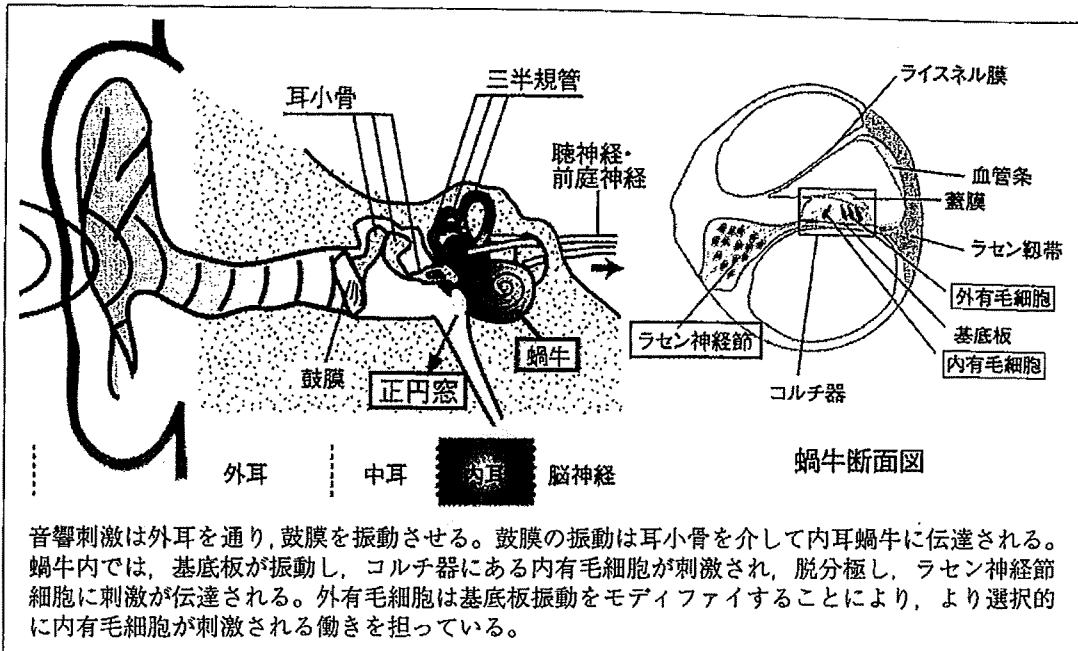


図1 中耳, 内耳解剖



テムが必要となる。われわれは臨床応用への観点から、バイオマテリアルを用いた神経栄養因子や細胞増殖因子の内耳への徐放を考え、研究開発を行ってきた。この方法では、神経栄養因子や細胞増殖因子を含ませたバイオマテリアルを中耳に留置するという簡単で安全な方法で薬物投与ができる。現在この方法を用いて、一部の研究成果は臨床応用に至っている。本稿では、バイオマテリアルとして生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用い、内耳に神経栄養因子や細胞増殖因子を投与する新しい感音難聴治療について紹介する。

## I. 内耳と神経栄養因子, 細胞増殖因子

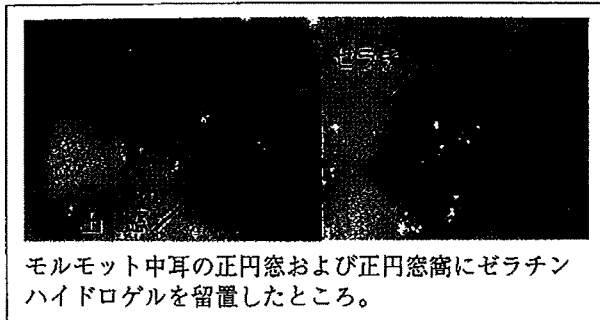
神経栄養因子や細胞増殖因子は、他の臓器と同様に内耳の発生段階において重要な役割を果たしていることが数多くのノックアウトマウスを用いた研究から明らかにされている。さらに、成熟後においても神経栄養因子や細胞増殖因子が内耳の細胞の生存維持や機能に不可欠であることが知られている。例えば、有毛細胞が受容した音響刺激を中枢に伝える役割を担っているラセン神経節細胞は、脳由来神経栄養因子 (BDNF) や Neurotrophin3 が欠如すると細胞死に陥る<sup>3)</sup>。BDNF や Neurotrophin3 は有毛細胞が産生し、パ

