

Fig. 11 Experimental results of power spectrum for various distance D .

人工蝸牛管開発—数値解析—

分担研究者 和田 仁 東北大学大学院工学研究科

研究要旨：圧電素子を用いた人工感覚上皮の蝸牛メカニクス、特にコルチ器基板振動に与える影響を調べることを目的とし、モルモット蝸牛におけるコルチ器振動数値解析モデルを確立し、同モデルを用いて、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）を基板上に留置した場合の振動解析を行った。結果、人工感覚上皮の素材に関する条件が明らかとなった。

A. 研究の背景と目的

空気の疎密波である音は、外耳道より入射し、鼓膜で機械的振動に変換される。この振動は耳小骨連鎖を経て、内耳の蝸牛へ伝達される。蝸牛は内部がリンパ液で満たされた管状の器官であり、伝達された振動はリンパ液の圧力変動となり、基板とその上に存在するコルチ器（図 1）を振動させる。コルチ器には内有毛細胞（Inner hair cell: IHC）、および外有毛細胞（Outer hair cell: OHC）とよばれる感覚細胞が存在する。コルチ器の振動に伴い蓋膜と網状膜との間にせん断運動が生じ、IHC および OHC の聴毛が変位し、それぞれの細胞内電位に変化が生じる。この電位の変化に従い、IHC はその基部から聴神経にインパルスを発火し、それが脳へ伝達されることで、我々は音を感知する。一方、OHC は、自身の細胞長を変化させ、コルチ器の振動を増幅すると考えられている。

本研究事業では、ナノテクノロジー、再生医学を融合した人工内耳・人工蝸牛の開発を行うが、開発にあたり基板、およびコルチ器の振動特性を理解する必要がある。しかし、実験動物を用いて基板、およびコルチ器の振動を直接計測することは蝸牛の脆弱性と振動の微小さゆえ困難である。これに対して、モデルを用いた数値解析は、生理学的条件の影響を受けず、これらの挙動を定量的に明らかにできるため有用であると考えられる。

そこで本研究では、モルモット蝸牛頂部における基板、およびコルチ器の複雑な構造を考慮した有限要素モデルを構築し、振動解析を行った。そして、このモデルを用いて人工感覚上皮を留置した場合の基板、およびコルチ器の振動挙動を解析し、人工感覚上皮の適合性を検討した。

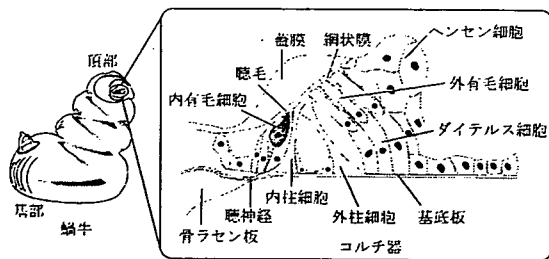


図 1. モルモット蝸牛頂部におけるコルチ器断面の模式図。

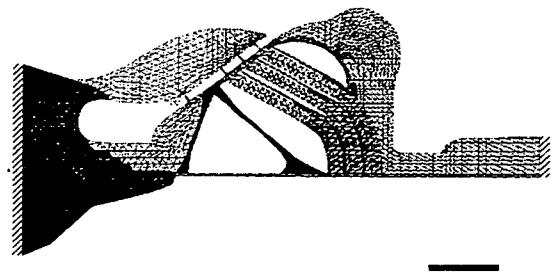


図 2. モルモット蝸牛頂部コルチ器の有限要素モデル。節点数, 要素数はそれぞれ 1764, 2987 である。斜線部は固定端を表す。スケールバーは 50 μm 。

表 1. コルチ器モデルに適用した物性値。

	ヤング率 (Pa)	ポアソン比
ヘンセン細胞	1.0×10^3	0.49
蓋膜	1.0×10^4	0.49
内有毛細胞	1.0×10^4	0.49
外有毛細胞	1.0×10^4	0.49
基底板	1.0×10^5	0.30
ダイテルス細胞	1.0×10^7	0.30
内柱細胞	1.0×10^9	0.30
外柱細胞	1.0×10^9	0.30
網状膜	1.0×10^9	0.30
骨ラセン板	2.0×10^{10}	0.30

B. 研究方法

B.1. モルモット蝸牛頂部コルチ器のモデルの構築

モルモット蝸牛の基部から 17 mm の部位 (特徴周波数: 0.5 kHz) におけるコルチ器の形状の計測値 (Ulfendahl, personal communication) を参考に、コルチ器の複雑な構造を再現した二次元有限要素モデルを構築した (図 2)。コルチ器各部の物性値は、報告されている計測値を参考に決定した。基底板の物性値は、コルチ器の特徴周波数が 0.5 kHz になるよう決定した。モデルに適用した物性値を表 1 に示す。また、コルチ器とその周囲のリンパ液との相互作用を再現するため、コルチ器の上部に位置する前庭階、基底板の下部に位置する鼓室階、および蓋膜下腔のリンパ液をモデル化した。

