

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

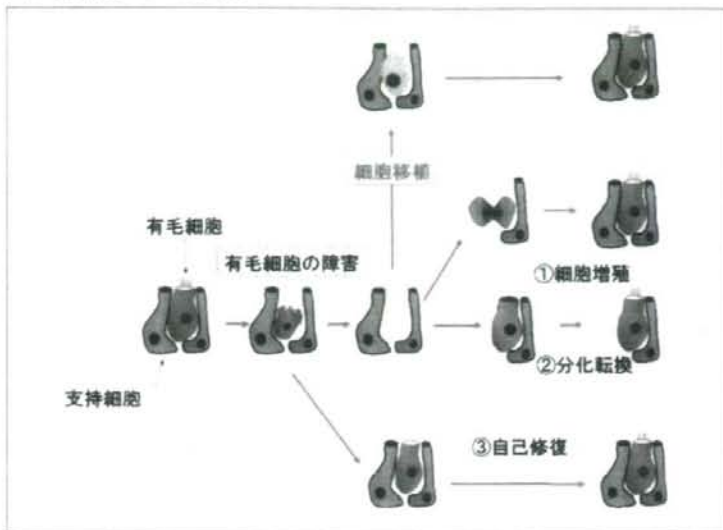
- I. 緒言
- II. 細胞移植による内耳再生
 - 1. 内耳細胞移植技術の開発
 - 2. 神経幹細胞移植
 - 3. 内耳前駆細胞の分離培養と移植
 - 4. 胚性幹細胞移植
 - 5. 骨髄由来細胞移植
 - 6. 細胞移植による内耳遺伝子導入
 - 7. 小括
- III. 内耳の自発的再生の誘導
 - 1. 内耳での細胞増殖制御機構
 - 2. 内耳有毛細胞の分化運命決定機構の解明による内耳再生
 - 3. 内耳有毛細胞の自己修復
 - 4. 小括
- IV. 内耳薬物投与システムの開発
 - 1. PLGA ナノパーティクルを使用した内耳薬物投与システム
 - 2. ゼラチン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

I. 緒 言

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 *Bfn3c* 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学を応用する場合、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適用し、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) 内耳薬物投与とシステム開発

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 2 A)。マウス蝸牛では、蝸牛基底回転上を鋸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⁹⁾。

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⁹⁾。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

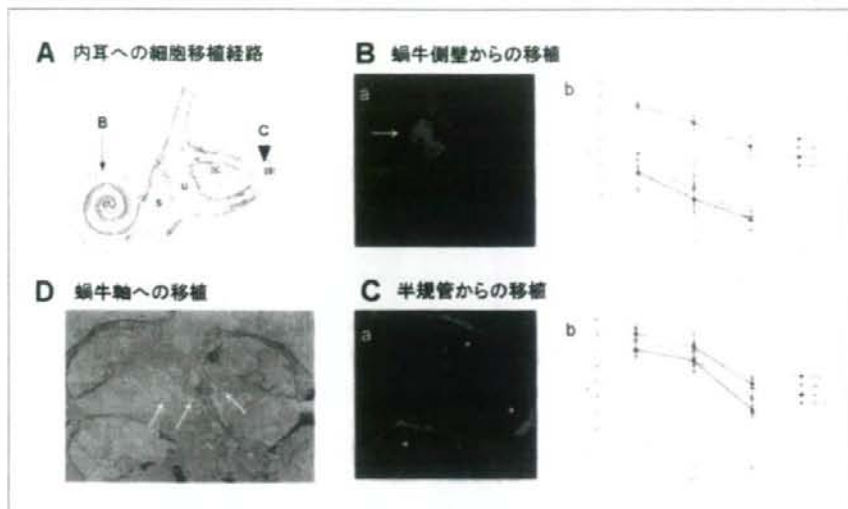
神経幹細胞の内耳移植細胞としての能力を評価する目的で、生後3週の内耳機能の成熟したマウスに前処置を加えることなく、半規管からGFPにて標識した胎仔間脳由来の神経幹細胞を移植し、4週間後に組織学的解析を行った。移植細胞は蝸牛の外リンパ腔に認められ、蝸牛組織内に侵入する細胞は認められなかった(図3A)。網膜への移植実験でも、障害を惹起していない正常の網膜には、神経幹細胞は侵入しないことが示されており、これに合致する所見と考えられる。一方、移植細胞は、蝸牛の基底

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⁹⁾。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⁹⁾、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、ラセン線、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。灰色の部分は誤差を示す。
 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

