

回のパッセージを経た後に細胞を回収し、蛍光色素である DiI にてラベルし、移植細胞とした。移植細胞の培養・増殖を行っている間に、チンチラにアミノ配糖体であるゲンタマイシンおよび利尿薬であるエタクリン酸を全身投与し、有毛細胞の喪失に伴う2次性のラセン神経節細胞の変性、消失を誘導した。細胞移植は、蝸牛正円窓を介して蝸牛軸に細胞を注入する方法で行った。移植3週間後に組織を採取し、移植細胞の分布と分化傾向を組織学的に解析した。

移植細胞は、注入された蝸牛基底部の蝸牛軸、蝸牛外リンパ腔に多く認められた。移植された細胞が蝸牛頂部の蝸牛軸にまで移動している像、外リンパ腔から蝸牛側壁に侵入している像、蝸牛軸からラセン神経節、骨ラセン板縁内の蝸牛神経が存在する部位に移動している像などが観察された(図6A)。これらの所見は、骨髄由来間葉系細胞が高い移動能力と蝸牛組織へ侵入する能力を持つことを示している。

免疫組織化学にて神経系のマーカーの発現を解析したところ、少数であるが、神経マーカー陽性の移植細胞が蝸牛軸、骨ラセン板縁内の蝸牛神経が存在する部位に認められた。したがって、骨髄由来間葉系細胞には蝸牛内で神経細胞に分化しうる細胞が含まれていると考えられる<sup>20)</sup>。同様の方法で培養したマウス骨髄間葉系細胞の発現タンパクを免疫染色で調べると、数パーセントの細胞に未分化な神経系細胞で発現するネスチンの発現が認められた(図6C)。また、骨髄間葉系細胞を神経細胞に分化誘導する方法がすでにいくつか報告されている<sup>21)</sup>。これらの所見は、骨髄由来間葉系細胞移植により蝸牛内で神経細胞に分化する細胞が存在することを支持するものといえる。今後は、あらかじめ体外で神経系への分化誘導を行った骨髄由来間葉系細胞を移植細胞として用いることにより、機能的な再生が誘導できることが期待できる。

自己由来間葉系細胞の蝸牛軸への移植実験で、蝸牛外リンパ腔内に漏れた細胞が蝸牛側壁に侵入する像が観察された<sup>20)</sup>。この所見は、骨髄由来間葉系細胞が蝸牛側壁の組織、特にラセン靭

帯再生のソースとして使える可能性を呈示している。また、骨髄由来間葉系細胞が、その特徴として蝸牛組織内に侵入する能力を持つことを示している。このような骨髄由来間葉系細胞の性質を内耳再生に応用することを考えた場合、ラセン靭帯の線維細胞の再生が想起される。蝸牛には、2種類のギャップ結合ネットワーク、結合織系ネットワークと上皮系ネットワークがある<sup>22)</sup>。ラセン靭帯の線維細胞は、結合織ギャップ結合ネットワークを形成しており、その障害は聴覚機能障害に直結する。最近のヒト側頭骨や動物モデルの解析から、ラセン靭帯の線維細胞変性が感音難聴の病態として注目されている<sup>23)</sup>。このような背景から、骨髄由来間葉系細胞のラセン靭帯線維細胞再生のソースとしての能力を検証することとした。

実験動物としてマウスを用い、GFP-transgenic mouse から骨髄由来間葉系細胞を培養し、前処置を加えていないマウス蝸牛に移植した。移植2週間後に移植細胞が、どの程度ラセン靭帯を含めた蝸牛組織内に侵入することができるのか、また、蝸牛で最も重要なギャップ結合タンパクである connexin26 をどの程度発現するのかを調べた。移植細胞は蝸牛の様々な部位に認められたが、80%が蝸牛外リンパ腔に局在した(図6B)。約12%の細胞が蝸牛組織内に認められ、無処置マウス蝸牛に神経幹細胞を移植した場合<sup>19)</sup>と比較すると、骨髄由来間葉系細胞の蝸牛組織内へと侵入する能力が高いことが分かる。蝸牛組織内での骨髄由来間葉系細胞の分布を調べると、半数以上がラセン靭帯に局在していることが判明した<sup>20)</sup>。したがって、われわれが期待したように、骨髄由来間葉系細胞は蝸牛ラセン靭帯の細胞の再生に適した細胞であることが分かる。

しかし、connexin26の発現については、約5%の細胞に認めるのみであった(図6B)。蝸牛のギャップ結合ネットワークの再生という観点からは、何らかの移植細胞への前処置が必要である。一方、移植前の骨髄由来間葉系細胞では connexin26 の発現が認められないことか

ら、蝸牛内での分化の過程で発現したと考えられる。骨髄由来間葉系細胞は多種の細胞が混在した細胞集団であることから、一部の細胞集団のみが connexin26 陽性細胞へと分化する能力を有すると考えることもできる。いずれにせよ、移植前にこのような細胞を選択培養するか、connexin26 をコードする遺伝子をあらかじめ骨髄由来間葉系細胞に導入すれば、効率よく connexin26 陽性細胞を内耳に導入することができる。この移植前に遺伝子導入を行い蝸牛移植する方法の有効性については、次項「細胞移植による内耳遺伝子導入」で述べる。

骨髄から得られる幹細胞として、最も広く臨床に供されている細胞は造血幹細胞である。造血幹細胞は、種々の血液細胞に分化する能力を持つが、筋細胞や神経細胞にも分化しうることが知られている<sup>27)</sup>。一方、骨髄移植により感音難聴が改善する可能性があることが示唆されており<sup>19)</sup>、骨髄から末梢へのマクロファージ動員を誘導するマクロファージコロニー刺激因子が感音難聴防止に有効であることも示唆されている<sup>19)</sup>。これらの所見は、骨髄機能あるいは骨髄由来細胞が蝸牛機能と関連する可能性を示唆している。しかし、骨髄由来細胞の蝸牛での役割はほとんど知られていない。

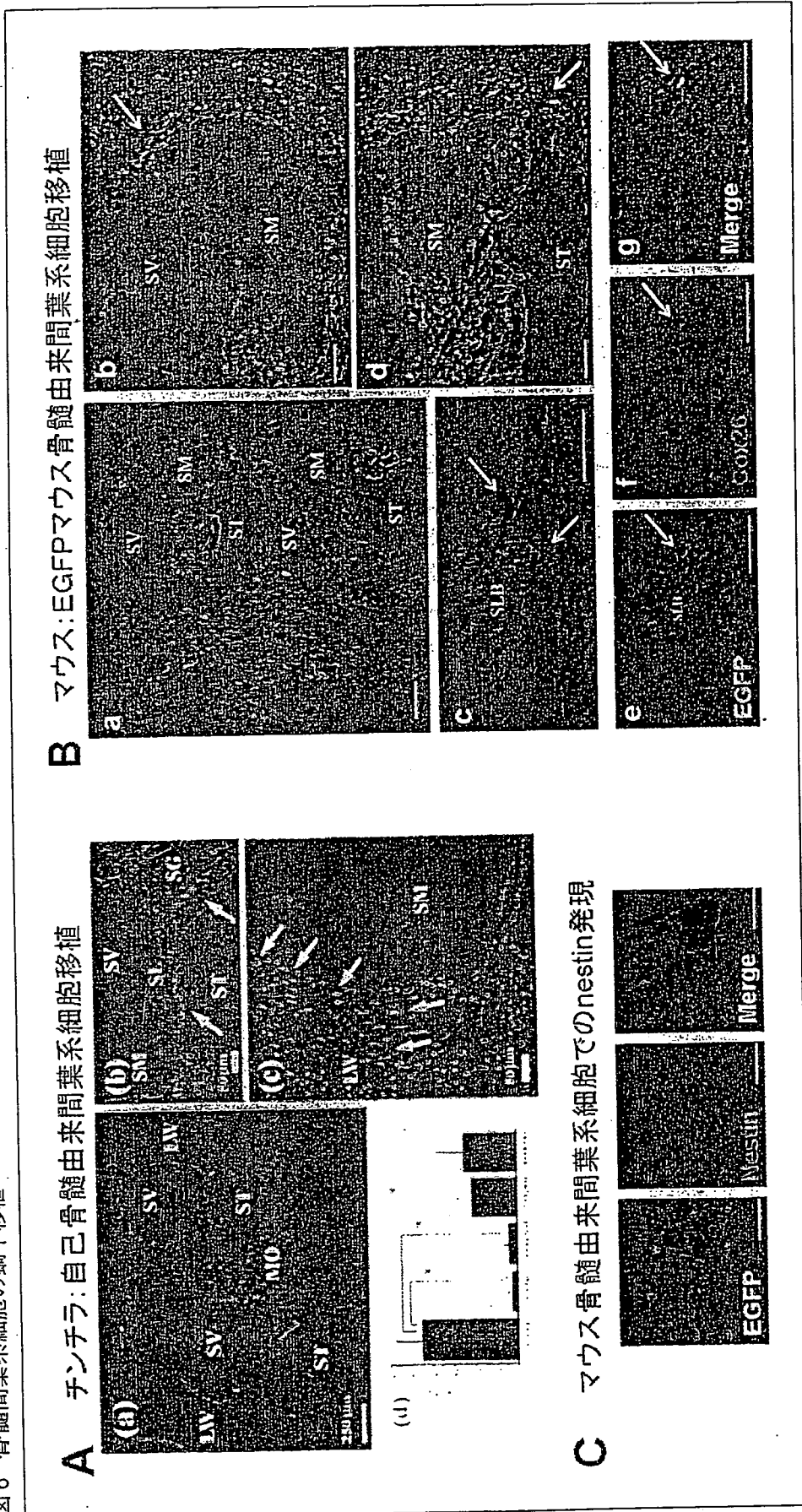
われわれは、骨髄由来細胞の蝸牛での役割を調べるために、GFP にて標識した造血幹細胞移植後のマウス蝸牛における移植細胞の局在およびその分化傾向について組織学的解析を行った。通常骨髄移植実験と同様に、950cGy 放射線照射を行ったマウスに尾静脈より造血幹細胞を注入した。造血幹細胞は GFP マウス骨髄から造血幹細胞 ( $\text{Lin}^-$ ,  $\text{Scal}^+$ ,  $\text{c-kit}^+$ ) を Fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて回収した (図 7 A)。移植 7 日後、3、6 ヶ月後の蝸牛における GFP 陽性細胞の分布を組織学的に解析した。移植 7 日後に採取した蝸牛組織内にはごくわずかの移植細胞しか認められず、そのすべてが蝸牛内の血管に相当する部位に局在した (図 7 B)。一方、肝臓では多数の移植細胞が肝臓組織内に認められた。移植 3、