B.2. コルチ器の振動の解析

コルチ器モデルに Newmark- β 法, リンパ液モデルに Marker-and-Cell (MAC) 法を用いてモデルの振動挙動の解析を行った。音刺激に起因する駆動力は前庭階, および鼓室階のリンパ液モデルに正弦波状の圧力変動を加えることにより与えた。コルチ器モデルとリンパ液モデル間の境界において, それぞれのモデルより得られた圧力や速度を受け渡すことにより, リンパ液がコルチ器の振動に及ぼす影響を考慮した。

B.3. 人工感覚上皮の適合性の検討

本研究事業では, 病変により有毛細胞の機能が失われた場合を想定して, 圧電性を有するポリマーであるポリフッ化ビニリデン (PVDF) を基板上に留置し, 機械的振動を電気信号に変換する人工感覚上皮の構築を試みる。動物実験に先立って, 構築したコルチ器の有限要素モデルを用いて, 基板上にポリマーを留置した場合の振動解析を行った。モデル構築の過程, および解析用プログラムにおける技術的な制約から, コルチ器モデルの形状は変更せず, 基板の部分に割り当てる物性値を変更することにより, 基板上にポリマーを留置した状況を再現することを試みた。すなわち, 基板とポリマーを組合せはりとしてその曲げ剛性を見積もり, モデルの基板の部分の組合

表 2: 基板上にポリマーを留置した場合の, モデルの基板に割り当てた等価なヤング率。

ポリマーの厚さ (μm)	等価なヤング率 (Pa)
9.0	1.8×10^{11}
40	1.6×10^{13}
80	1.3×10^{14}

せはりとして等価な曲げ剛性を有するように, その部分のヤング率を変更した。ポリマーの厚さが 9.0 μm , 40 μm , および 80 μm の場合について, モデルの基板に割り当てた等価なヤング率を表 2 に示す。各場合について振動の解析を行い, 得られた特性から適合性を評価した。

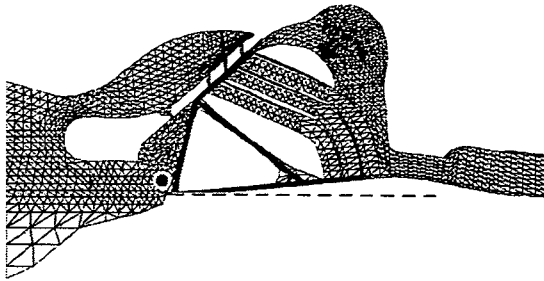


図3. 60 dB SPL, 500 Hz の圧力変動を入力した際のコルチ器モデルの振動様式. 各部の変位は 400 倍に拡大している. 赤線は基底板, 内柱細胞, 外柱細胞, および網状膜から成る構造を示す. 内柱細胞基部付近の赤丸はコルチ器モデルの回転軸を示す.

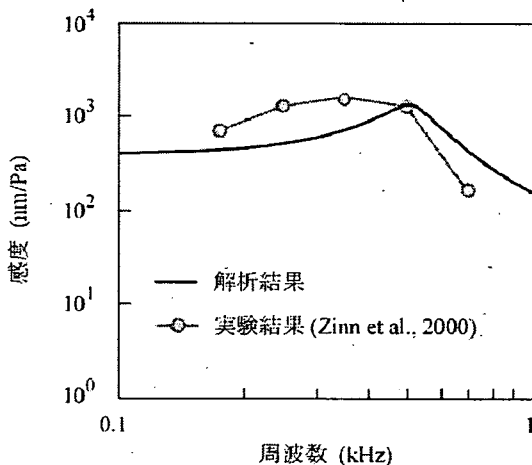


図4. 60 dB SPL におけるヘンセン細胞上部の変位の周波数特性. 横軸は入力周波数を示し, 縦軸は変位を入力音圧で除した感度を示す. 黒線は解析結果を示し, 赤丸は Zinn らによるモルモット蝸牛頂部における計測結果を示す.

C. 研究結果

C.1. コルチ器の振動の解析

60 dB SPL, 500 Hz の圧力変動を入力した際のコルチ器モデルの振動様式を図3に示す. 各部の変位は 400 倍に拡大している. 振動の間, 基底板, 内柱細胞, 外柱細胞, および網状膜から成る内部構造が保たれ, コルチ器モデルは内柱細胞の基部付近を中心とする回転運動をした. この計算結果は, Hemmert らが 2000 年に行ったモルモット蝸牛頂部におけるコルチ器の振動様式の計測結果と一致した. また, 60 dB SPL におけるヘンセン細胞上部の変位の周波数特性を図4に示す. 図において, 横軸は入力周波数であり, 縦軸は変位を入力音圧で除した感度である. 図中の黒線は解析結果を示し, 赤丸は Zinn らが 2000 年に行ったモルモット蝸牛頂部における計測結果を示す. 解析結果は計測結果と同様の傾向を示した. これらの結果より, 構築したモデルの妥当性が確認された.