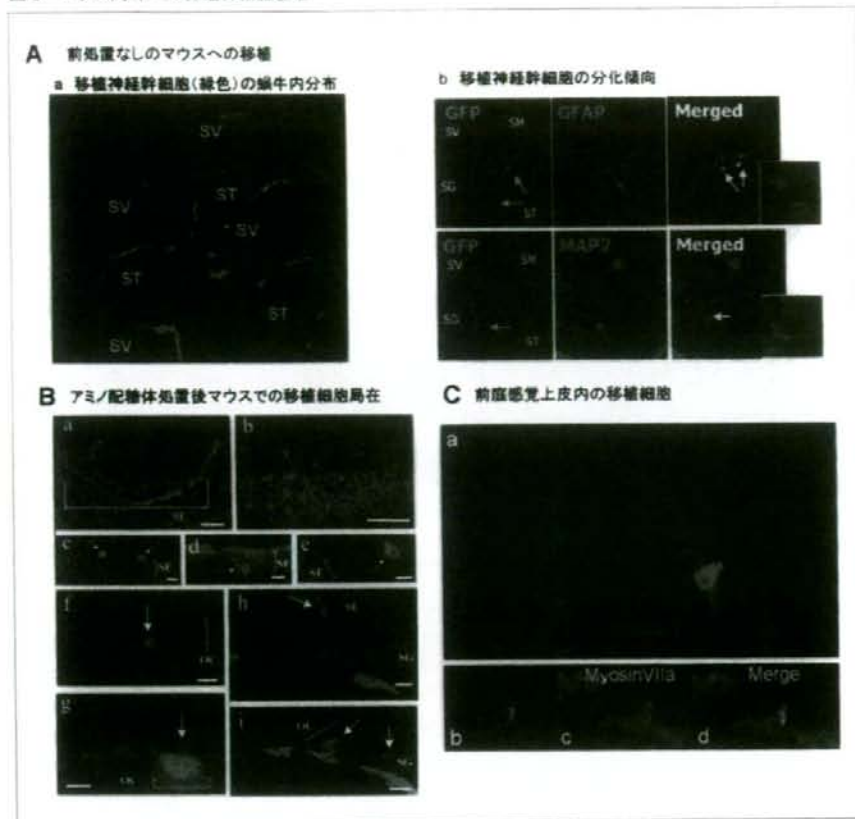
内耳再生を目的とした移植細胞について考えた場合、最も理想的な細胞ソースは内耳由来細胞であり、より未熟な胎児から採取された細胞が望ましい。われわれは「内耳幹細胞」、「内耳前駆細胞」とも呼べる細胞が分離・培養でき、また内耳への細胞移植のドナーとして使用できるかを検討した。

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。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⁶。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^{13,14}。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出来る。

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

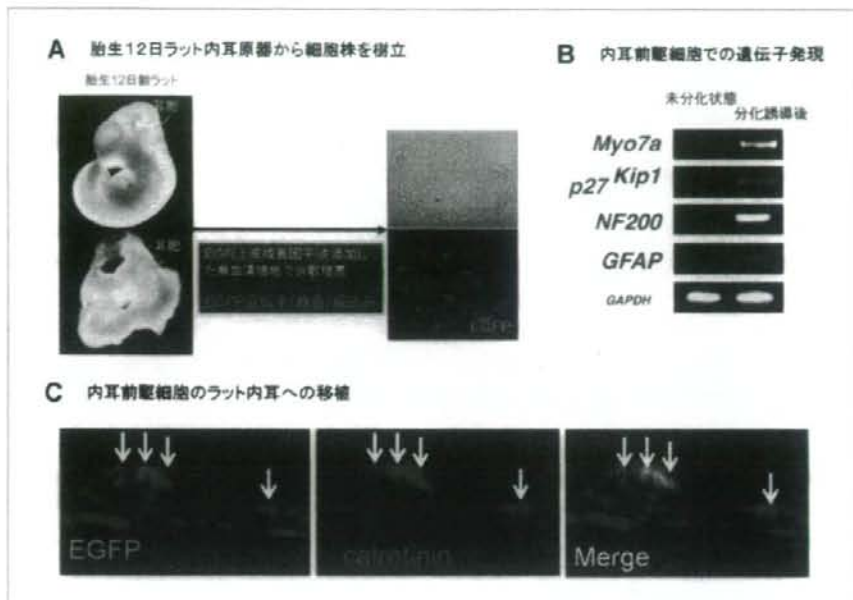
デルを用いた。アミノ配糖体であるカナマイシンと、利尿薬であるエタクリン酸を全身投与することにより、モルモットは 3-4 日で聾となる^{16,17}。この 3 週間後には、ラセン神経節細胞の変性、消失が誘導される¹⁸。このタイミングで、人工内耳手術のアプローチに準じ、蝸牛基底回転に開窓し、同部から蝸牛軸に ES 由来神経前駆細胞を移植した。移植 4 週間後に、ラセン神経を直接電気刺激し、脳波にて脳幹の反応を記録する eABR にて、ラセン神経節機能評価を行った後に内耳組織を採取した。移植細胞を含まない培養液のみを注入した動物をコントロールとした。eABR の閾値は、コントロールでは約 0.9mA 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¹⁹。