6 ヶ月後に採取した蝸牛組織内には多数の移植細胞が認められた。移植細胞の分布は移植 3、6 ヶ月の組織間で違いは認められず、GFP 陽性細胞は蝸牛側壁のラセン靱帯と蝸牛軸およびラセン神経節内に主に認められ、ラセン縁にも認められた (図 7 B)。以上の所見は、静脈内投与された造血幹細胞は直接蝸牛内に侵入、増殖したのではなく、一旦造血幹細胞が骨髄に生着、骨髄が再生され、骨髄由来細胞が蝸牛組織内に供給されていることを示している。

次に、蝸牛内に存在する骨髄由来細胞について、免疫組織化学にて分化傾向を調べた。未分化な造血系細胞のマーカーである CD34 および Flk-1 は、蝸牛組織内の移植細胞には認められなかった (図 7 C)。白血球のマーカーである CD45 陽性細胞は約 10% に認められた。蝸牛組織内に認められる移植細胞の 80% 以上が、マクログリアもしくはマクロファージのマーカーとされる Iba1 および F4/80 を発現していた (図 7 D)。すなわち、ほとんどの移植細胞は、マクログリアもしくはマクロファージに分化し、蝸牛内に局在していると考えられる<sup>28)</sup>。一方、活性化された状態にあるマクログリアもしくはマクロファージで発現する CD68 の発現は認められなかった。血管内皮細胞のマーカーである CD31 発現は認められなかった。中枢神経系では、マクログリアが神経細胞への分化能力を有することを示唆する報告がなされていたので、神経系への分化傾向を調べたが、神経系、グリア系に分化した移植細胞は認められなかった<sup>29)</sup>。

造血幹細胞由来細胞がラセン靱帯に多く局在し、さらにラセン縁にも分布し、線維細胞様の形態を呈示するものが散見されたことから、これらの部位に存在する線維細胞が発現するギャップ結合タンパクである connexin26 および 30 の発現に関しての解析を加えた。その結果、一部の移植細胞にこれらギャップ結合タンパクの発現が認められた (図 7 E)。特に、ラセン靱帯に局在する造血幹細胞由来細胞はギャップ結合ネットワークに接して存在したことから、

図6 骨髄間葉系細胞の蝸牛移植

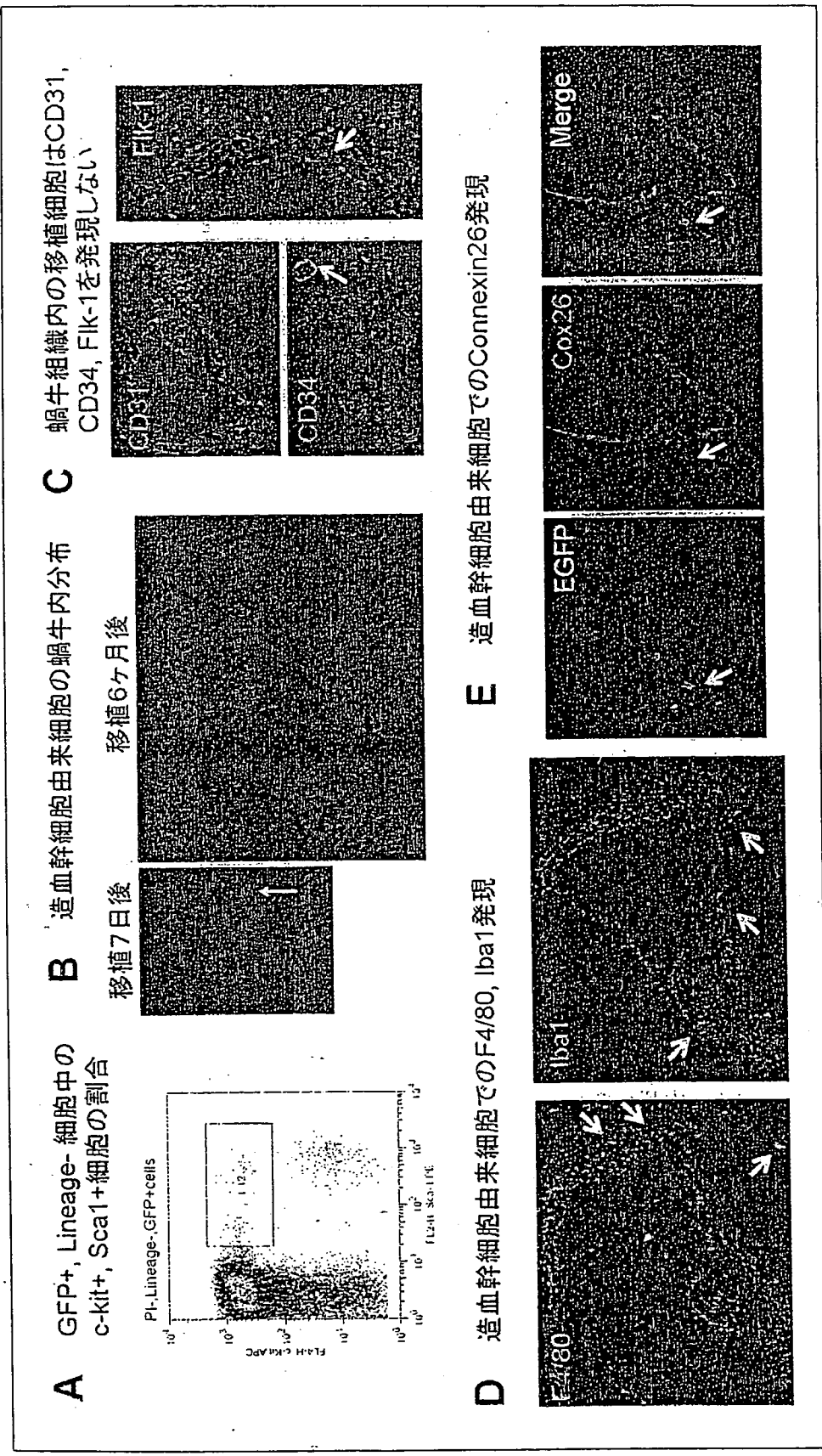


A : 移植された自己骨髄由来間葉系細胞 (赤) は、蝸牛の様々な部位に認められた (a)。移植細胞は、蝸牛神経に近接する部位にも認められた (b: 矢印)。ラセン鞅帯にも多くの移植細胞を認めた (c: 矢印)。移植細胞の多くは、外リンパ腔に認められた (d)。

B : 移植細胞 (緑) は、蝸牛外リンパ腔に最も多く認められた (a)。ラセン鞅帯 (b・d: 矢印)、ラセン縁 (c: 矢印) に移植細胞が認められる。移植細胞の一部は、connexin26 (Cox26) を発現していた (e-g)。

C : 移植前の骨髄由来間葉系細胞の一部に Nestin の発現を認める。

図 7 蝸牛における骨髄由来細胞の分布



A : GFP マウス骨髄から Lineage<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup> の細胞を回収した。  
 B : 移植 7 日後には、蝸牛の血管に相当する部分にのみ EGFP 陽性細胞を認めた (矢印)。一方、移植 6 ヶ月後には、多数の EGFP 陽性細胞を蝸牛組織内に認める。  
 C : 蝸牛組織内に存在する移植細胞には、CD34, Flk-1 発現を認めない。血管内あるいは骨髄には、CD34, Flk-1 陽性細胞を認める (矢印)。  
 D : 蝸牛組織内に存在する移植細胞にマイクログリアである F4/80 および Iba1 発現を認める (矢印)。  
 E : 一部の移植細胞に connexin26 (Cox26) 発現を認める (矢印)。

ギャップ結合を介した物質輸送や情報交換に関与している可能性がある。

ラセン靭帯やラセン神経節に局在する骨髄由来細胞が持続的に骨髄から供給されているのであれば、骨髄機能の修飾が蝸牛における骨髄由来細胞の分布などに影響を与える可能性がある。そこで、骨髄機能の修飾が蝸牛内の骨髄由来細胞の分布に影響を与えるか否かを調べるために、マクロファージコロニー刺激因子を連続7日間投与した後のラセン靭帯およびラセン神経節内の Ibal 陽性細胞数の変化を調べた。その結果、ラセン靭帯、ラセン神経節ともに Ibal 陽性細胞数がマクロファージコロニー刺激因子投与により増加する傾向が認められ、ラセン神経節では有意差が認められた。つまり、骨髄機能の修飾が、蝸牛内のマクログリアもしくはマクロファージの分布に影響を与えることが分かった<sup>29)</sup>。この結果は、蝸牛内に認められた造血幹細胞由来細胞が骨髄から供給されたものであることを裏付ける所見といえる。中枢神経系では、マクログリアは神経細胞に対して保護的にも障害的にも働く可能性があることが示されている<sup>29)30)</sup>。蝸牛に局在する骨髄由来細胞が、聴覚機能に対してどのような役割を果たしているのかを明らかにすることは、新しい感音難聴治療法の開発につながる重要な研究課題であると考えられる。

## 6. 細胞移植による内耳遺伝子導入

遺伝子治療の内耳障害治療における有用性を示す論文は、数多く存在する。内耳への遺伝子導入により、内耳に対する保護作用を有する物質を持続的に内耳の細胞に発現させ、内耳の防御能力を増強するだけでなく、内耳の細胞の分化に関連する転写因子の遺伝子を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を誘導することも可能となり<sup>14)31)</sup>、将来の臨床応用が期待される。しかし、臨床応用の際に解決すべき問題として、ウイルスベクターの問題がある。内耳の細胞に効率よく遺伝子を導入するためには、ウイルスベクターを使用する

必要があるが、ウイルスベクターの安全性は必ずしも確立されていない。

この問題を解決するためには、非ウイルスベクターを用いて、内耳に遺伝子を導入しなければならない。現時点では、非ウイルスベクターによる内耳への遺伝子導入は非常に効率が悪い。しかし、体外での培養条件であれば、非ウイルスベクターにより遺伝子を培養細胞に導入することは比較的容易であり、導入効率が低くても目的とする遺伝子を発現している細胞のみを選択培養することが可能である。導入しようとする遺伝子がコードするタンパクあるいはペプチドが分泌される性質のものであれば、遺伝子の運搬役となる細胞は、内耳のいずれかの部位に十分な数が生着すればよい。一方、内耳の構造タンパクをコードする遺伝子をこの方法で内耳に導入する場合には、移植細胞が目的とする内耳の組織に侵入し、周囲の細胞と有機的な接合を持つことが必要となる。

感音難聴の約半分はなんらかの遺伝子的背景を持つとされており、多くの遺伝子の異常により引き起こされる感音難聴が明らかにされている<sup>32)</sup>。内耳構造タンパクをコードする遺伝子を導入する方法を確立することができれば、これらの遺伝子異常を背景に持つ感音難聴の根本的治療法が開発されることになる。われわれは、細胞移植による内耳遺伝子導入の第一段階として、この方法で分泌ペプチドを内耳に導入することが可能かどうかを検討した。