C.2. 人工感覚上皮の適合性の検討

60 dB SPL における基底板中央部の変位の周波数特性を図5に示す. 図中の黒線は基底板上にポリマーを留置しない場合の解析結果を示し, 青, 赤, 緑線はそれぞれポリマーの厚さが 9.0 μm , 40 μm , および 80 μm の場合の解析結果を示す. ポリマーを留置した場合にはモルモットの可聴周波数

の上限まで解析を行ったが、感度は全体に低かった。最も厚さが小さい9.0 μm の場合で、ポリマーを留置しない場合に比べて 10^6 分の 1 程度であった。厚さが 40 μm の場合、感度はさらに 40 分の 1 程度、厚さが 80 μm の場合、さらにその 3 分の 1 程度であった。

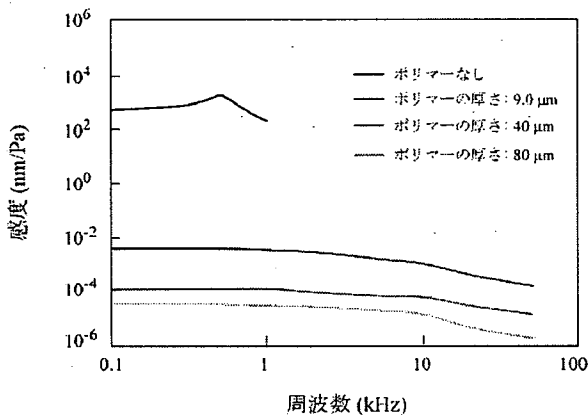


図 5. 60 dB SPL における基底板中央部の変位の周波数特性。横軸は入力周波数を示し、縦軸は変位を入力音圧で除した感度を示す。黒線は基底板上にポリマーを留置しない場合の解析結果を示し、青、赤、緑線はそれぞれポリマーの厚さが 9.0 μm 、40 μm 、および 80 μm の場合の解析結果を示す。

D. 考察

基底板上に人工感覚上皮となるポリマーを留置した場合の解析結果について、基底板の感度が低かった理由は、ポリマーの硬さ、および厚さが大きかったためと考えられる。基底板とポリマーからなる組み合わせはりの曲げ剛性を見積もるも際、ポリマーのヤング率が基底板のヤング率の

2×10^4 倍と大きく、さらにポリマーの厚さが基底板の厚さの 5-40 倍であった。曲げ剛性はヤング率に比例し、かつ厚さの 3 乗に比例して大きくなる。このため、ポリマーの留置を考慮してモデルの基底板の部分に割り当てた等価なヤング率 (表 2) が、当初のヤング率の 10^6 - 10^9 倍程度と大きくなった。この結果、感度がヤング率の増加とほぼ同じ割合で低下したものと考えられる。以上の理由から、人工感覚上皮の設計にあたっては、ポリマーの材質、および厚さを検討する必要があると考えられる。

今回の解析により、低周波数の音を受容する蝸牛頂部における基底板の振動特性が予測された。高周波数の音を受容する基部においては、頂部に比べて基底板の厚さが 5 倍程度、またヤング率は 10 倍程度と見積もられる。これより、基底板自身の曲げ剛性が頂部に比べて 10^3 倍程度大きくなる。今回と同じ条件でポリマーを留置した場合、曲げ剛性は 10^3 - 10^6 倍増加し、感度は 10^3 分の 1 - 10^6 分の 1 程度に低下するものと予測される。来年度、新たにモルモット蝸牛基部コルチ器のモデルを構築し、今回と同様の解析を行う予定である。

E. 結論

1. 構築したコルチ器モデルの妥当性が確認された。

2. 人工感覚上皮として用いるポリマーの材質、および厚さを検討する必要がある。

Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region.

F. 研究発表

論文

1. Yoko Kitsunai, Naohiro Yoshida, Michio Murakoshi, Koji Iida, Shun Kumano, Toshimitsu Kobayashi and Hiroshi Wada, Effects of heat stress on filamentous actin and prestin of outer hair cells in mice. Brain Research, 1177: 47 - 58. 2007
2. Hiroshi Wada, Recent Findings on Our Auditory System: It Is Highly Sensitive Owing to the Motility of Sensory Cells. International Journal of Acoustics and Vibration, 12, 75 - 82. 2007

4. Michio Murakoshi, Yoko Kitsunai, Koji Iida, Shun Kumano, Toshimitsu Kobayashi, Hiroshi Wada, Heat-stress actuated mechanism of the inner ear protecting it from traumatic noise exposure. Third Asian Pacific Conference on Biomechanics.
5. Michio Murakoshi, Yoko Kitsunai, Naohiro Yoshida, Koji Iida, Shun Kumano, Toshimitsu Kobayashi, Hiroshi Wada, Heat-stress actuated protective mechanism of the inner ear against noise-induced hearing loss. 19th International Congress on Acoustics.

