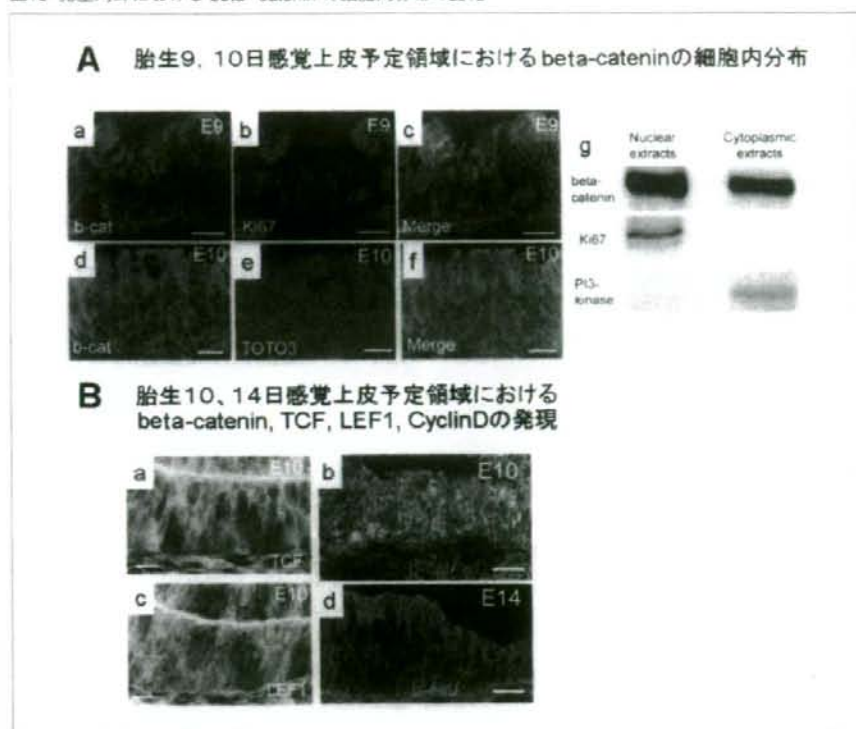


図10 発生内耳における beta-catenin の細胞内分布の変化



- 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>17</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>18</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>19</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>90</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>91</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 を介した情報伝達に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>92</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>93</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>94</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。

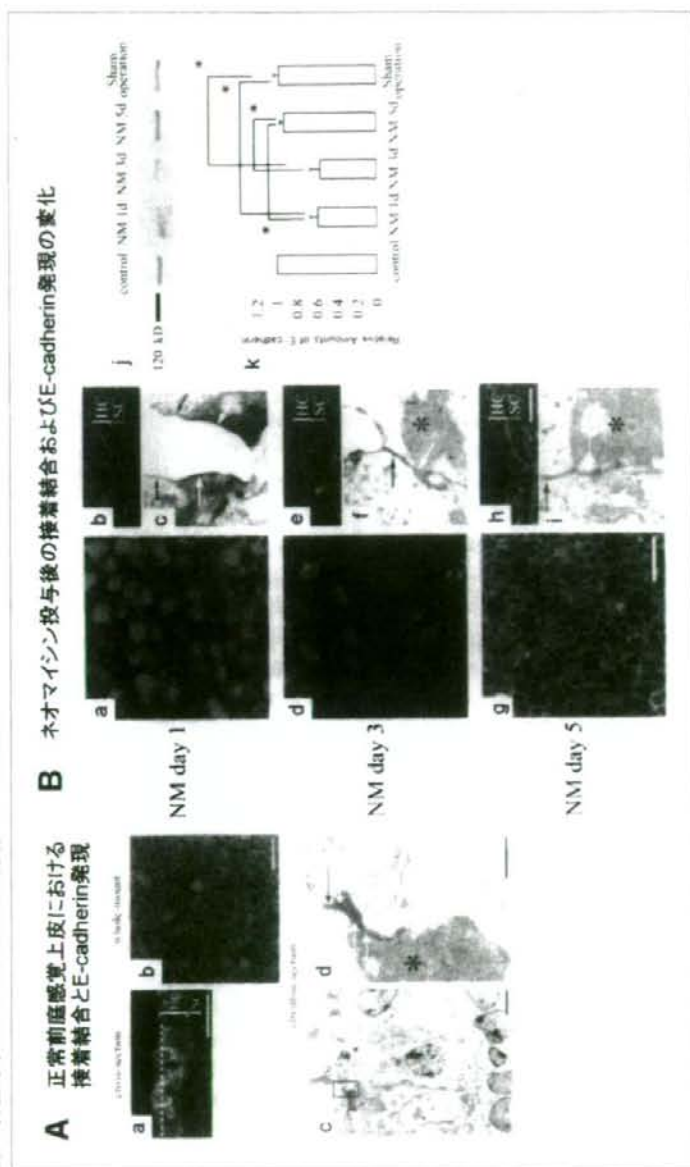
耳毒性薬物であるアミノ配糖体のマウス内耳への局所投与モデル<sup>95</sup>を用い、有毛細胞喪失誘導後の卵形嚢感覚上皮における変化を観察した<sup>96</sup>。アミノ配糖体投与直後から、前庭感覚上皮における E-cadherin の発現は有意に低下し、形態学的に接着結合が破壊されていることが示された(図11)。しかし、有毛細胞障害、脱落の収束とともに、直ちに感覚上皮における接着結合は修復され、E-cadherin の発現パターンおよび発現量は、正常と同様に回復することが判明した(図11)。他の組織では、E-cadherin の発現低下と接着結合の解離は細胞増殖活性と関連することが報告されており、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