ラクラインによりラセン神経節細胞の生存が維持されている。さらに、障害を受けた内耳に神経栄養因子や細胞増殖因子を体外から投与することにより、有毛細胞やラセン神経節細胞を細胞死から回避させることができることが報告されている<sup>12)4)</sup>。このような背景から、神経栄養因子や細胞増殖因子は感音難聴を含めた内耳障害の治療薬として期待されている。

## II. ゼラチンハイドロゲルを用いた内耳薬物投与

ドラッグデリバリーは、再生医学や組織工学の分野で注目されている研究テーマであり、世界で活発な研究が行われており、広義での再生医療の臨床応用の鍵を握る技術といえる。われわれは、ドラッグデリバリー分野の研究成果を内耳に応用することにより、内耳への薬物徐放という問題は解決できるのではないかと考え、神経栄養因子や細胞増殖因子の徐放に適したゼラチンハイドロゲルを用いた研究を展開した。田畑らは、化学的架橋によりゼラチンを重合させたポリマーを作製し、静電結合により薬物をゼラチンポリマーに結合させ、ゼラチンポリマーの生体内での分解により薬物を徐放するシステムを開発し、種々の神経

図② ゼラチンハイドロゲルの正円窓留置



栄養因子や細胞増殖因子の徐放が可能であることを示している<sup>9)</sup>。静電結合の強さやゼラチンポリマーの重合の強さによって徐放のスピードは調整可能とされている。

われわれは、まず BDNF を投与薬物として選択し、蝸牛のラセン神経節細胞に対する保護効果を検討した。BDNF は、ラセン神経節細胞の発生・生存に深く関与していることが知られており<sup>8)</sup>、最近では聴覚刺激の中枢への伝達調整にも関与していることが示されている<sup>9)</sup>。さらに、埋め込み型ポンプや遺伝子導入を用いた実験などで、ラセン神経節細胞に対する細胞死からの保護効果が示されていた<sup>10)</sup>。したがって、BDNF によるラセン神経節細胞保護実験は、ゼラチンハイドロゲルの神経栄養因子や細胞増殖因子を内耳徐放する方法としての有効性を検証するよいモデルと考えられた。まず、BDNF を含浸させたハイドロゲルを中耳正円窓<sup>11)</sup>膜上に留置し(図②)、蝸牛外リンパ中の BDNF 濃度を経時的に ELISA 法にて計測したところ、1週間以上の徐放効果が期待できることがわかった<sup>12)</sup>。次に、耳毒性薬物全身投与により蝸牛有毛細胞を喪失させ、二次的なラセン神経節細胞変性が誘導されるモデルを用い、ハイドロゲルによる BDNF 局所投与によるラセン神経節細胞の組織学的・機能的な保護効果について調べた。ゼラチンハイドロゲルによる BDNF 投与により、組織学的にラセン神経節細胞の減少が抑制され、機能が保持されることが電気刺激聴性脳幹反応にて示された<sup>13)</sup>。ゼラチンハイドロゲルを用いた場合の組織学的・電気生理学的な保護効果は、埋め込み型ポンプを用いた場合<sup>14)</sup>と同等であり、ゼラ