学会発表

1. 和田 仁, 吉田尚弘, 小林俊光. 音響外傷からの内耳保護メカニズム. 第52回日本聴覚医学会総会ならびに学術講演会.
2. Hiroshi Wada, Structure and function of human auditory system: its high sensitivity is achieved by cochlear amplification. The 3rd Tohoku-NUS Joint
3. Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

論文

著者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号・頁	出版年
伊藤壽一、中川隆之、 山本典生	内耳障害への再生医学的アプローチ	最新医学	62130-169	2007
中川隆之、吉川弥生、 伊藤壽一	内耳性難聴：新しい治療法 開発への展望	実験医学	25:3052 -3057	2007
Sharif S, Nakagawa T, Ohno T, Matsumoto M, Kita T, Riazuddin S, Ito J.	The potential use of bone marrow stromal cells for cochlear cell therapy.	Neuroreport	18: 351-354	2007
Yoko Kitsunai, Naohiro Yoshida, Michio Murakoshi, Koji Iida, Shun Kumano, Toshimitsu Kobayashi, Hiroshi Wada	Effects of heat stress on filamentous actin and prestin of outer hair cells in mice.	Brain Research,	1177:47- 58	2007
Hiroshi Wada	Recent Findings on Our Auditory System: It Is Highly Sensitive Owing to the Motility of Sensory Cells.	International Journal of Acoustics and Vibration	12: 75 - 82	2007

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

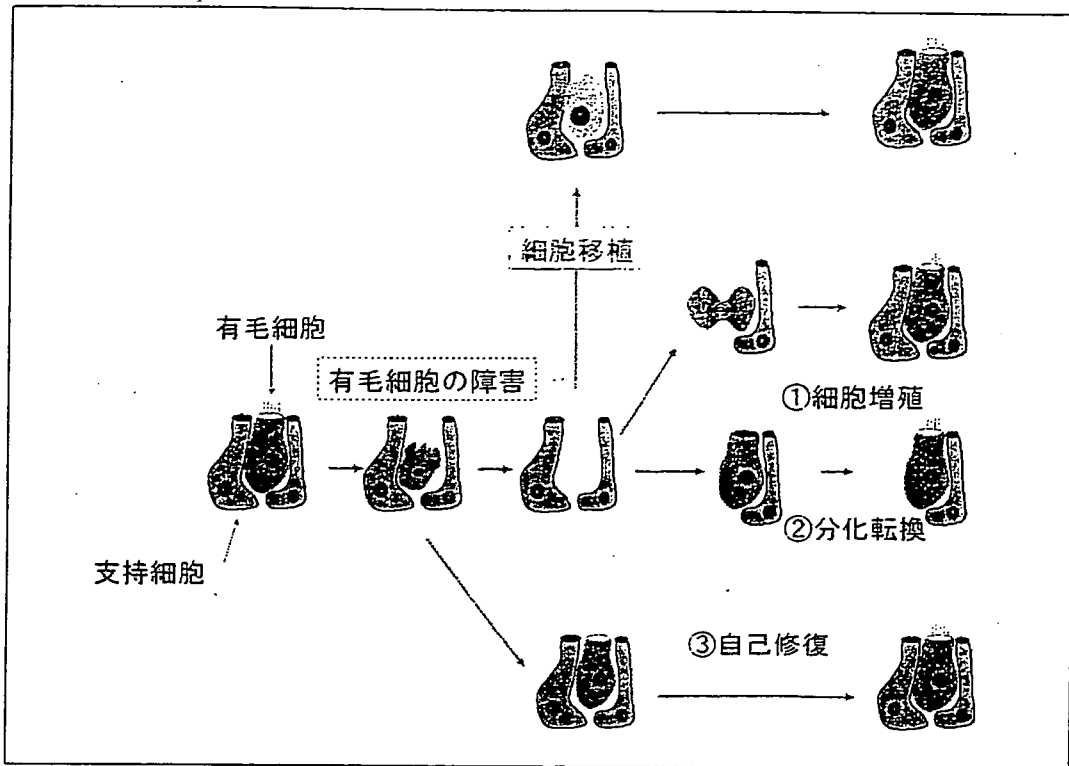
I. 緒 言

- 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。筆者はわが国で最も多くの人工内耳手術を手がけてきた。人工内耳は確かに高度難聴者に対する福音であるが、いくつかの疑問が生じる。人工内耳手術を受けた人々の聴覚はどの程度まで回復しているのか、本当に満足しうる状態か。また、1 万個以上あり、絶妙な配置で音・言語の解析をする内耳有毛細胞に対し、20 本程度の人工内耳電極でその機能を代用できるものであろうかなどという点である。また、人工内耳は海外からの輸入医療であり、われわれのオリジナリティーはない。