導入する遺伝子として、分泌ペプチドであり、高い内耳保護作用を有し、蝸牛での神経伝達においても重要な役割を果たすことが知られている脳由来神経栄養因子 (BDNF) をコードする遺伝子を選択した。運搬役となる移植細胞として、培養・増殖が容易なマウス線維芽細胞の細胞株である NIH3T3 を用いた。リポフェクション法にて *in vitro* で NIH3T3 細胞にマウス BDNF 遺伝子を抗生物質耐性遺伝子および標識タンパクである FLAG とともに導入した。BDNF を含まない、抗生物質耐性遺伝子のみを導入した細胞をコントロールとした。

まず *in vitro* の系にて、BDNF 遺伝子導入細胞が培養液中に BDNF を分泌する能力があることを RT-PCR および ELISA にて確認した (図 8A)。次に、マウス半規管から細胞を移植する方法を用いて細胞移植を行い、1, 4 週間後に組織採取した。免疫組織化学にて蝸牛および前庭の外リンパ腔に移植細胞の局在を確認し (図 8B)、ウエスタンブロットを行い、FLAG 標識された BDNF が移植を受けた組織でのみ認められることを確認した (図 8C)。

以上の結果から、細胞移植を用いて内耳に遺伝子導入することが可能であることが分かった。次に、移植細胞により分泌される BDNF の定量的な解析を ELISA にて行い、BDNF 遺伝子導入細胞を移植した内耳では、コントロール細胞を移植された内耳よりも有意に多くの BDNF を含有していることを明らかとした (図 8C)。

以上の結果は、分泌タンパクあるいはペプチドをコードする遺伝子の導入については、*ex vivo* で遺伝子導入した細胞を内耳に移植する方法を応用できることを示すものである<sup>30</sup>。今後はさらに一歩進めて、骨髄由来間葉系細胞のように、内耳組織内に侵入する能力の高い細胞を遺伝子の運搬役として用いることにより、内耳へ構造タンパクの遺伝子導入を行う予定である。

## 7. 小 括

内耳は、骨で囲まれた特殊な器官であることから、内耳への細胞移植という戦略は非現実的なものととらえられていた。しかし、われわれの一連の内耳への細胞移植研究の成果は、内耳細胞移植が単に研究的手法にとどまらず、臨床応用への高い可能性のある戦略であることを示している。さらに、内耳細胞移植という方法が、再生能力の高い細胞を内耳に送り込むという目的のみならず、内耳への遺伝子導入のための手技として応用できることが分かった。

内耳再生に関しては、有毛細胞のみならず、内耳機能に関連する種々の細胞を標的とした再

生の可能性を示すことができた。すでに、ラセン神経節細胞再生に関しては、霊長類レベルでその可能性を議論できるところまで研究は進展している。しかし、機能的な細胞を内耳で再生するためには、移植細胞の開発を含め、さらなる改良が必要なことも明確になった。特に、有毛細胞再生に関しては、至適移植細胞の開発が不可欠となる。このためには、より詳細な内耳有毛細胞発生に関連する分子生物学的解析による有毛細胞への分化運命決定機構を握る分子を明らかにする必要がある。

今回の研究では、臨床応用に近い移植細胞として、骨髄由来細胞に関する検討も行った。この過程で、内耳における骨髄由来細胞の位置づけ、あるいは役割に関する新しい知見を得ることができた。このような知見は、内耳障害治療の新しい研究展開につながる可能性がある。

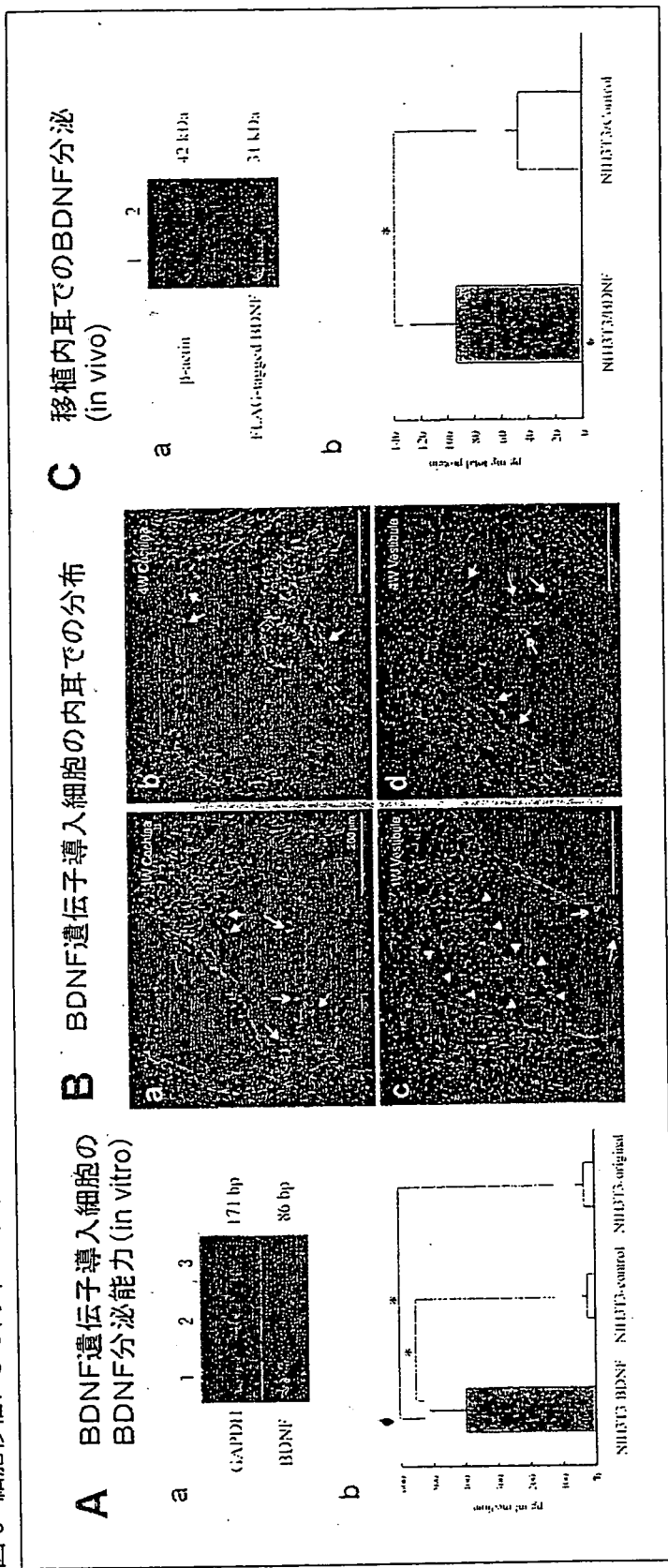
## Ⅲ. 内耳の自発的再生の誘導

本項では、哺乳類内耳感覚上皮に残存している潜在的な再生能力を活性化することにより、内耳感覚上皮再生を実現しようとする試みについて述べる。哺乳類内耳感覚上皮の再生能力を高めるための方法として、1) 細胞増殖を停止させている「鍵」に相当する分子を解除し、細胞増殖を誘導する、2) 残存する支持細胞から有毛細胞への分化転換を誘導する、3) 細胞死に至る前の障害有毛細胞の自己修復能力を高めて、機能的有毛細胞として再生する、という3つの方法が考えられる。

### 1. 内耳での細胞増殖制御機構

成熟した哺乳類内耳感覚上皮では、細胞増殖は認められないか、認められてもごくわずかである<sup>30</sup>。したがって、内耳感覚上皮での細胞増殖制御のメカニズムを検討する材料として、成熟した内耳感覚上皮は最適な材料とはいえない。内耳感覚上皮での細胞増殖制御機構を調べるためには、まず、細胞増殖が活発に起こっている発達段階の内耳感覚上皮を材料として解析を進め、その所見を成熟内耳感覚上皮へ応用するこ

図8 細胞移植による内耳への遺伝子導入



A : BDNF 遺伝子を導入した細胞株 (lane 1, a) では, RT-PCR にて BDNF 遺伝子発現が認められるが, コントロール細胞株 (lane 2) および遺伝子操作を行っていない細胞株 (lane 3) では発現を認めない. BDNF 遺伝子を導入した細胞株の培養液中の BDNF 濃度は, コントロールおよび遺伝子操作なしの細胞の培養液よりも有意に高い (b).

B : 蝸牛 (a・b) および卵形嚢 (c・d) に移植細胞 (緑, 矢印および矢頭) を認める (a・c: 移植1週間後, b・d: 4週間後).

C : BDNF 遺伝子導入細胞移植を受けた内耳組織では, FLAG-BDNF タンパクの発現が認められる (lane 1, a). コントロール細胞を移植した内耳と比較して, 有意に多くの BDNF が BDNF 遺伝子導入細胞移植を受けた内耳組織では認められた (b).

とが適切と考えられる。

### 1) p27kip1 による内耳の細胞増殖と制御

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<sup>35)</sup>。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。1999 年に 2 つの研究グループがほぼ同時に、サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパクの一つである p27kip1 が、この時期の感覚上皮予定領域の細胞増殖の停止に重要な役割を果たしていることを明らかにした<sup>35)36)</sup>。p27kip1 をノックアウトしたマウスでは過剰に有毛細胞が出現し、生後も細胞増殖が認められることが示された<sup>36)</sup>。これらの所見は、内耳感覚上皮の細胞増殖制御機構において、p27kip1 が鍵を握る分子であることを示唆している。したがって、p27kip1 の発現を抑制することにより、成熟した内耳感覚上皮においても細胞増殖誘導ができる可能性がある。

p27kip1 の発現制御のメカニズムとしては、p27kip1 遺伝子の転写レベルでの調節と p27kip1 の細胞内での分解レベルでの調節の 2 つがある。われわれは後者のメカニズムに着目し、p27kip1 を分解する役割を果たしている F ボックスタンパクの一つである skp2 のマウス内耳感覚上皮での発現変化を組織学的に解析した<sup>37)</sup>。

マウス内耳感覚上皮予定領域では、細胞増殖が盛んな胎生期 12 日目までは skp2 の発現が認められ、p27kip1 が内耳感覚上皮予定領域に発現すると同時に skp2 の発現は認められなくなった (図 9 A)。つまり、細胞増殖が活発に行われている状態では、skp2 により p27kip1 が活発に分解されていることが推察できる<sup>37)</sup>。胎生期 14 日目には、有毛細胞への分化を示す myosin7a の発現が認められ、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。このタイミングで、p27kip1 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が、有毛細胞での skp2 の発現は認められない。すな