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²⁰。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。霊長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日ラットから耳蝗(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 Va (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、閉鎖した。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所に挿入した。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

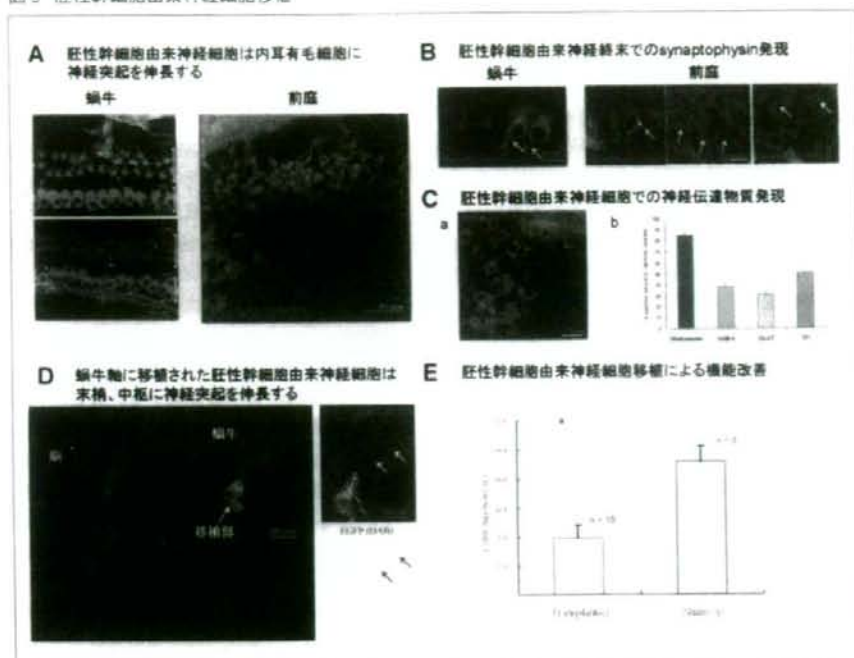
能回復傾向が認められた。この結果をヒトに応用できれば、人工内耳を使用した言葉の聞き取りも飛躍的に向上するものと期待される。

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えることができる。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。骨髄には、造血幹細胞、間葉系幹細胞

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 NMDA1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

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²⁰。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²¹。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²⁰。この所見は、骨髄由来間葉系細胞が蝸牛側壁の組織、特にラセン靱

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、ラセン靱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²²。ラセン靱帯の線維細胞は、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、ラセン靱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^{23,24}。このような背景から、骨髄由来間葉系細胞のラセン靱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、どの程度ラセン靱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¹⁰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、半数以上がラセン靱帯に局在していることが判明した²⁰。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靱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²⁰⁾。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²¹⁾、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²²⁾。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。