障害を受けた内耳有毛細胞を再生させて機能

図1 内耳再生への戦略



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¹⁾。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²⁾。これらの所見は、内耳に対する細胞移植医療の可能性を示すものである。

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

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

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

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

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

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

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

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

3) 内耳薬物投与システム開発

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

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

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

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

II. 細胞移植による内耳再生

1. 内耳細胞移植技術の開発

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

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

移植細胞としては、green fluorescence protein (GFP)-transgenic mouse 由来の神経幹細胞を用いた。より幼弱な細胞の方が分化的多様性を持つと考え、胎仔間脳由来の神経幹細胞を移植細胞とした。移植方法としては、蝸牛の側壁から直接蝸牛内に細胞を注入する方法と、半規管から細胞を注入する方法を用いた(図2A)。マウス蝸牛では、蝸牛基底回転上を蝸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

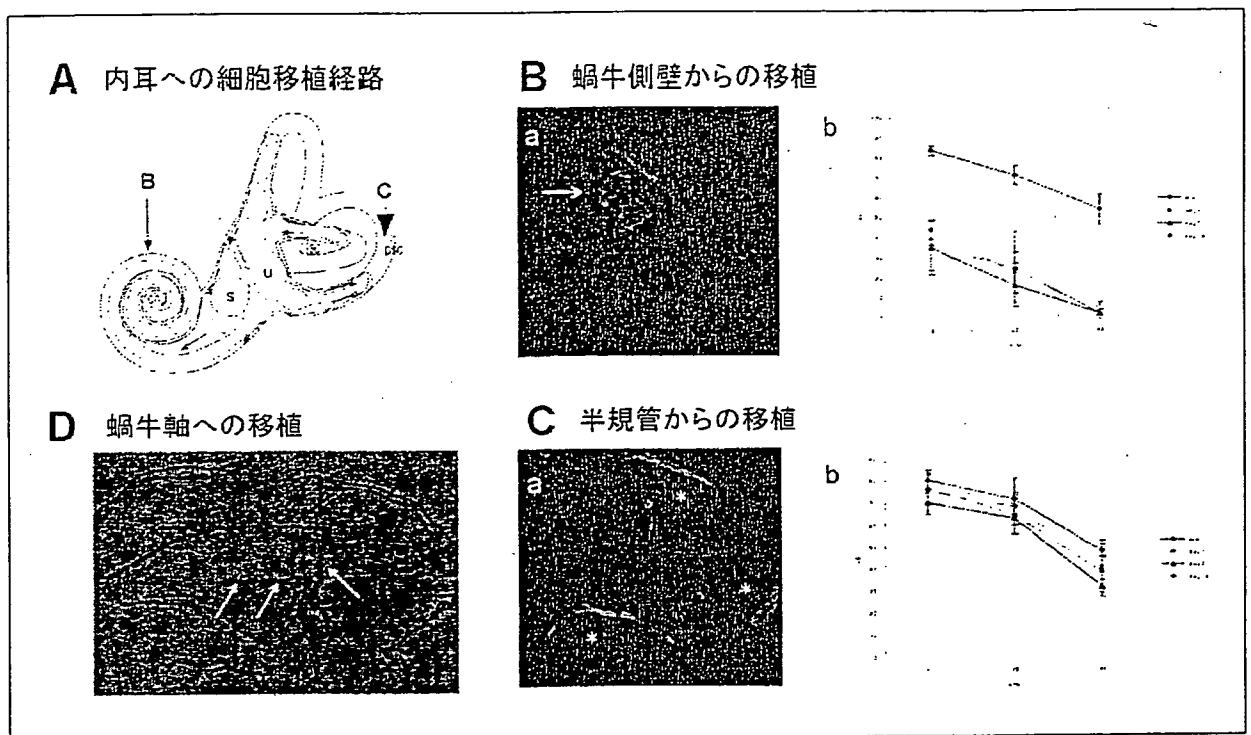
神経幹細胞の内耳移植細胞としての能力を評価する目的で、生後3週の内耳機能の成熟したマウスに前処置を加えることなく、半規管からGFPにて標識した胎仔間脳由来の神経幹細胞を移植し、4週間後に組織学的解析を行った。移植細胞は蝸牛の外リンパ腔に認められ、蝸牛組織内に侵入する細胞は認められなかった(図3A)。網膜への移植実験でも、障害を惹起していない正常の網膜には、神経幹細胞は侵入しないことが示されており、これに合致する所見と考えられる。一方、移植細胞は、蝸牛の基底