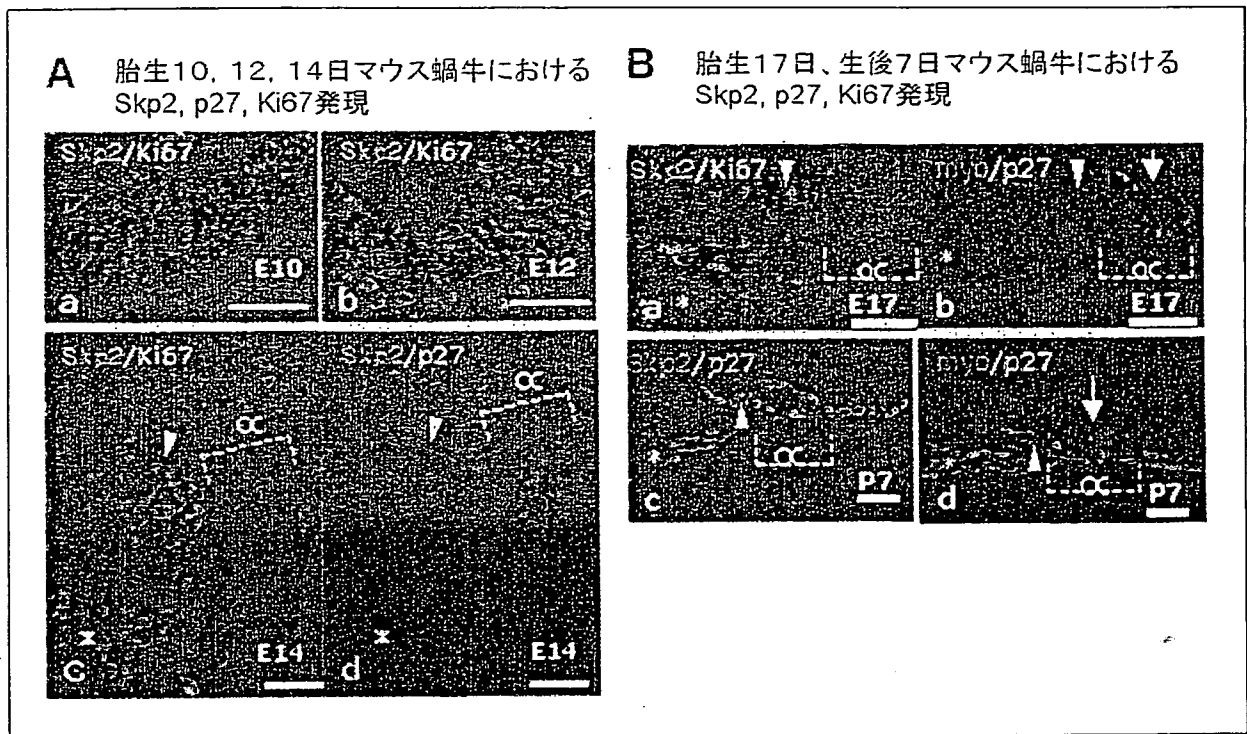
わち、有毛細胞では、タンパク転写レベルより上流で p27kip1 の発現が制御されていると推察される。最近、転写レベルでの p27kip1 発現制御が、特に有毛細胞への分化調節に重要な役割を果たすことが報告されている<sup>38)</sup>。一方、胎生期 14 日目以降も、感覚上皮予定領域の周辺では細胞増殖が引き続き認められる (図 9 B)。これらの部位では、skp2 の発現が散見され、発達とともに徐々に skp2 発現細胞は減少し、感覚上皮予定領域のようなドラマティックな発現の変化は認められない。感覚上皮予定領域周辺部に増殖能力を有する細胞が生後の早い段階まで残存していることから、この領域の細胞増殖制御にも skp2 が関与している可能性がある。以上の所見は、skp2 が内耳感覚上皮での p27kip1 発現制御を介した細胞増殖制御に関連する分子の一つであることを示唆している。

しかし、skp2 による分解のみが、内耳感覚上皮における p27kip1 の発現制御に関与しているわけではないことも明らかとなった。p27kip1 が、内耳感覚上皮における細胞死機構と関連することを示唆する報告も認められ<sup>39)</sup>、成熟した内耳感覚上皮で p27kip1 発現を制御した場合に単純に細胞増殖が誘導されるだけではないことも考えられる。内耳感覚上皮の細胞増殖制御については、RBP/E2F 系も重要な役割を果たすことが最近報告されている<sup>40-42)</sup>。p27kip1 を喪失させた場合、内耳感覚上皮の支持細胞のみで細胞増殖が誘導されるのに対して、RBP の喪失では、有毛細胞、支持細胞双方で細胞増殖が誘導される。つまり、p27kip1 を介する系以外にも細胞増殖を制御する強力な機構が内耳感覚上皮に存在することが推察できる。一方、p27kip1 あるいは RBP の喪失で誘導される過剰な有毛細胞を持つ蝸牛の機能は障害されていることも明らかにされており、細胞増殖の誘導に続く適切な分化誘導が細胞の機能的な再生の鍵を握る可能性がある。

### 2) Wnt 情報伝達系による内耳の細胞増殖制御

上皮系組織における細胞増殖制御機構として、



図9 蝸牛における p27, *skp2* の発現

- A : 胎生 10, 12 日目の感覚上皮予定領域では, *skp2* (赤), Ki67 (緑) の発現が認められる (a・b). 胎生 14 日では, コルチ器に相当する部分で *skp2* (赤), Ki67 (緑) の発現が消失し (c), p27 (緑) の発現が認められる (d).
- B : 胎生 17 日および生後 7 日では, コルチ器 (OC) で有毛細胞に myosin VIIa (myo. 赤), 支持細胞に p27 (緑) の発現が認められるが (b・d), *skp2*, Ki67 は認められない (a・c). コルチ器内側の Greater epithelial ridge には, 胎生 17 日では *skp2* (赤), Ki67 (緑) の発現が認められるが (a), 生後 7 日では認められない (c).

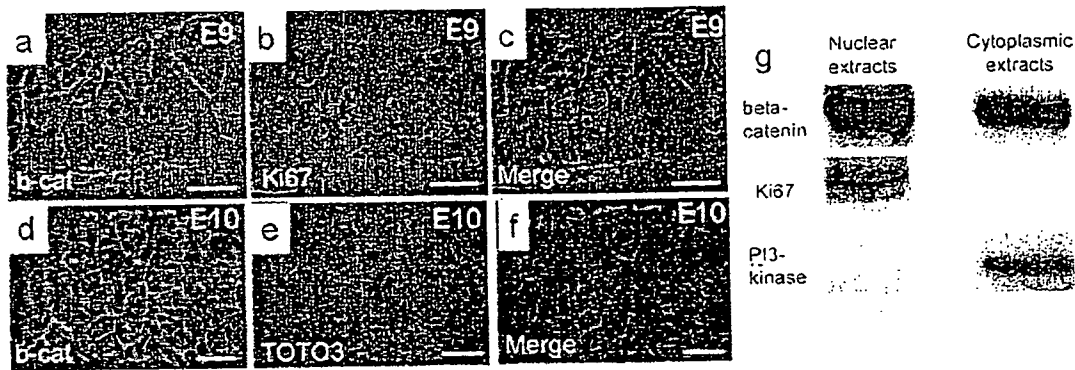
Wnt 情報伝達系が重要な役割を果たすことが知られており, 発生や腫瘍の分野で注目されている. Wnt 情報伝達系は, 少なくとも三つの伝達経路が存在することが明らかにされているが, 代表的な伝達経路として, 接着結合タンパクである beta-catenin がシグナル伝達の中心的役割を果たす経路がある<sup>43)</sup>. Wnt 情報伝達系が活性化されると beta-catenin は細胞質から核に移行集積し, 細胞増殖に関連する転写を誘導する. 転写されるタンパクの代表的なものとして cyclinD がある<sup>44)</sup>. beta-catenin は, 内耳感覚上皮の接着結合タンパク結合タンパクである E-cadherin の裏打ちタンパクであり, 内耳感覚上皮細胞の細胞質に局在する<sup>45)46)</sup>. したがって, beta-catenin を介した Wnt 情報伝達系が内耳感覚上皮の細胞増殖制御機構に関与し

ている可能性がある.

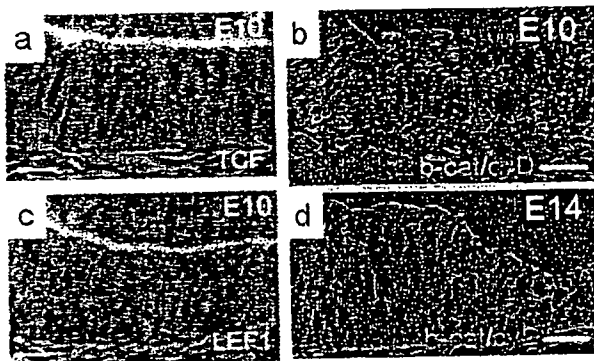
われわれは, マウス内耳感覚上皮における細胞増殖と beta-catenin の細胞内分布の関係に着目した. まず, 内耳感覚上皮の発達段階における beta-catenin の分布と発現パターンの変化を, 免疫組織化学にて評価した. 胎生期 12 日目の細胞増殖が認められる時期には, beta-catenin の発現は内耳感覚上皮全体に広く分布しており, 細胞膜に相当する部分のみならず, 細胞質でも発現が認められた. 感覚上皮予定領域で細胞増殖が停止する胎生期 13 日目以降には, 発現は弱くなる傾向が認められた. また, 形態学的なコルチ器の発達に伴い, 上皮の接着結合に相当する部分にのみ発現部位が限局していく傾向が認められた. 以上から, 内耳感覚上皮の発達に伴い, 感覚上皮における beta-

図10 発生内耳における beta-catenin の細胞内分布の変化

**A** 胎生9, 10日感覚上皮予定領域における beta-catenin の細胞内分布



**B** 胎生10, 14日感覚上皮予定領域における beta-catenin, TCF, LEF1, CyclinD の発現



A : 胎生9日 (a-c) 10日 (d-f) 感覚上皮予定領域では, beta-catenin (b-cat) の核での発現を認める。胎生10日目の内耳では, beta-catenin は細胞質および核分画の両方に発現している (g)。  
 B : 胎生10日の感覚上皮予定領域では, TCF (a), CyclinD (b), LEF1 (c) の発現が認められる。胎生14日では, CyclinD 陽性細胞は減少している (d)。

catenin の発現パターンが変化することが示唆された<sup>47)</sup>。Wnt 情報伝達系と関連する beta-catenin の核への移行を証明する所見は得られなかった。

さらに詳細に検討するために, 胎生期9日目から内耳原器での beta-catenin の細胞内の局在について, 免疫組織化学およびウエスタンブロットを用いて解析したところ, 胎生期早期の9, 10日目に beta-catenin の核への移行が確認された (図10A)。さらに, 同時期に核に移行した beta-catenin と結合して転写活性を制御する TCF および LEF1 の発現が認められ