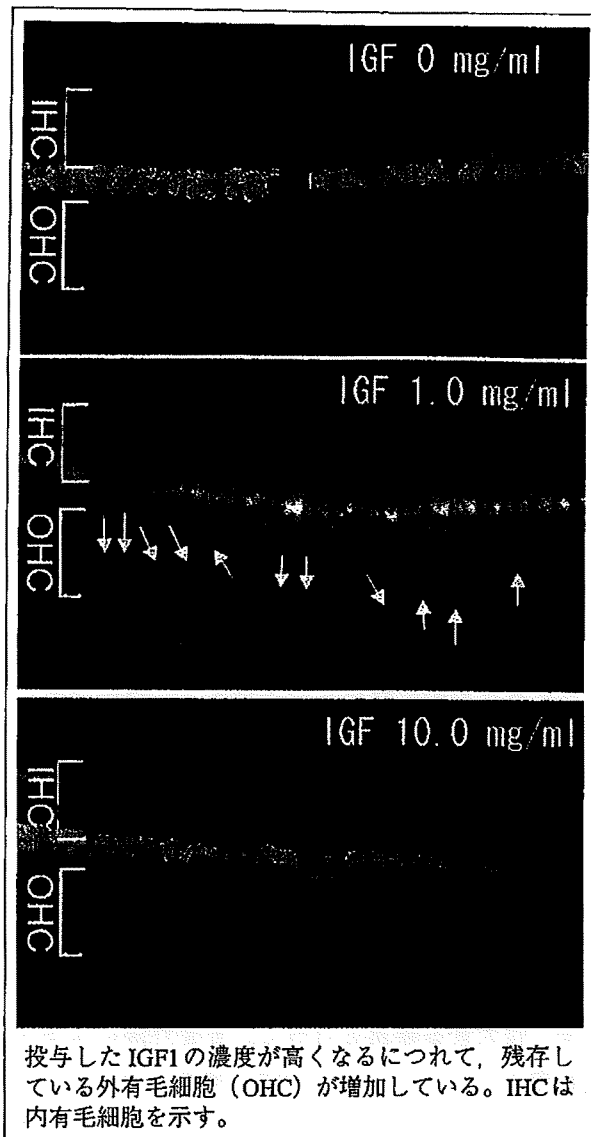
チンハイドロゲルを用いることにより埋め込み型ポンプと同等の薬物投与効果が得られることが示唆された。つまり、ゼラチンハイドロゲルは内耳への神経栄養因子や細胞増殖因子の投与に有用な方法であることが示されたといえる。

### 1. ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 投与による内耳保護

臨床応用への次のステップとして、すでに臨床での使用が認可されている薬物である細胞増殖因子を用いた実験を行った。いくつかの細胞増殖因子が臨床に供されているが、インスリン様細胞増殖因子 1 (IGF1) を選択した。IGF1 を選択した理由は、第一に日本および米国ですでに市販されている薬物であったこと、第二に内耳の発生に関与し、内耳保護効果を示唆する基礎的な研究結果<sup>15)</sup>があったという 2 点である。また、臨床的にも重篤な有害事象が報告されておらず、安全性が高いことも理由に含まれる。しかしながら、BDNF と比較して、IGF1 の内耳保護効果は十分に検討されているとはいえなかったため、まず効果が期待しやすい条件、すなわち障害を与える前に薬物投与を行う条件での実験を行った。BDNF 実験と同様の方法、すなわち、IGF1 を含浸させたゼラチンハイドロゲルを正円窓膜上に留置し、その後、強大音響曝露を行った。音響外傷による感音難聴は、主として有毛細胞の障害・消失によって引き起こされるが、ラセン神経節細胞や血管条など他の蝸牛組織も障害される、いわば蝸牛の総合的な障害モデルととらえることができ、急性の感音難聴に対する治療効果を調べるモデルとして妥当と考えた。結果、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 投与により、恒久的な聴覚閾値上昇をほぼ完全に抑制することができ、組織学的な有毛細胞の保護も確認された<sup>16)</sup>。つまり、IGF1 は有毛細胞保護効果を有し、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 局所投与は音響外傷による急性高度難聴に対して有効である可能性が示された。

次の段階として、治療的效果を調べるために、薬物投与を障害後、すなわち難聴発症後に投与する実験を行った。急性高度難聴を対象とした臨床試験を想定し、音響外傷モデルに加え、内耳虚

図③ IGF1による蝸牛感覚上皮保護効果



血障害モデル<sup>13)</sup>での有効性も検討した。内耳虚血は、突発性難聴<sup>14)</sup>の病態の一つと考えられている。音響外傷後に IGF1 を投与した場合、音響曝露前投与に比べると効果は劣るものの、有意の聴覚閾値上昇抑制が確認され、有毛細胞の保護効果も確認された (図③)<sup>15)</sup>。内耳虚血モデルでも聴覚閾値の上昇が抑制され、組織学的にも蝸牛有毛細胞生存促進効果が確認された<sup>16)</sup>。したがって、音響外傷および内耳虚血という異なった病態による急性感音難聴に対して、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 投与が治療の効果を有すると考えられた。さらに、中耳炎などの有害事象も認められず、安

全性が高い治療法であることも示唆された<sup>17)</sup>。これらの結果に基づき、ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 内耳投与による急性高度難聴治療の臨床試験の準備に着手した。