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

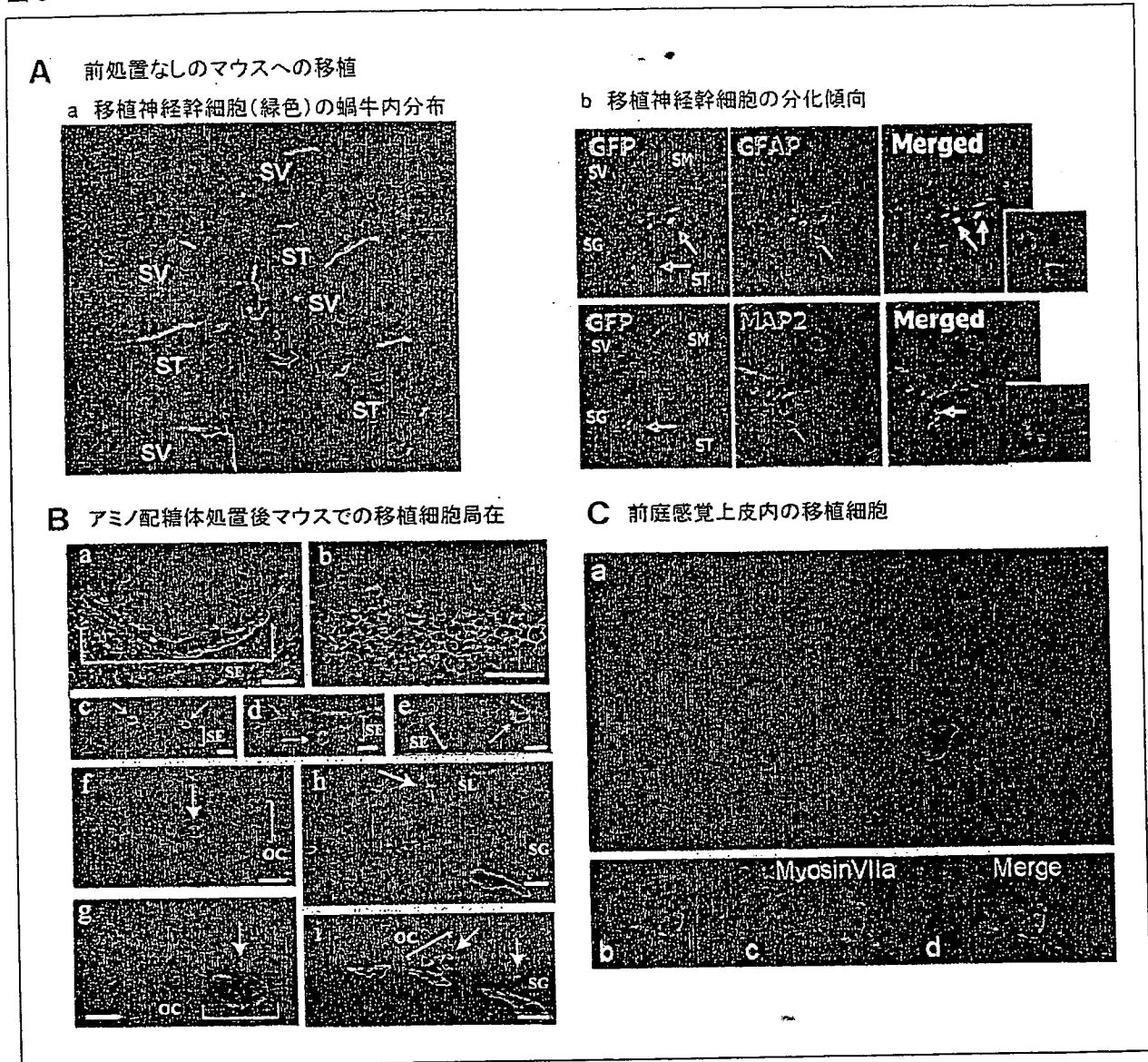
内耳再生を目的とした移植細胞について考えた場合、最も理想的な細胞ソースは内耳由来細胞であり、より未熟な胎児から採取された細胞が望ましい。われわれは「内耳幹細胞」、「内耳前駆細胞」とも呼べる細胞が分離・培養でき、また内耳への細胞移植のドナーとして使用できるかを検討した。

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わからない。

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⁸⁾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ーである GFAP および神経のマーカーである MAP2 陽性細胞を認める (b). SV: 前庭階, ST: 鼓室階, SM: 中央階, SG: ラセン神経節

B: 卵形嚢 (a-e) に移植細胞 (緑) を認め, 感覚上皮 (c), 上皮内 (d-e) に局在を認める. コルチ器 (f-i), ラセン線 (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: ラセン線, 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), 有毛細胞のマーカーである Myosin VIIa 発現を認めた (b-d).