(図10B), Wnt 情報伝達系により転写されるタンパクの一つである cyclinD の発現も確認された (図10B)。これらの所見は, 内耳原器形成の初期の過程に beta-catenin を介した Wnt 情報伝達系が働いていることを示唆する所見といえる<sup>48)</sup>。この結果は, 過去の beta-catenin に対するアンチセンスを用いた実験の結果<sup>49)</sup>と矛盾しないものである。さらに, 最近 Wnt 情報伝達系が外胚葉から内耳および皮膚への分化運命決定機構に関与することが報告され, beta-catenin を過剰発現すると内耳領域が拡大し, beta-catenin をノックアウトする

と内耳領域が縮小することが示された<sup>30)</sup>。この所見も、beta-catenin/Wnt 情報伝達系が、内耳形成初期の細胞増殖に関連するというわれわれの結果を支持するものである。したがって、beta-catenin を介した細胞増殖の情報伝達が内耳発生の比較的早期には重要な役割を果たしていると考えられる。

前庭感覚上皮では、成熟した動物でも有毛細胞喪失後に支持細胞に細胞増殖が認められることが知られているが、その数はきわめて限られている。しかし、器官培養系では比較的 support 細胞の細胞増殖が誘導されやすいことが知られている。そこで、生後マウスの前庭感覚上皮器官培養系を用いて、細胞増殖を誘導した場合の beta-catenin の発現について、免疫組織化学にて検討した。生後3日目の卵形嚢から感覚上皮を取り出し、器官培養を行い、培養液にフォルスコリンを添加し、細胞増殖を誘導した。細胞増殖誘導を行った器官培養では、支持細胞にプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みが認められた。細胞増殖刺激を与えていない培養では、beta-catenin の感覚上皮における分布は正常感覚上皮と同様に細胞膜に相当する部分のみに認められたが、細胞増殖誘導を行った培養では、BrdU 陽性細胞の一部に beta-catenin の核への集積が認められた<sup>31)</sup>。この所見は、生後の前庭感覚上皮における細胞増殖過程にも、beta-catenin を介した情報伝達が関係している可能性を示唆するものといえる。

beta-catenin を介した細胞増殖に関連する情報伝達は、Wnt 情報伝達系以外にも存在することが報告されており<sup>32)</sup>、beta-catenin の核への集積のみでは Wnt 情報伝達系の関与を論ずることはできない。また、Wnt 情報伝達系についても、beta-catenin を介さない情報伝達系も存在し<sup>33)</sup>、情報伝達の分子機構に関して不明の点も多く残されている。したがって、成熟した内耳感覚上皮の細胞増殖制御における Wnt 情報伝達系の役割の解明には、さらなる解析が必要といえる。

beta-catenin は、内耳感覚上皮の接着結合

タンパクであるが、細胞間の結合を担うタンパクとして、E-cadherin が知られている。E-cadherin もまた、細胞増殖制御に関連することが知られているが<sup>34)</sup>、内耳感覚上皮において細胞増殖と関連づけた解析は行われていない。そこでわれわれは、前庭感覚上皮における有毛細胞喪失後の感覚上皮における接着結合および E-cadherin 発現の変化についての解析を行った。

耳毒性薬物であるアミノ配糖体のマウス内耳への局所投与モデル<sup>35)</sup>を用い、有毛細胞喪失誘導後の卵形嚢感覚上皮における変化を観察した<sup>36)</sup>。アミノ配糖体投与直後から、前庭感覚上皮における E-cadherin の発現は有意に低下し、形態学的に接着結合が破壊されていることが示された (図11)。しかし、有毛細胞障害、脱落の収束とともに、直ちに感覚上皮における接着結合は修復され、E-cadherin の発現パターンおよび発現量は、正常と同様に回復することが判明した (図11)。他の組織では、E-cadherin の発現低下と接着結合の解離は細胞増殖活性と関連することが報告されており、有毛細胞脱落に伴う E-cadherin の低下および接着結合の解離は、前庭感覚上皮における細胞増殖に対して正のシグナルとなる可能性があるが、直ちに接着結合が回復し、E-cadherin の発現も正常パターンに戻ることから、細胞増殖活性を抑制する方向に働いていると考えることができる。

これら接着結合に関連する分子や細胞外マトリックスが、成熟した内耳感覚上皮における細胞増殖制御に関連している可能性があり、これらの分子も内耳感覚上皮での細胞増殖誘導の標的と考えるべきであろう。

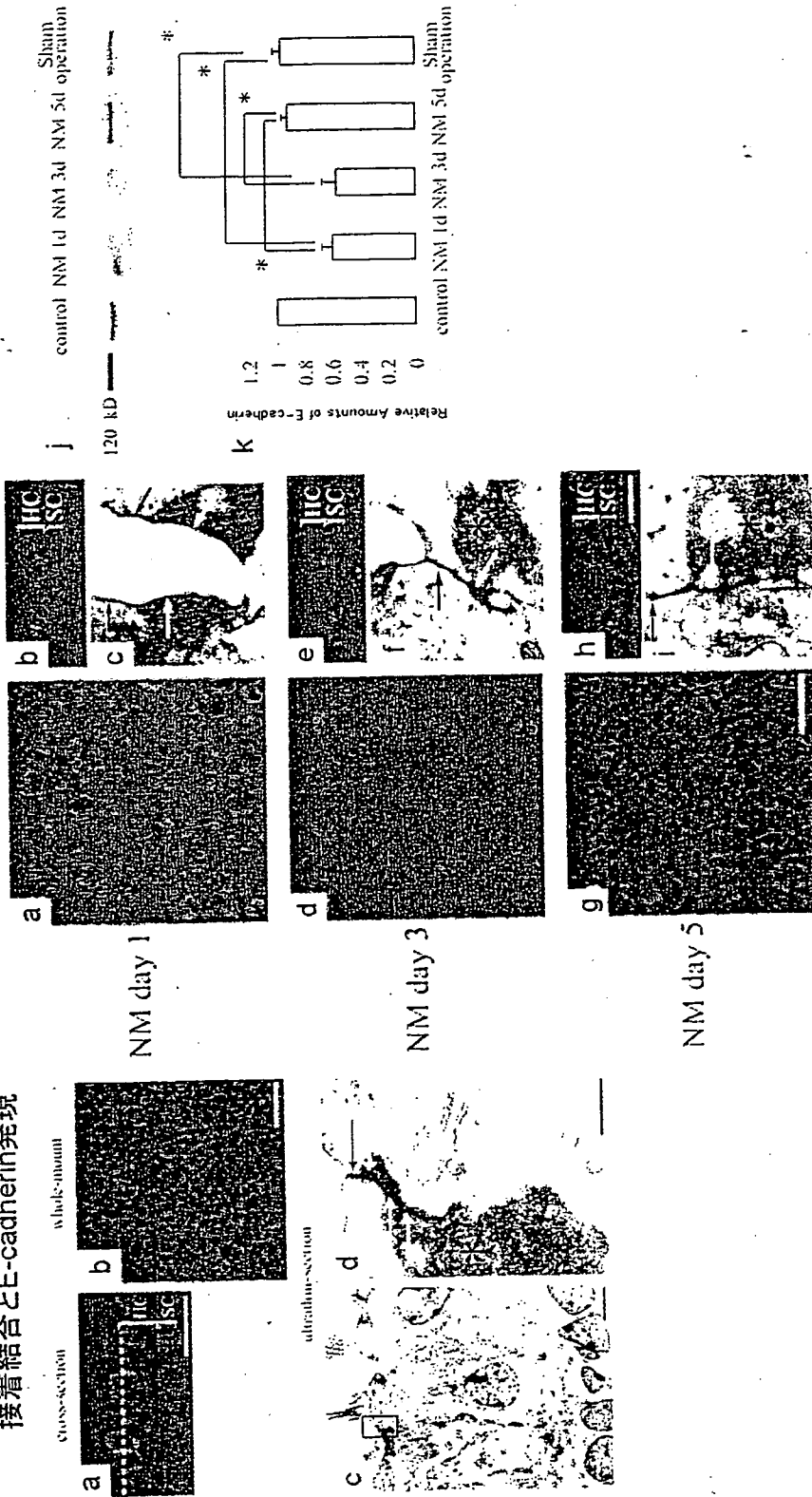
## 2. 内耳有毛細胞の分化運命決定機構の解明による内耳再生

内耳感覚上皮の発生においては、細胞の運命決定により有毛細胞、支持細胞などの細胞が生み出されるが、近年このような内耳感覚上皮内の細胞運命決定に関与するさまざまな因子の同定、解析が進んできた。発生過程を生後の内耳

図11 障害内耳における E-cadherin 発現パターンの変化

B ネオマイシン投与後の接着結合およびE-cadherin発現の変化

A 正常前庭感覚上皮における接着結合とE-cadherin発現



A : 正常感覚上皮では、E-cadherin (緑) は、有毛細胞 (HC, 赤: calbindin) と支持細胞 (SC) の間に発現している (a・b)。有毛細胞と支持細胞の間には、タイト結合 (黒矢印)、接着結合 (白矢印)、アスモンゾーム (\*) が認められる (c・d)。  
 B : ネオマイシン (NM) 投与 1 日後、E-cadherin 発現 (緑) は減弱し (a・b)、接着結合の離開が認められる (c)。投与 3 日後、E-cadherin 発現は減弱しているが (d・e)、接着結合は回復している (f)。投与 5 日後には、E-cadherin 発現 (g・h)、接着結合とともに、正常に回復している (i)。定量的に、有意の E-cadherin 発現の減少が投与 1, 3 日後に認められた (j・k)。

で再現することによって内耳感覚上皮の再生を目指すという方法は、このような因子を生後内耳において操作することによって可能と考えられる。

今回われわれは、内耳有毛細胞の運命決定にかかわる因子のうち、Notch 情報伝達系に注目した。Notch 情報伝達系は線虫から哺乳類に至るまで保存されており、発生のあらゆる過程で分化、増殖、細胞死などに影響を与えていることが分かっている。特に、均一の分化能を持つ細胞により構成される細胞集団が、外部からの情報ではなく、細胞集団内の細胞間での情報のやり取りで特定の細胞運命を選択する細胞を選び出す「側方抑制」と呼ばれる制御機構において、Notch 情報伝達系は細胞間の情報のやりとりの役割を果たす。Notch 受容体は隣接細胞が発現するリガンドが結合すると  $\gamma$ -secretase 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<sup>57)</sup>。哺乳類では4種類の Notch 受容体が報告されているが、RBP-J は1種類しか存在せず、4種類すべての Notch 受容体細胞内領域が RBP-J を transactivator として利用する<sup>58)</sup>。