## 2. ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与臨床応用

上記の研究成果をふまえ、ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 内耳投与による急性高度難聴治療について、安全性と少数例での治療効果を調べる第 I～II 相臨床試験のデザインを京都大学医学部附属病院探索医療センターの協力のもとに行った。対象は、突発性難聴を含める急性高度難聴とし、厚生省班研究の突発性難聴診断基準での確実例および疑い例とした。確実なエビデンスはないが、ステロイドの全身投与は急性高度難聴に対する一般的な治療法として世界で広く認知されている。今回の臨床試験では、倫理的な配慮から、ステロイド全身投与が無効であった急性高度難聴症例を対象とした。ただし、治療の有効性という面から考えると、発症後聴力低下が固定した症例では効果が期待しにくいことから、発症後 30 日未満という条件を設けた。症例数はヒストリカルコントロールとし、過去に京都大学耳鼻咽喉科頭頸部外科で突発性難聴ステロイド無効例に施行した高気圧酸素療法の有効性の後ろ向き研究の結果に基づいて行い、目標登録症例数を 25 例とした。エンドポイントは、①ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 局所投与がステロイド無効急性高度難聴例 (発症後 30 日未満) に対してどの程度の有効性が期待できるのか、②有害事象はどの程度発生するのかを明らかにすることとした。2007 年 12 月より登録を開始、順調に症例登録は進んでおり、いくつかの症例で有効性が確認されている。

## おわりに

これまでに神経栄養因子や細胞増殖因子が内耳障害に有効であることは、多くの基礎的研究成果から明らかであった。しかしながら、有効性を発揮するためには、一定の期間標的となる細胞が神経栄養因子や細胞増殖因子に曝露されている必要があり、いかにして内耳に神経栄養因子や細胞増

殖因子を徐放するかは重要な課題であった。われわれが開発したゼラチンハイドロゲルによる内耳への神経栄養因子や細胞増殖因子の徐放システムは、この問題に対する1つの回答といえる。現在の臨床試験では1回投与での有効性を調べているが、複数回投与を行うことによりかなり長期の徐放も可能となり、更なる有効性が期待できる。また、複数の神経栄養因子や細胞増殖因子を同時に徐放することも技術的には可能であり、今後複数の神経栄養因子や細胞増殖因子の投与による相乗効果も調べていく必要がある。神経栄養因子や細胞増殖因子は、他の神経疾患にも応用することが可能であり、今後さらに多くの神経栄養因子や細胞増殖因子が臨床的に使用可能となることが期待される。特に耳鼻咽喉科や眼科領域では局所投与が有効であり、適切な徐放システムを使用すれば

高い有効性と副作用の軽減が期待できる。今後さらに基礎的研究開発を進め、使用できる薬物の選択肢を増やすとともに、積極的に臨床応用の可能性を探っていきたい。本稿で紹介した治療法は、内耳の細胞を細胞死から保護することにより、いったん障害された聴力を回復させるものであるが、今後消失した細胞を再生させる方向性での研究にも、今回開発した内耳への神経栄養因子や細胞増殖因子の徐放システムを応用していきたい。

#### 謝辞

本稿を終えるにあたり、ゼラチンハイドロゲルを用いた内耳薬物徐放システム開発に多大なご協力をいただいた京都大学再生医学研究所・田畑泰彦教授、内耳虚血モデル実験を中心となって行っていただいた愛媛大学耳鼻咽喉科・暁 清文教授、羽藤直人講師にこの場を借りて深謝いたします。

#### 用語解説

1. 有毛細胞：聴覚の感覚器である蝸牛および平衡感覚をつかさどる前庭の感覚上皮に存在する。細胞の頂部にある感覚毛の偏位により、脱分極し、細胞底部にある神経終末から神経伝達物質を放出することにより、振動刺激を神経刺激に変換する。
2. ラセン神経節：聴覚の感覚器である蝸牛はらせん状の渦巻き構造を有するが、蝸牛の中心にある蝸牛軸に局在し、有毛細胞からの神経刺激を脳幹にある蝸牛神経核に伝達する。
3. 人工内耳：人工内耳はマイクロホン、音声分析装置、刺激電極、電波の送受信機からなる。刺激電極は蝸牛内に挿入され、ラセン神経節細胞を直接電気刺激することにより、脳へ聴覚刺激を伝達する。2006年で国内での装用者は4150人を超えている。
4. 正円窓：聴覚の感覚器である蝸牛は骨で囲まれた器官であるが、正円窓でのみ膜で中耳との境界が形成されている。中耳から内耳への薬物や遺伝子の投与経路として用いられる。
5. 突発性難聴：急激に片側の聴力が低下する原因不明の難聴と定義されている難治性疾患であり、厚生省で班研究が行われている。蝸牛有毛細胞の障害が主因の1つと考えられている。中年に多く、年間35000人に発症する。

