
- 4) Stone, J. S. & Cotanche, D. A. : Int. J. Dev. Biol. 51 : 633-647. 2007
- 5) Kawamoto, K. et al. : J. Neurosci. 23 : 4395-4400. 2003

- 6) Izumikawa, M. et al. : Nature Med. 11 : 271-276. 2005
- 7) Hori, R. et al. : Neuroreport, in press (2007)
- 8) Dong, Y. et al. : Neuroreport. 14 : 759-761. 2003
- 9) Minoda, R. et al. : Hear. Res. 232 : 44-51. 2007
- 10) Laine, H. et al. : J. Neurosci. 27 : 1434-1444. 2007
- 11) Tateya, I. et al. : Neuroreport, 14 : 1677-1681. 2003
- 12) Okano, T. et al. : Neuroreport. 16 : 1919-1922. 2005
- 13) Takahashi, K. et al. : Cell. 126 : 663-676. 2006

参考文献

『Development of the Inner Ear』 Kelley, M. W. et al., Springer, 2005

『ここまで進んだ幹細胞研究と再生医療 2006』(田賀哲也, 中畑龍俊/編), 実験医学増刊号, Vol.24 No.2, 羊土社, 2006

『中枢神経の機能再生—細胞治療と人工臓器—』, Medical Bio, オーム社, 2007年7月号

■筆頭著者プロフィール

中川隆之 : 1989年大阪市立大学医学部卒業。'95年同大学院医学研究科修了。内耳のアポトーシス研究を行い、医学博士取得。2001年より京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科助教。現在、内耳再生、特に新しい感音難聴治療方法の開発を目的として研究を行っている。

コメディカル養成校での授業にご活用ください

発行 羊土社

国試で問われる必須ポイントが **どろどろ** 身につく!

PT・OT 必修シリーズ

新シリーズ創刊!

消^って忘れない

生理学 要点整理
ノート

編集/佐々木 誠一 (茨城県立医療大学医科学センター)

ポイントを押さえた、よりスムーズな授業の進行に役立ちます!

■ 定価 (本体3,600円+税) ■ B5判 ■ 215頁+別冊64頁 ■ ISBN978-4-7581-0781-5