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 (黒星印)、デスモゾーム (黒星印) 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)、接着結合の層間が認められる (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、均一な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取りの役割を果たす。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列の内毛細胞、3列の外毛細胞、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

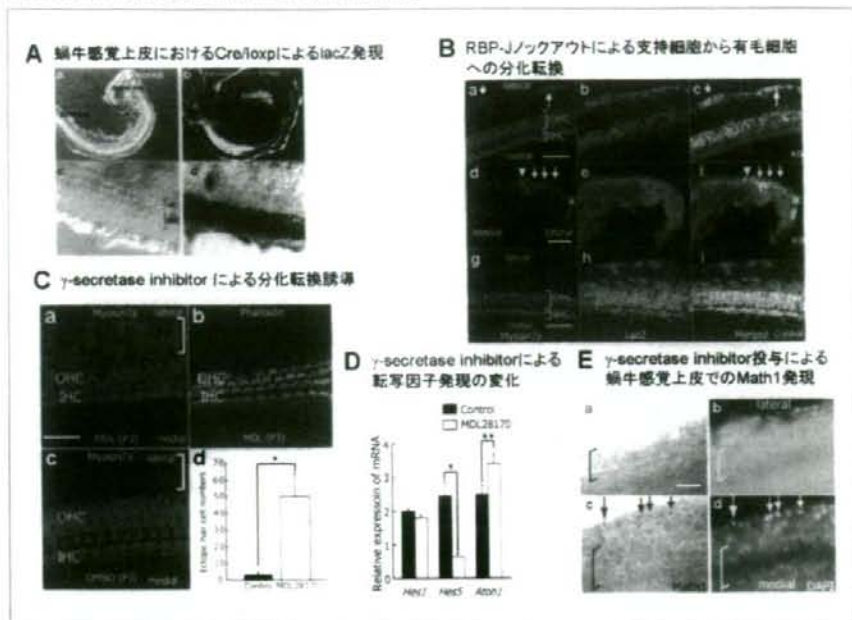
場合、有毛細胞が誘導された<sup>61)</sup>。

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: アド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, *Atoh1* 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>41</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時, 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>42</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 と外有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同時に、生後マウスコルチ器においては外有毛細胞領域に 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>60)</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