#### 参考文献

- 1) Shinohara T, Bredberg G, et al : Proc Natl Acad Sci USA 99, 1657-1660, 2002.
- 2) Nakaizumi T, Kawamoto K, et al : Audiol Neurootol 9, 135-143, 2004.
- 3) Mou K, Hunsberger CL, et al : J Comp Neurol 386, 529-539, 1997.
- 4) Yagi M, Magal E, et al : Hum Gene Ther 10, 813-823, 1999.
- 5) Young S, Wong M, et al : J Control Release 109, 256-274, 2005.
- 6) Rüttiger L, Panford-Walsh R, et al : Neurobiol Aging 28, 586-601, 2007.
- 7) Endo T, Nakagawa T, et al : Laryngoscope 115, 2016-2020, 2005.
- 8) Varela-Nieto I, Morales-Garcia JA, et al : Hear Res 196, 19-25, 2004.
- 9) Malgrange B, Rigo JM, et al : Hear Res 170, 48-58, 2002.
- 10) Iwai K, Nakagawa T, et al : Laryngoscope 116, 526-533, 2006.
- 11) Koga K, Hakuba N, et al : J Comp Neurol 456, 105-111, 2003.
- 12) Lee KY, Nakagawa T, et al : Otol Neurotol 28, 976-981, 2007.
- 13) Fujiwara T, Hato N, et al : Neuroreport 19, 1585-1588, 2008.

## 参考ホームページ

ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与臨床試験  
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ent/ClinicalTrial/GelforMedipro.html>

## 中川隆之

1989年 大阪市立大学医学部卒業  
1995年 同大学院医学研究科修了, 医学博士取得  
2001年 京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科助手  
2008年 同講師

現在, 内耳再生および保護に関する基礎的研究およびトランスレーショナル研究を行っている。内耳細胞移植, 内耳薬物投与システム開発が中心的研究テーマ。

## 8. 内耳障害に対する細胞移植治療

坂本達則

聴覚と平衡機能を司る内耳は、哺乳類ではきわめて限られた再生能力しかもたず、これが内耳障害の回復が困難である原因と考えられていたが、これを克服するために、次々に明らかになってきた内耳発生に関する情報を用いたさまざまなアプローチが試みられている。幹細胞から有毛細胞を誘導することは原理的には可能であることが示されたが、有毛細胞に対する移植治療を行うには移植細胞にも移植方法にも今後の改良が待たれる。ラセン神経節細胞の幹細胞治療については、幹細胞由来神経細胞の移植によって聴覚機能が改善することがわかり、臨床応用が期待される。

### はじめに

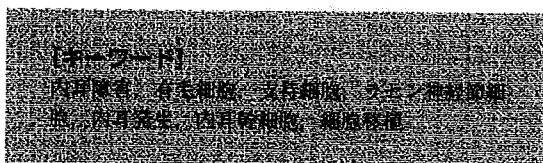
聴覚と平衡機能を司る内耳は、感覚受容器として働く有毛細胞<sup>\*1</sup>を中心に機能している。聴覚では20Hz～20kHz、平衡覚では数Hzの振動をその頂側にみられる不動毛で受容した有毛細胞は、ラセン神経や前庭神経を介して中枢に刺激を伝達する(図1)。内耳障害は、加齢・強大音への曝露(音響障害)・薬物(アミノグリコシド系抗生剤, 抗腫瘍薬, 一部の利尿薬など)・遺伝子異常などさまざまな原因で生じるが、組織学的には主として有毛細胞や神経細胞などの障害であることが知られている。有毛細胞は、いったん傷害されるとほとんど再生することがなく、それが内耳障害の回復が非常に困難である原因と考えられていた。しかし、鳥類において、内耳障害後の有毛細胞が再生