もともと、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側方抑制が機能しているといわれていたが、Notch 情報伝達系のリガンドである Jagged2 の遺伝子欠失マウスの蝸牛においては内毛細胞が2列、外毛細胞が4-5列になっており、Notch 情報伝達系が蝸牛における細胞構成に重要な役割を果たしていることが示された<sup>59)</sup>。この現象は、Notch 情報伝達系の破壊により側方抑制が働かなくなり、支持細胞が形成されなくなり、有毛細胞が通常より多く形成されたことによると説明された。さらに、Notch 情報伝達系の活性化で抑制される bHLH 型転写因子である Math1 のノックアウトマウスでは有毛細胞が欠損し<sup>60)</sup>、逆にラットの器官培養の系で Math1 を過剰発現させた

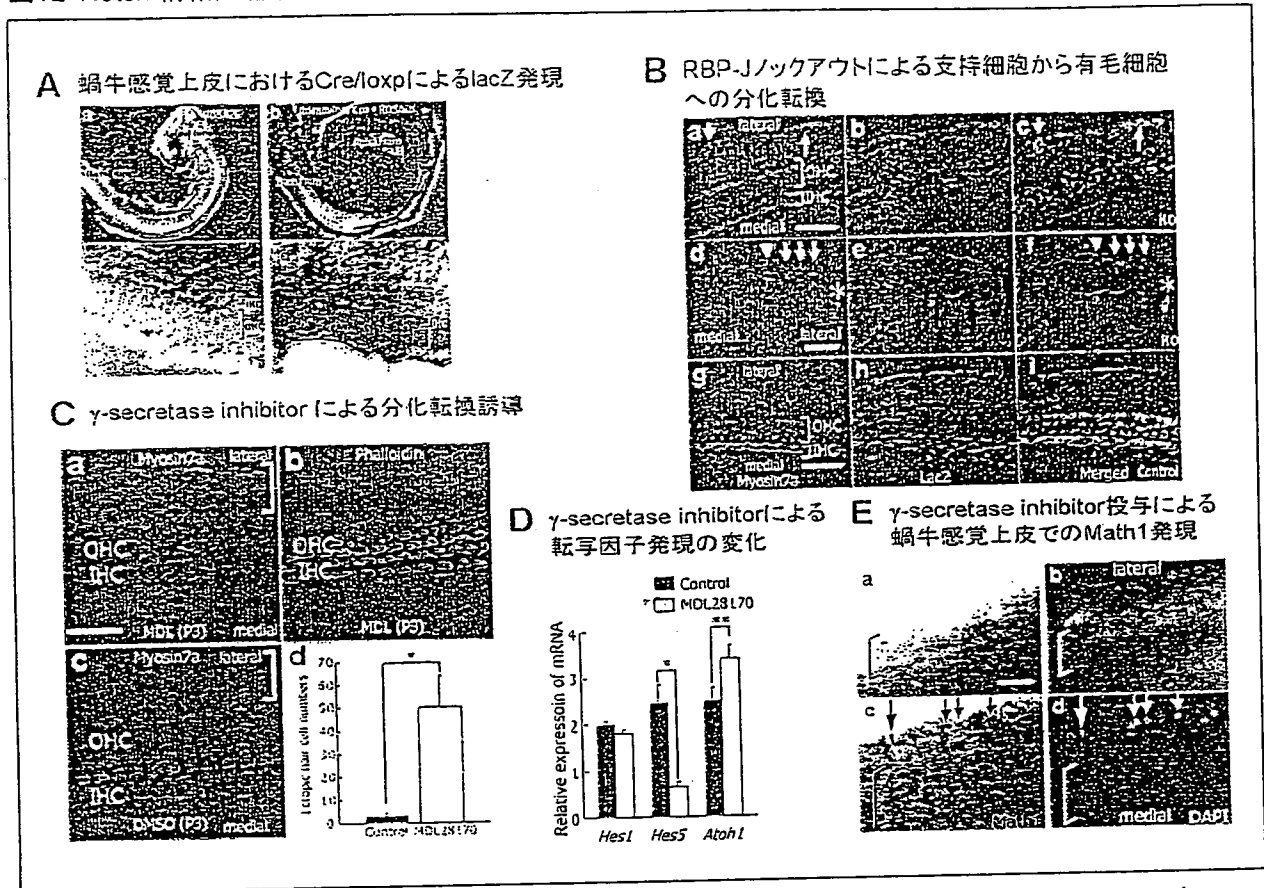
場合、有毛細胞が誘導された<sup>61)</sup>。

これらのことから、われわれは、Notch 情報伝達系を生後の哺乳類の内耳において抑制することにより、支持細胞の形成が阻害され、Math1 の過剰発現と同様の有毛細胞の誘導を行うことができるのではないかと考えた。

まず、われわれは、Notch 情報伝達系を生後において完全に遮断する手法として、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を確立した。われわれは、コルチ器特異的かつ時間特異的な標的遺伝子のノックアウトを行うため、生後3日齢の floxed マウスから蝸牛コルチ器を摘出し、器官培養した後、ただちに Cre 酵素を発現するアデノウイルスベクターを投与する系を確立した。ノックアウトの効率を確かめるため、Cre 酵素が作用すると lacZ タンパクを発現する Cre レポーターマウスを用いた。この実験では、アデノウイルスベクター投与後、lacZ の発現はコルチ器のほぼ全周で認められ、有毛細胞、支持細胞を含めてほぼすべての種類の細胞で発現していた(図12A)。

この実験系を用いて、Cre レポーターアレルを持った RBP-J の floxed マウスを用いて、生後3日齢のマウスコルチ器における RBP-J 遺伝子のノックアウトを行った。ノックアウトされたコルチ器の内毛細胞と外毛細胞の数は、コントロールと差がなかったが、外毛細胞の外側、つまり通常は支持細胞の存在する領域に、コルチ器における有毛細胞のマーカーである myosin7a 陽性の細胞が認められた(図12B)。この myosin7a 陽性細胞は、Cre 酵素のレポーターである lacZ も発現していることから(図12B)、RBP-J 遺伝子のノックアウトにより自律的に生じたものと考えられる。この結果は、Notch 情報伝達系が完全に遮断されることにより、支持細胞が有毛細胞に分化したことを示す。従来、内耳における細胞の運命決定は胎生期に完了するとされてきたが、この結果は、生後の内耳においても有毛細胞を生み出すことができ、内耳感覚上皮の再生に Notch 情

図12 Notch 情報伝達系の制御による有毛細胞再生



A : アデノウイルスベクターにより Cre が発現すると, lacZ (緑) 発現が蝸牛感覚上皮で認められる (a・c : コントロール, b・d : Cre 発現組織).

B : RBP-J ノックアウトにより, lacZ 発現 (b・e) とともに, 異所性有毛細胞 (a・d) が認められる. 正常感覚上皮では, lacZ 発現 (h) は認められるが, 異所性有毛細胞は認められない (g).

C :  $\gamma$ -secretase inhibitor 投与により異所性有毛細胞が誘導されるが (a・d), 完全な感覚毛は形成されていない (b). 薬物溶媒である DMSO のみの投与では, 異所性有毛細胞は認められない (c).

D :  $\gamma$ -secretase inhibitor 投与により, *Hes5* の有意の減少, *Atah1* の有意の増加が認められた.

E :  $\gamma$ -secretase inhibitor 投与により, 蝸牛感覚上皮で *Math1* 発現細胞がコルチ器外側に認められた (矢印).

報伝達系の遮断が有効であることを示唆している<sup>69)</sup>.

上に示したような遺伝子のノックアウトを臨床応用しようとする, その手法が問題となる. 近年, 特定のタンパク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, これを用いれば, 特定の遺伝子がコードするタンパクの機能を, 遺伝子操作なしに, しかも可逆的に抑制することができる. Notch 情報伝達系においては, その機能を抑制する物質として, Notch 情報伝達系の情報伝達に必須である Notch 受容体の切断を

行う  $\gamma$ -secretase 活性の阻害剤「 $\gamma$ -secretase inhibitor」があげられる.  $\gamma$ -secretase inhibitor は, 哺乳類における 4 種類すべての Notch 受容体の切断を抑制するため, RBP-J 遺伝子のノックアウトと同様, Notch 情報伝達系の遮断を完全に行うことが可能である<sup>69)</sup>.

そこでわれわれは, Notch 情報伝達系の遮断を内耳感覚上皮の再生に応用すべく, RBP-J 遺伝子のノックアウトと同様の効果が  $\gamma$ -secretase inhibitor を生後マウスのコルチ器器官培養に投与することにより得られるかどうかを検討した. 野生型マウスの生後 3 日齢のコルチ器

器官培養に  $\gamma$ -secretase inhibitor の1種である MDL28170 を投与したところ、RBP-J 遺伝子のコンディショナルノックアウトと同様、コルチ器の内有毛細胞と外有毛細胞の数はコントロールと差がなかったが、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、コルチ器における有毛細胞のマーカーである myosin 7a 陽性の細胞が認められた (図12C)。この細胞は、別の有毛細胞のマーカーである Parv-albumin 陽性でもあった。

$\gamma$ -secretase inhibitor の作用が Notch 情報伝達系の抑制を介したものであるかを確認するため、 $\gamma$ -secretase inhibitor で処置したコルチ器から RNA を抽出し、内耳における Notch 情報伝達系の標的遺伝子で、内毛細胞領域の発生にかかわる Hes1 と外毛細胞領域の発生にかかわる Hes5、および有毛細胞の発生に必須の転写因子 Math1 の発現量を定量的 RT-PCR 法にて検討した。 $\gamma$ -secretase inhibitor 処置群では、コントロール群と比較して Hes1 の発現量に変化はなかったが、Hes5 の発現量が有意に減少しており、Math1 の発現量は増加していた (図12D)。この結果は、 $\gamma$ -secretase inhibitor 処置が Notch 情報伝達系を抑制していることを示すとともに、生後マウスコルチ器においては外毛細胞領域に Notch 情報伝達系抑制の効果が現れることを示している。また、 $\gamma$ -secretase inhibitor 処置による Math1 の発現パターンの変化を免疫組織化学によって調べたところ、処置群においてのみ myosin7a 陽性細胞が認められた領域と同様の領域に、Math1 陽性細胞を認めた (図12E)。定量的 RT-PCR の結果とあわせて、Notch 情報伝達系の抑制により Math1 の発現抑制が解除されたと考えられる。

以上の結果から、Notch 情報伝達系の遮断により、生後の哺乳類においても有毛細胞の誘導が可能であることが示され、その手段として  $\gamma$ -secretase inhibitor の投与が有効であることが示された<sup>69)</sup>。現在、生体内耳への  $\gamma$ -secretase inhibitor 投与により有毛細胞の誘導が可