の細胞由来の細胞株は, 培養状態では神経幹細胞のマーカー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) のマーカータンパクを発現す

る細胞が出現した (図4B). この結果から, この細胞株は多能性を持つ細胞すなわち, 有毛細胞, 支持細胞, 神経細胞, グリアに分化する能力を持つ細胞であり, 内耳 (感覚器) 前駆細胞と考えられた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、有毛細胞の元来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^{14,15}。したがって、ES 由来神経前駆細胞は、内耳の一次神経節細胞再生のソースとして、高い潜在能力を有する細胞ということができる。

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¹⁵。

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

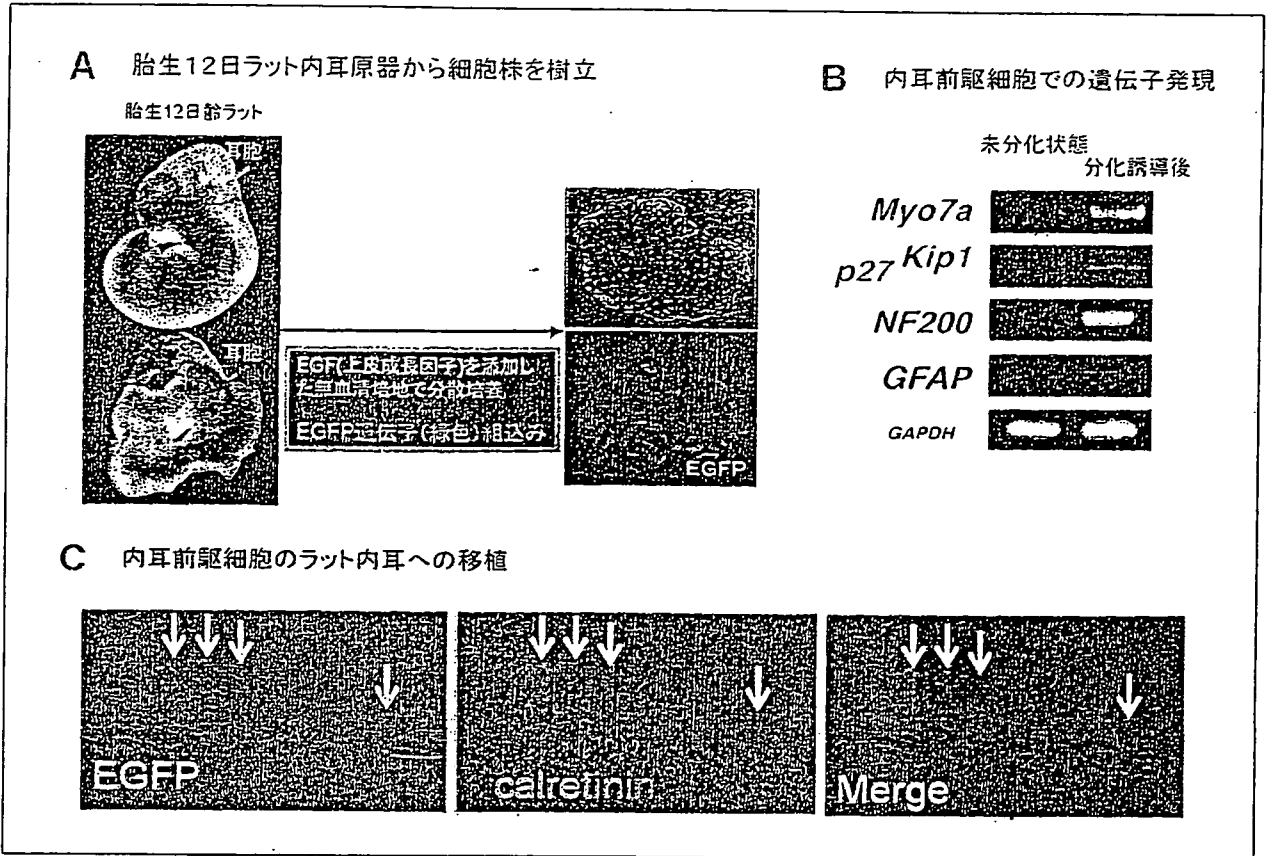
デルを用いた。アミノ配糖体であるカナマイシンと、利尿薬であるエタクリン酸を全身投与することにより、モルモットは 3-4 日で聾となる^{16,17}。この 3 週間後には、ラセン神経節細胞の変性、消失が誘導される¹⁵。このタイミングで、人工内耳手術のアプローチに準じ、蝸牛基底回転に開窓し、同部から蝸牛軸に ES 由来神経前駆細胞を移植した。移植 4 週間後に、ラセン神経を直接電気刺激し、脳波にて脳幹の反応を記録する eABR にて、ラセン神経節機能評価を行った後に内耳組織を採取した。移植細胞を含まない培養液のみを注入した動物をコントロールとした。eABR の閾値は、コントロールでは約 0.9mA 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¹⁵。