することが明らかになり<sup>1) 2)</sup>, さらに、有毛細胞が再生した後にトリが新たに鳴き声を覚える<sup>3)</sup>ことから、組織学的に再生するだけでなく、聴覚としても機能回復することも明らかになり、哺乳類においても内耳障害に対する再生治療の可能性が模索されるようになった。これまで、細胞移植や遺伝子導入、薬物導入など、さまざまな方法が試みられてきたが、本稿では背景として内耳の発生と内耳幹細胞について述べた後、有毛細胞とラセン神経節細胞<sup>\*2</sup>の細胞移植治療の現状について取り上げる。

### 1 内耳発生と内耳幹細胞

#### 1) 内耳発生

内耳は、初期体節期(マウスで発生8日頃)に後脳の外側の皮膚外胚葉に形成される耳ブラコードを起源



#### \*1 有毛細胞

内耳の蝸牛および前庭の感覚上皮に存在する感覚受容細胞。頂側に存在する不動毛が振動に応じて変位することにより、脱分極し、神経伝達物質を放出する。

Cell transplantation therapy for inner ear damage

Tatsunori Sakamoto : Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine (京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科)

166(774)

実験医学 Vol. 26 No. 5 (増刊) 2008

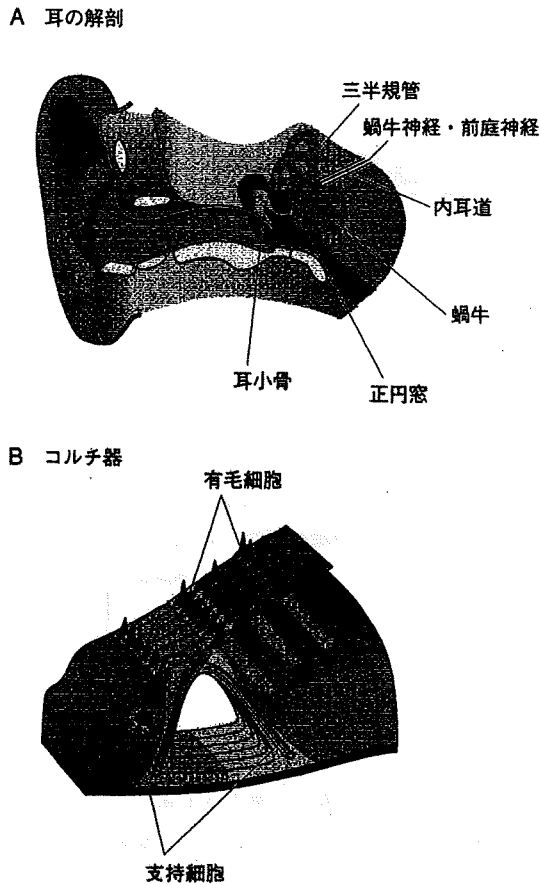


図1 内耳  
Kelley et al. : Nature Rev. Neurosci., 7 : 837-849, 2006より改変

とし、陥凹して皮膚から切り離されて耳胞となり、複雑な形態形成を経て内耳を形成する（図2）。この間に起こる細胞レベルでの運命決定について明らかになってきたのはごく最近のことである。耳胞の壁の一部はNotch情報伝達系を介して感覚上皮として決定を受ける。その中の前駆細胞からはラセン神経節・前庭神経節の神経細胞が分化し、p27<sup>Kip1</sup>やpRbのような細胞増殖制御因子の発現によって細胞増殖が停止したあと<sup>4)</sup>は、再びNotchシグナルによって有毛細胞と支持細胞<sup>\*3</sup>が交互に存在するように分化する<sup>5)</sup>（図3）。

※2 ラセン神経節細胞

双極性の神経細胞で、末梢では有毛細胞とシナプスを形成して有毛細胞からの刺激を受容し、中枢では脳幹の蝸牛神経核に伝達する。

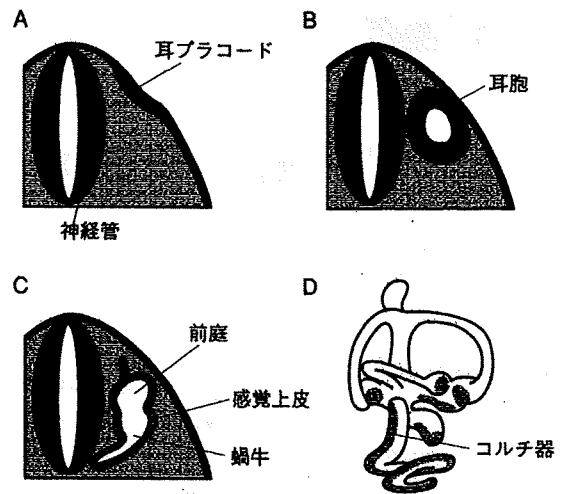


図2 内耳の発生

その後の聴毛の形成に関わる細胞骨格とモーターに関連する分子<sup>6)</sup>や、有毛細胞が整然と再配置されるときに平面内細胞極性を司る分子群が機能していること<sup>7)</sup>なども明らかになってきた。その後の成熟した内耳では細胞増殖は起こらない<sup>8)</sup>。