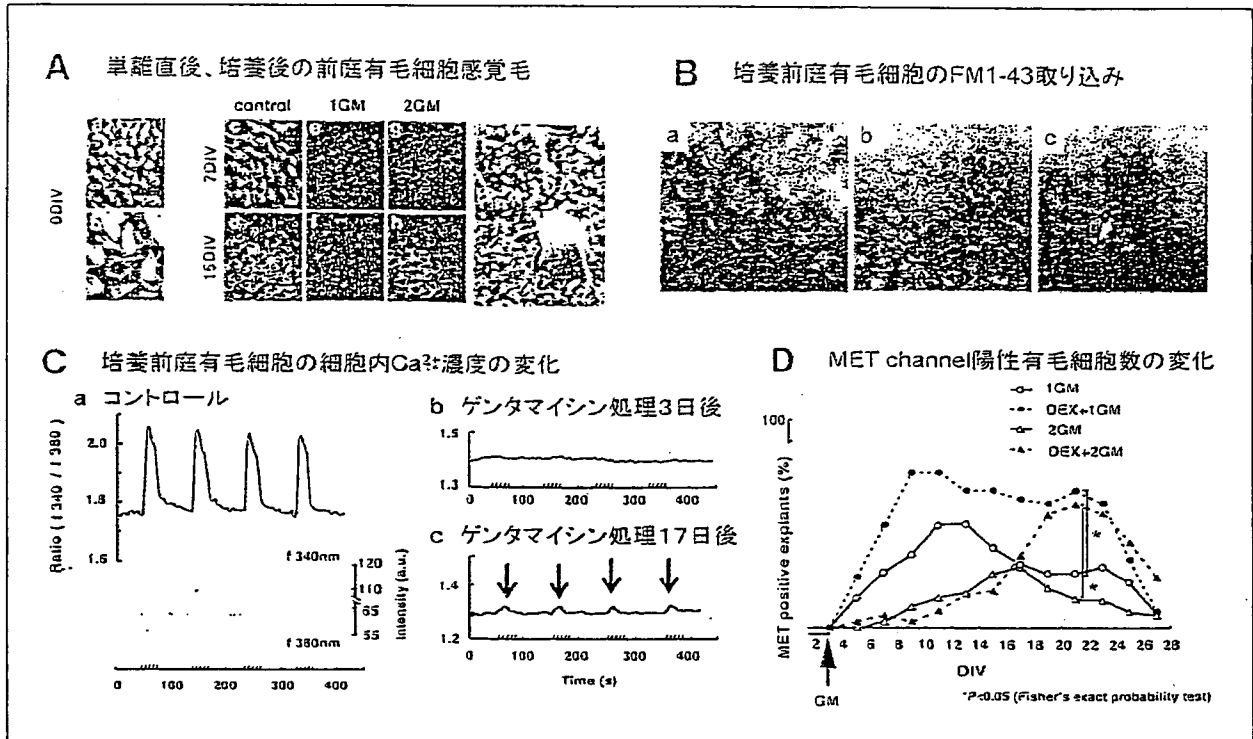
能かどうかを検討中であり、その結果によっては一気に臨床応用への可能性が開かれる。

### 3. 内耳有毛細胞の自己修復

内耳有毛細胞の自発的再生の中では、第3のメカニズムである障害有毛細胞の自己修復が中心的役割を果たすことが示唆されている<sup>64)65)</sup>。再生能力がないとされている哺乳類蝸牛感覚上皮でも、耳毒性薬物投与後の感覚上皮を詳細に観察すると、感覚毛の存在する上部構造のみが切断された形態を持つ有毛細胞が残存していることが報告されている<sup>66)</sup>。このように、構造的に、特に感覚毛が障害されているが、細胞死に陥っていない有毛細胞が残存しており、有毛細胞が持つ自己修復能力により、正常もしくはそれに近い形態を持つ有毛細胞も再生する可能性も考えられる。障害後早期の段階での治療という観点からは、最も臨床に近く、効果の期待しやすい再生機構といえる。

われわれは有毛細胞喪失を誘導した前庭感覚上皮で、どの程度有毛細胞の自己修復が起こるのか、さらに自己修復した有毛細胞が機能的か否かをラット卵形嚢器官培養を用いて解析した。培養液にアミノ配糖体であるゲンタマイシンを添加することにより、感覚上皮表面の感覚毛は消失し、一部の有毛細胞はアポトーシスに陥る。13-17日間の培養後、感覚上皮に感覚毛の再生が認められた (図13A)。この有毛細胞の再生は細胞増殖を伴うものではなく、障害された有毛細胞が自己修復したものであることが、組織学的な細胞動態の解析から確認された<sup>67)</sup>。機能的な有毛細胞には、mechano-electrical transduction (MET) channel の存在することが必要条件となる。この channel を特異的に染色する蛍光色素である FM1-43 を用いて、これら再生有毛細胞について調べたところ、MET channel の存在が確認された (図13B)。さらに、再生した感覚毛を物理的に刺激した後の細胞内カルシウムイオン濃度の変化をカルシウム標識蛍光色素である fura-2 を用いて観察したところ、感覚毛の物理的刺激に対応する有毛細

図13 自己修復による機能的な前庭有毛細胞の再生



- A: 単離直後 (a・b), コントロール培養 (c) 感覚上皮表面に感覚毛を認める。培養15日後には感覚毛が減少している (d)。1 mM ゲンタマイシン投与後では、7日後、感覚毛が減少しているが (e), 15日後やや増加している (f)。2 mM 投与では、投与7日後には全く感覚毛が認められないが (g), 15日後には未熟な形態を持つ感覚毛の再生が認められる (h・i)。
- B: コントロール培養組織では、有毛細胞に FM1-43 取り込み (赤) が認められる (a)。ゲンタマイシン投与7日後、感覚毛の消失とともに FM1-43 取り込みも消失している (b)。再生感覚毛を有する細胞では、FM1-43 取り込み (赤) が認められる (c)。
- C: コントロール培養組織では、感覚毛の物理的的刺激に伴い細胞内カルシウム濃度上昇が認められる (a)。ゲンタマイシン処理3日後の組織では反応は消失している (b)。再生感覚毛の刺激により、細胞内カルシウム濃度上昇が認められる (c)。
- D: デキサメサゾン (DEX) 添加により、MET channel 陽性細胞数の減少および再生が有意に増加する

胞での細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が確認された (図13C)。以上の所見は、哺乳類前庭有毛細胞は自己修復による再生能力を有し、再生した有毛細胞が機能的な細胞であることを示すものといえる。したがって、哺乳類前庭感覚上皮では、有毛細胞が細胞死に陥らなければ自己修復により再生する能力を持つことが分かった。

さらに、内耳感覚障害治療に用いられるステロイドホルモンであるデキサメサゾンの有毛細胞自己修復能力に対する効果を、同様のシステムを用いて評価した。デキサメサゾンの添加により、ゲンタマイシン障害後に機能的な有毛細胞

の出現頻度が上昇することが明らかとなった (図13D)。この所見は、末梢前庭障害に対するデキサメサゾンの治療効果を裏付けるものであり、臨床的見地からも非常に有意義なものといえる。

#### 4. 小 括

内耳有毛細胞再生へのストラテジーとして、① 内耳感覚上皮細胞の細胞増殖を誘導することによる有毛細胞の再生、② 残存する支持細胞の有毛細胞への分化転換、③ 細胞死に至っていない有毛細胞の自己修復についての基礎的研究開発を行った。現段階で、それぞれの方法



の臨床応用への道程を考察すると、①の細胞増殖誘導については、細胞増殖誘導の候補となる分子を *in vivo* で制御し、機能的な面で再生に貢献できるかを検証しなければならない。近い将来遺伝子導入や RNA interference などの方法を応用することにより、明らかにすることができると思われる。

②の残存する支持細胞の有毛細胞への分化転換については、Notch 情報伝達系の転写因子の一つである *Atoh1* 遺伝子をウイルスベクターを使用して蝸牛感覚上皮に導入することにより、哺乳類蝸牛で有毛細胞の再生と、部分的ではあるが機能回復が誘導されることが報告されている<sup>14)</sup>。われわれは、薬物を用いたノッチ情報伝達系の抑制により、同様の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<sup>15)</sup>、現在 *in vivo* での再現性を検討中である。この方法は、後述する内耳薬物投与システムの応用により、臨床応用できる。

一方、これらの①、②の方法で再生された有毛細胞が機能的であるためには、蝸牛、前庭それぞれの一次神経節細胞とのシナプス形成が不可欠となる。この点について、*Atoh1* 遺伝子導入により異所性に新生した有毛細胞に蝸牛の一次神経節であるラセン神経節細胞から神経突起が伸長し、接することが示されている<sup>16)</sup>。また、ES 由来神経前駆細胞を用いた器官培養系の検討でも、有毛細胞が神経細胞からの神経突起伸長を促進し、シナプス結合を形成する能力があることが分かっている<sup>17,18)</sup>。すなわち、有毛細胞が再生できれば、残存する一次神経節細胞からの神経突起の伸長が再生有毛細胞により誘導され、シナプス結合再生が形成される可能性が高いと考えられる。したがって、内耳感覚上皮で有毛細胞の再生が誘導でき、ラセン神経節細胞が残存していれば、一次神経節との神経接合が自動的に再生されることが期待できる。

第三のメカニズムである障害有毛細胞の自己修復の誘導は、最も臨床に近い現実的な戦略といえる。われわれの検討では、前庭感覚上皮に

おける自己修復能力を明らかにすることができたが、今後聴覚を司る蝸牛感覚上皮で同様の自己修復が誘導可能か否か、また、効率的に誘導できる因子は何かを明らかにする必要がある。自己修復による再生では、障害された有毛細胞が細胞死に陥らないことが必要条件となる。したがって、内耳有毛細胞を細胞死から防御する方法の確立が、再生誘導の観点からも重要となる。すでに多くの薬物が、内耳有毛細胞を細胞死から守る効果を持つことが示されている。

これらの研究成果を臨床に橋渡しするためには、実際に内耳に的確に薬物を到達させるシステム開発が不可欠となる。これが、次項で述べる内耳薬物投与システムである。

#### IV. 内耳薬物投与システムの開発

内耳障害に関する基礎的研究成果の臨床への応用が進まない原因として、有効な薬物を安全かつ確実に内耳に到達させることが困難であることがあげられる。内耳に至る血流はきわめて少ないので、全身投与された薬物のごく一部しか内耳には到達しない。さらに、内耳には血液脳脊髄液関門と同様の血液内耳関門が存在し<sup>19)</sup>、血液から内耳への物質移行は厳密にコントロールされている。つまり、全身投与では内耳に薬物が到達しないか、到達しても有効な濃度に達することは難しい。