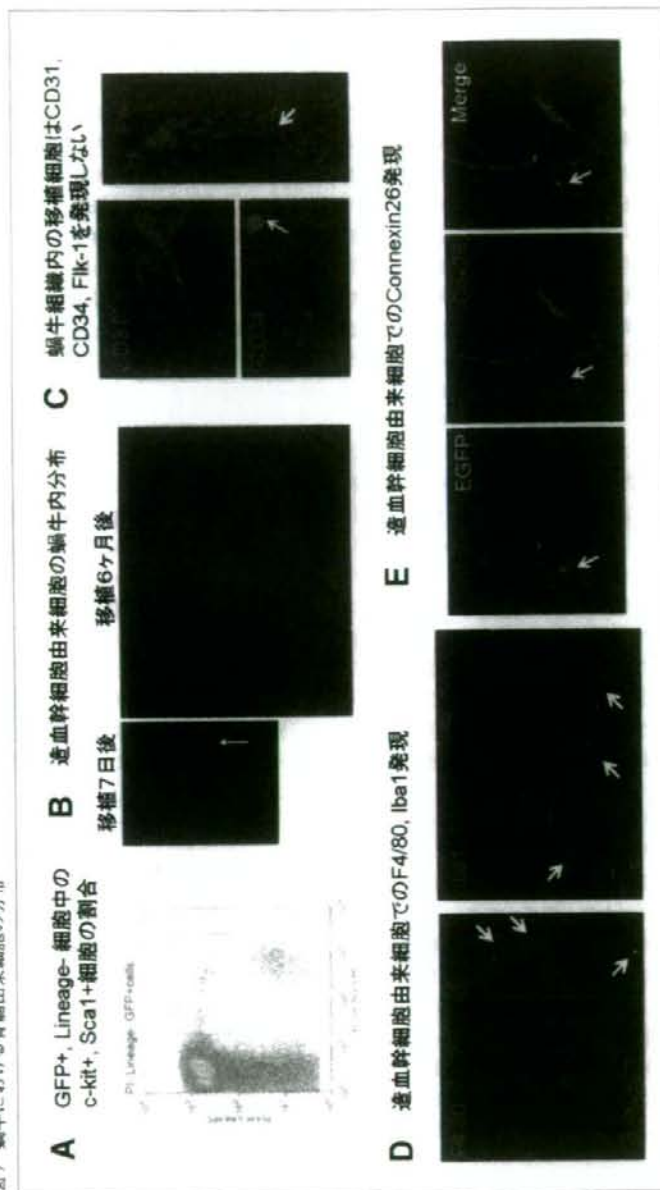
われわれは、骨髄由来細胞の蝸牛での役割を調べるために、GFP にて標識した造血幹細胞移植後のマウス蝸牛における移植細胞の局在およびその分化傾向について組織学的解析を行った。通常の骨髄移植実験と同様に、950cGy 放射線照射を行ったマウスに尾静脈より造血幹細胞を注入した。造血幹細胞は GFP マウス骨髄から造血幹細胞 (Lin⁻, Scal⁺, c-kit⁺) を Fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて回収した (図 7A)。移植 7 日後、3、6 ヶ月後の蝸牛における GFP 陽性細胞の分布を組織学的に解析した。移植 7 日後に採取した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 7B)。一方、肝臓では多数の移植細胞が肝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 7B)。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 7C)。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 7D)。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²³⁾。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²⁴⁾。

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 の発現に関する解析を加えた。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 7E)。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⁻, c-kit⁺, Sca1⁺ 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、CD31, CD34, Flk-1 発現を認めない。血管内あるいは骨髄には、CD31, 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あるいはマクロファージのマーカである 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。

ラセン靱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靱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、ラセン靱帯、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²⁰。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^{20,21}。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^{14,22}、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²³。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の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にした (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³³。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³⁴。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: 雄牛 (a・b) および胎形章 (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³⁰。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^{30,31}。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³⁰。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 ポ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³²。

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³²。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

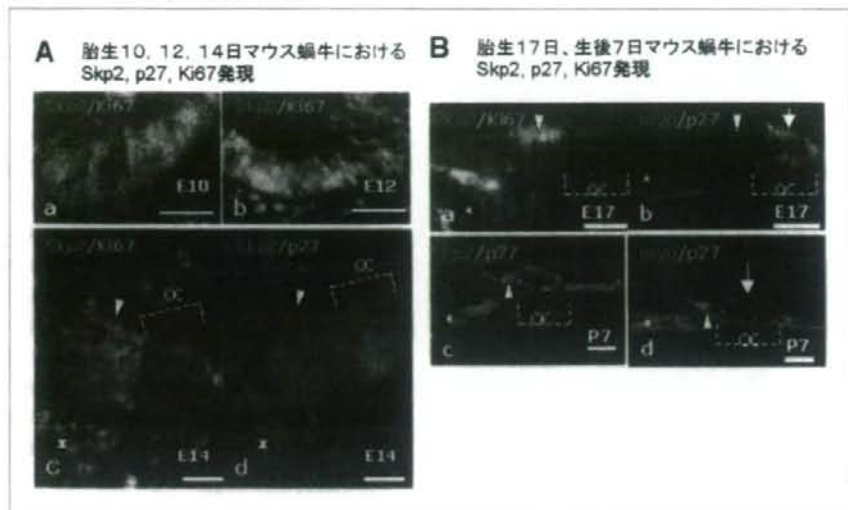
わち、有毛細胞では、タンパク転写レベルより上流で p27kip1 の発現が制御されていると推察される。最近、転写レベルでの p27kip1 発現制御が、特に有毛細胞への分化調節に重要な役割を果たすことが報告されている³³。一方、胎生期 14 日目以降も、感覚上皮予定領域の周辺では細胞増殖が引き続き認められる (図 9 B)。これらの部位では、skp2 の発現が散見され、発達とともに徐々に skp2 発現細胞は減少し、感覚上皮予定領域のようなドラマティックな発現の変化は認められない。感覚上皮予定領域周辺部に増殖能力を有する細胞が生後の早い段階まで残存していることから、この領域の細胞増殖制御にも skp2 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³⁴、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^{35,36}。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日目では, 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¹⁾。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²⁾。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³⁾。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-