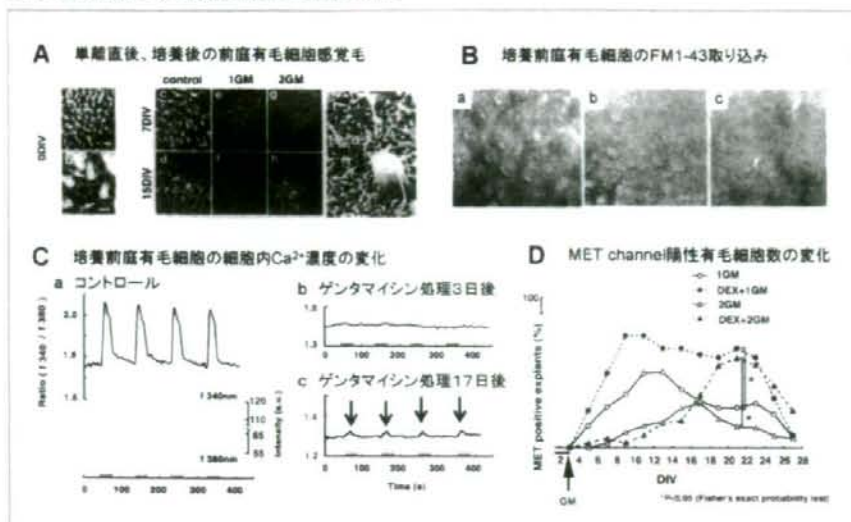
能かどうかを検討中であり、その結果によっては一気に臨床応用への可能性が開かれる。

### 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>60)</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>60)</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蝸器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>61)</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胞

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>10)</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>11)</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>12)</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>13)14)</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>15)</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>66)</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、吸収糸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。

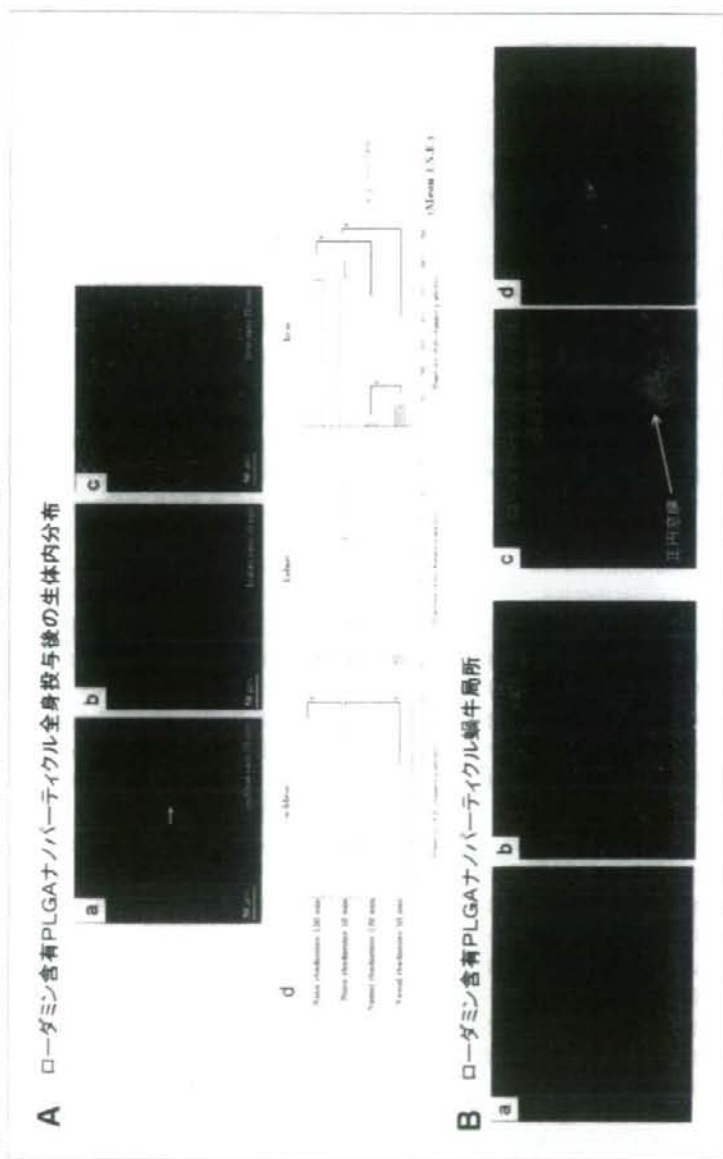
1. ポリ乳酸/グリコール酸 (PLGA) ナノパーティクルを使用した内耳薬物投与システム  
ポリ乳酸およびポリグリコール酸ポリマーで薬物を包み込んだ粒子を作製し、薬物を徐放する方法の有効性がすでに報告されている<sup>66)7)</sup>。ポリ乳酸とポリグリコール酸の混合比や形成する粒子のサイズによって、生体内での徐放速度を決めることができる。PLGA と薬物からなるポリマーは、アセトンにこれらを融解して作製されるので、使用する薬物は脂溶性のものが適しており、アセトンにより変性する可能性があるタンパクやペプチドには適さない方法とい