以上のような背景から、動物実験では薬物の内耳への局所投与が用いられている。局所投与であれば、内耳に十分な量の薬物を投与することが容易であり、全身的な副作用の危険を減じることができる。Ⅲ.の項で述べた、内耳に残存する能力を活性化して内耳再生を誘導するストラテジーでは、内耳に適切に薬物を確実に投与する手段が必要となる。また細胞移植に関しても、移植細胞の良好な生着を得るために栄養因子を移植と同時に添加する工夫も必要となるが、ここでも内耳への薬物投与が問題となる。すなわち、内耳再生についても、基礎的研究成果の臨床応用を考慮する段階で、必ず内耳薬物投与方法が必要となる。したがって、臨床で使

用可能な内耳薬物投与システムの開発は、不可欠な研究課題であることが分かる。われわれは、内耳薬物投与システムの開発に際して、近年、急速な発展をみせているバイオマテリアルに着目した。

薬物徐放に応用されているバイオマテリアルは多々あるが、生体内で分解吸収される材料と分解されない材料に大別することができる。経皮投与で汎用されているシリコンポリマーは、後者に属する。内耳薬物投与についても応用研究が行われているが<sup>70)</sup>、異物を中耳に残すことになり、望ましい方法とはいえない。また、反復投与は不可能である。生体内で分解される生体吸収性材料は、生合成される材料と天然材料に分けることができる。

われわれは、合成型の材料として、吸収系に用いられている材料であるポリ乳酸/グリコール酸 (PLGA) ポリマー、天然材料として、ゼラチンハイドロゲルの内耳薬物投与への応用についての研究を行った。

内耳は骨に囲まれた組織であり、周囲の器官との交通は限られているので薬物投与は困難であるが、逆に一度投与された薬物は内耳にのみ高濃度に残存することに合目的な構造を有している。内耳は正円窓という部位においてのみ膜構造を有し、中耳と接している。本研究では、中耳から正円窓膜を介して内耳に薬物を投与する経路を用いた。

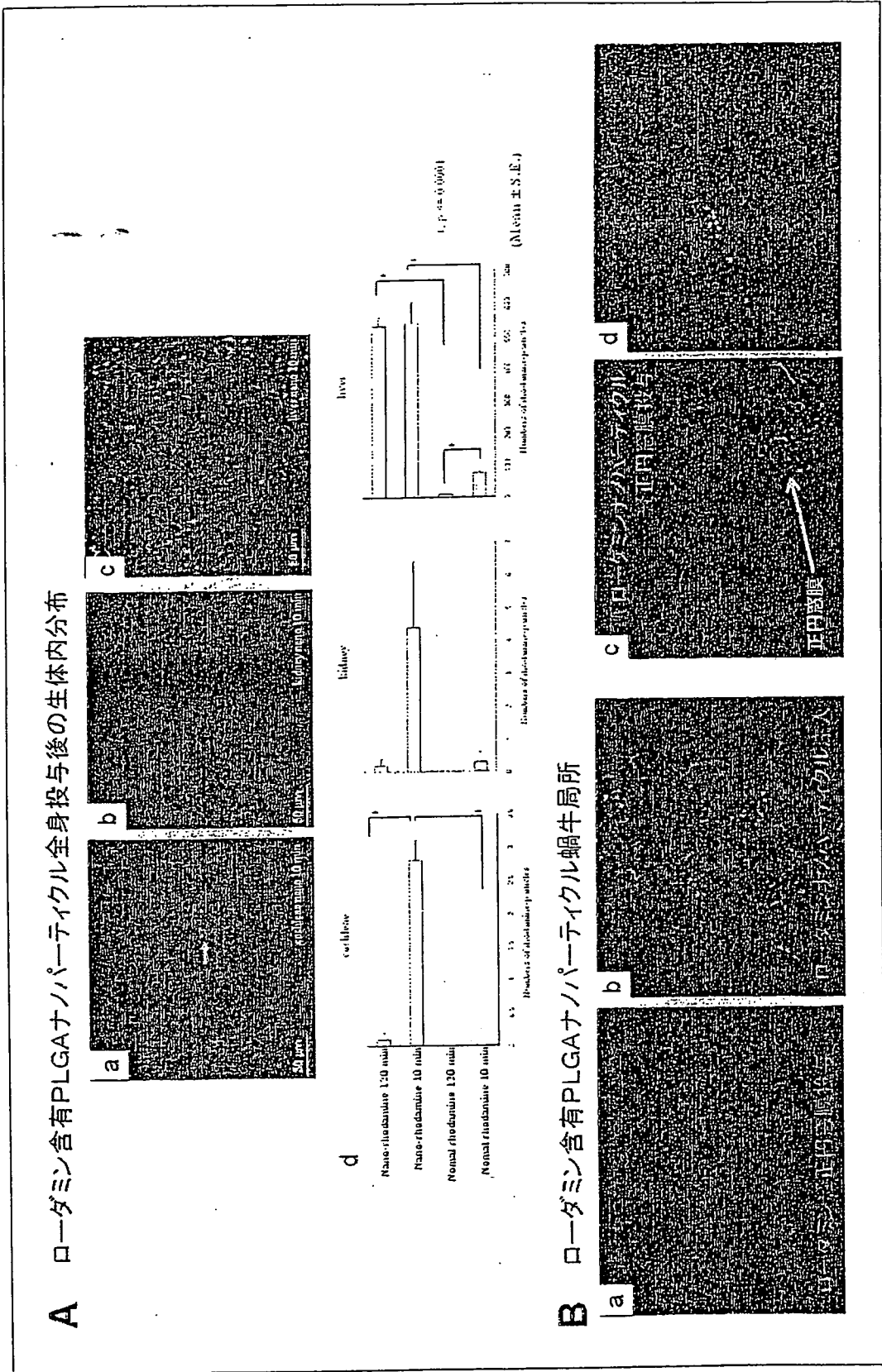
1. ポリ乳酸/グリコール酸 (PLGA) ナノパーティクルを使用した内耳薬物投与システム  
ポリ乳酸およびポリグリコール酸ポリマーで薬物を包み込んだ粒子を作製し、薬物を徐放する方法の有効性がすでに報告されている<sup>70)71)</sup>。ポリ乳酸とポリグリコール酸の混合比や形成する粒子のサイズによって、生体内での徐放速度を決めることができる。PLGA と薬物からなるポリマーは、アセトンにこれらを融解して作製されるので、使用する薬物は脂溶性のものが適しており、アセトンにより変性する可能性があるタンパクやペプチドには適さない方法とい

える。また、生成するポリマーのサイズや安定性の関係から、分子量が小さい薬物に適すると考えられる。最近の PLGA ポリマー生成技術の進歩により、PLGA ナノパーティクルの安定生成が可能となった<sup>70)</sup>。また、PLGA ナノパーティクルが炎症細胞に選択的に集積することなど、薬物投与のターゲティングにも応用できる可能性が示唆されている<sup>71)</sup>。

われわれは、PLGA ナノパーティクルの内耳薬物投与への応用の可能性を調べる目的で、蛍光色素であるローダミンを含有した外径 140-180nm の PLGA ナノパーティクルを作製し、全身投与および局所投与後の内耳でのローダミンの分布をモルモットを用いて検討した。コントロールとして、ナノパーティクル化していないローダミンを同用量投与した組織を用いた。全身投与に関する検討では、ローダミンを含有するナノパーティクル 20 $\mu$ g/mL、0.25mL を大腿静脈から静脈内投与し、投与 10、120 分後に蝸牛、肝臓を採取した (図14A)。肝臓では、ナノパーティクル化したローダミンを投与した場合、投与 10、120 分後ともに多くの蛍光粒子が組織内に認められた。一方、ナノパーティクル化していないローダミンを投与した場合は、投与 10 分後には蛍光粒子が認められたが、120 分後にはごくわずかしが認められなかった。また、投与 10、120 分後双方で、ナノパーティクルを投与した組織に有意に多くの蛍光粒子を認めることができた<sup>72)</sup>。以上の結果は、ローダミンをナノパーティクル化することにより、肝臓での組織集積性が高まり、ローダミンの徐放効果があることを示している。

蝸牛においては、ナノパーティクル化したローダミンの投与 10 分後では蛍光粒子が蝸牛の血管に相当する部分に認められたが、120 分後にはごくわずかに認めるのみであった<sup>72)</sup>。ナノパーティクル化していないローダミンを投与した場合には、全く蛍光粒子は認められなかった。したがって、ナノパーティクル化することにより、蝸牛でも組織集積性が高まる可能性があるが、徐放性は期待できないと考えられた。

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



A : ローダミン含有 PLGA ナノパーティクル全身投与 10 分後, 蝸牛では血管に相等する部位でのみローダミン蛍光 (赤) が認められた (a). 腎臓 (b), 肝臓 (c) では, 多くの蛍光が認められた. 肝臓でのみローダミンの徐放が示唆された (d).

B : 通常のローダミン正円窓膜上投与 24 時間後, 蝸牛内に蛍光は認められない (a). ローダミン含有 PLGA ナノパーティクルを蝸牛内に注入すると, 蝸牛全体に蛍光が認められる (b). ローダミン含有 PLGA ナノパーティクル正円窓膜上投与後, 蝸牛腎臓膜に蛍光が認められた (c・d).

(2007.3)

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

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

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

## 2. ゼラチンハイドロゲルを使用した内耳薬物投与システム

ゼラチンハイドロゲルは、コラーゲンとグル

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

薬物を投与する 30 分前にゼラチンハイドロゲルと混合するのみで、薬物とゼラチンポリマーの複合体が形成できる。この方法は、すでに血管再生を目的とした細胞成長因子の投与で臨床応用が行われている<sup>70)</sup>。非常に簡便な方法であり、毒性の問題もなく、安全性も高い方法である。われわれは内耳局所投与、特に神経栄養因子や細胞成長因子の投与に応用可能であると考えた。

ラセン神経節の生存促進作用が知られている<sup>70)</sup> BDNF を投与薬物とし、ゼラチンハイドロゲルを正円窓膜上に留置した場合の蝸牛外リンパ液中への移行について、モルモットを用い、ELISA 法にて解析した。コントロールとして、生食を浸透させたハイドロゲルを留置した蝸牛、正円窓膜から同用量の BDNF を直接注入した蝸牛を用い、投与 3, 7 日後に蝸牛外リンパ液を採取し、BDNF の濃度を調べた。その結果、生食留置および直接注入例の蝸牛外リンパ液中にはごくわずかの BDNF しか認められなかったが、ハイドロゲルを正円窓上に留置した蝸牛では有意に高濃度の BDNF が検出された (図15A)。投与 3 日後で直接注入例の 30 倍、投与 7 日後では 100 倍以上の BDNF 濃度が、ハイドロゲルを用いて投与した蝸牛で認められた<sup>6)</sup>。以上の結果は、ゼラチンハイドロゲルが、経正円窓膜的に内耳に BDNF を投与