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¹⁸。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もので、まずサルの難聴モデルを作製した。耳毒性薬物であるシスプラチンをサルの内耳へ局所投与することにより、聾とするモデルを開発した。ヒトにおける人工内耳手術と同様のアプローチ、すなわち、後下鼓室開放法にて、サル蝸牛正円窓を明視下においた。齧歯類の実験では強いラセン神経節細胞障害作用を持つことが明らかである

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

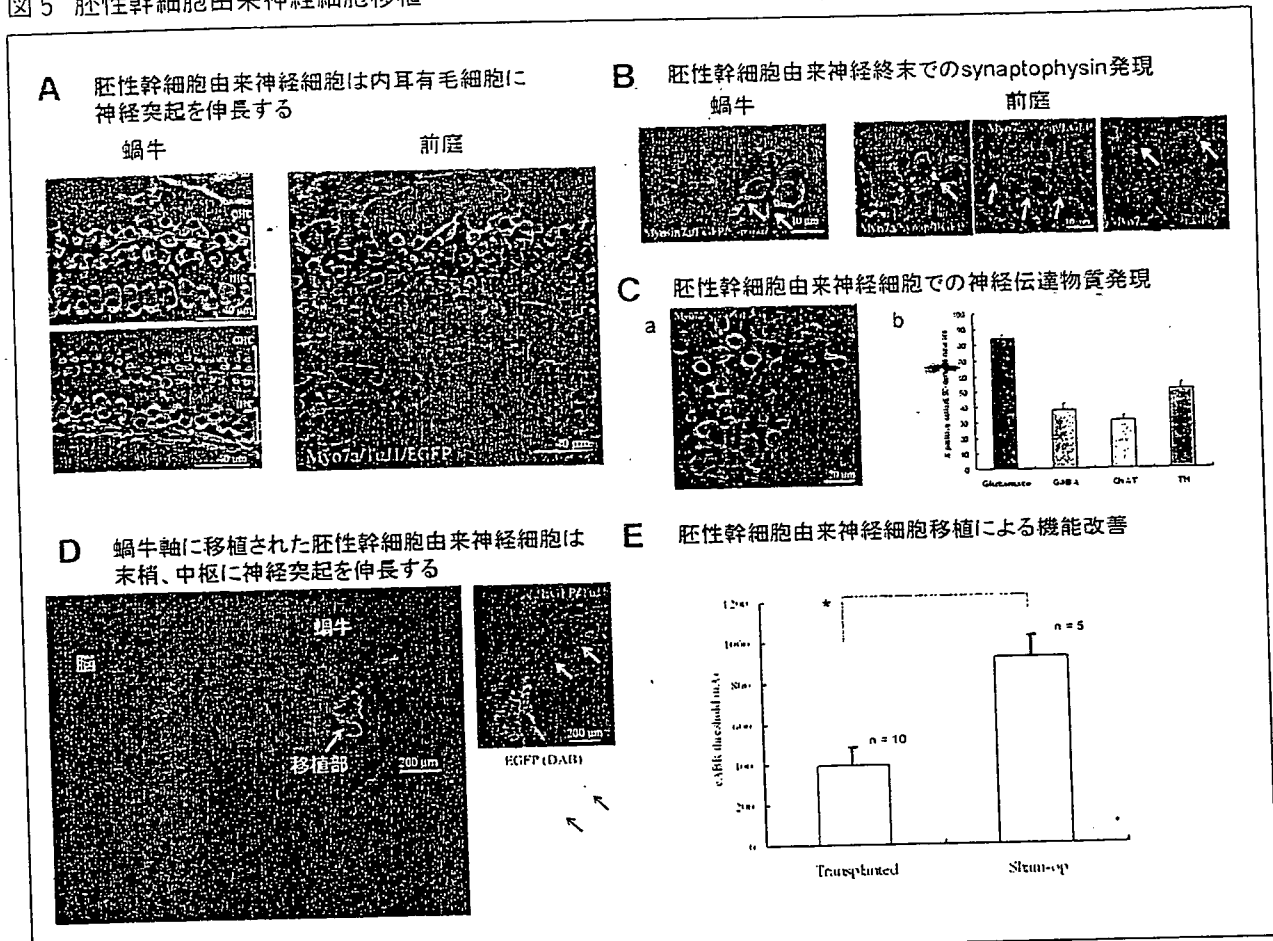
能回復傾向が認められた。この結果をヒトに応用できれば, 人工内耳を使用した言葉の聞き取りも飛躍的に向上するものと期待される。

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できる。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, シヤムオベ (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¹⁹⁾、骨髄由来間葉系細胞の培養を行った。3