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き認められなかった。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、蝸牛では血管に相当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排泄が示唆された (d)。

B: 通常のローダミン正門窓膜上投与 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門窓膜上投与後、蝸牛底室層に蛍光が認められた (c・d)。

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

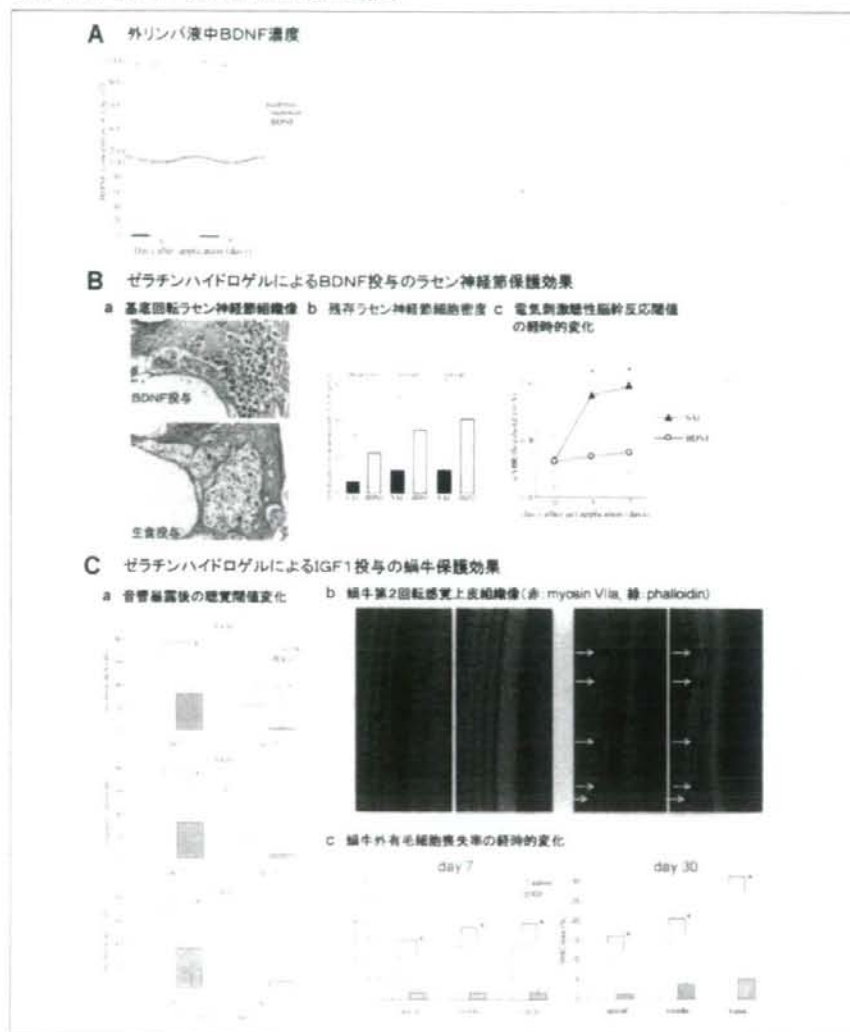
ゼラチンハイドロゲルは、コラーゲンとグル

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>71)</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>72)</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膜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>10)</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

図15 セラチンハイドロゲルによる内耳薬物投与



A: BDNF をセ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: セ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: セ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た (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<sup>20</sup>。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経て、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、われわれのや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境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 cochlea 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, Mugeruma 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 I, 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 transdifferentiation: 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, Zacksenhaus 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 MA, Brown MC, Hinds PW, Corey DP, Vetter DE, Chen ZY: 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 BG, 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) Leonova 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) Whitton DS, Zhang X, Pecelunas K, Greiner MA: 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 J E, Meyers J R, Periasamy A, Corwin J T: Survival of bundleless hair cells and subsequent bundle replacement in the bullfrog's sacculus. *J Neurobiol* 50 (2): 81-92, 2002.
- 65) Zheng J L, Keller G, Gao W Q: 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 H J, 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 Ito<sup>1</sup>, Takayuki Nakagawa<sup>1</sup>, Norio Yamamoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery,  
Graduate School of Medicine, Kyoto University

<sup>2</sup> 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  
新しい治療法への展望

## 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)