2) 内耳幹細胞は存在するか

成熟した内耳における細胞増殖がみられないことや、ラットの内耳有毛細胞障害後、細胞の修復機構によって少数の有毛細胞の再生がみられるが細胞増殖による細胞の補充は起こらない<sup>9)</sup>ことは、内耳に幹細胞が存在しないことを示唆すると考えられていた。しかし、最近になって、ラットの蝸牛由来の細胞を*in vitro*で培養して、細胞増殖を介して新生有毛細胞が生じたとする報告<sup>10)</sup>や、マウスの前庭感覚上皮から増殖してsphereを形成し、三胚葉に分化し得る多分化能をもつ細胞が得られたという報告<sup>11)</sup>がなされ、内耳にも幹細胞が存在すると考えられるようになってきた。しかし、内耳由来の幹細胞の分離が生後直後から週を重ねるごとに急激に困難になる<sup>12)</sup>ことから、組織幹細胞としての内耳幹細胞は生後急激に消失すると考えられる。発生段階の耳胞由来の幹細胞の分離も試みら

※3 支持細胞

有毛細胞の周囲に存在する細胞で、有毛細胞と共通の前駆細胞から発生する。

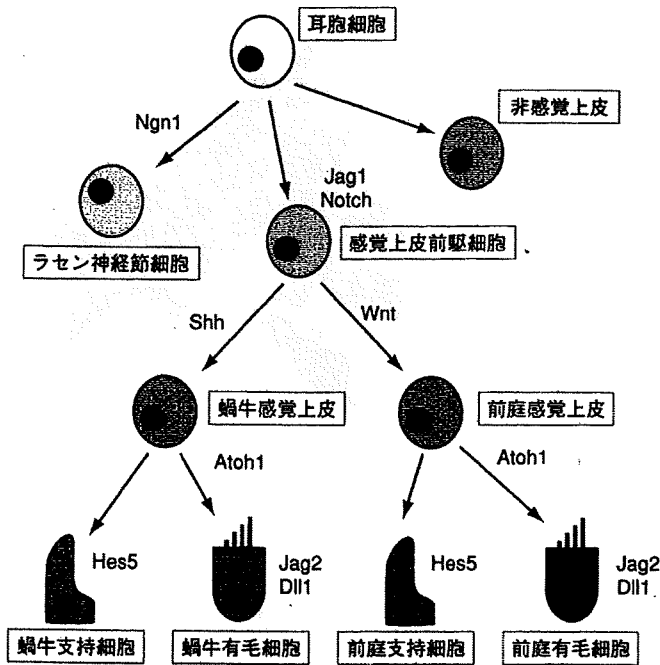


図3 内耳細胞の運命決定  
Kelley et al: Nature Rev. Neurosci.,  
7: 837-849, 2006より改変

れている。齧歯類の耳胞由来の幹細胞分離の試みのほか<sup>13) 14)</sup>、ヒト胎児蝸牛からも未分化な感覚上皮に相当する細胞が得られ、ここから有毛細胞を分化させることができる<sup>15)</sup>。これらが上述した内耳細胞の運命決定のどの段階に相当するかははっきりしていない。NestinやMusashi1を用いた組織学的な検討では耳における幹細胞の位置を指摘し得ていないが、有毛細胞と支持細胞の前駆細胞の存在や、p27<sup>Kip1</sup>・Prox1など、前駆細胞と支持細胞の共通のマーカーが多数あることなどから、内耳幹細胞は支持細胞の中にあると考えられている<sup>16)</sup>。

## 2 有毛細胞の幹細胞治療

内耳障害で最も象徴的に傷害される細胞は有毛細胞であり、これを標的とした新しい治療が模索されている。その1つが、幹細胞から有毛細胞を作製して移植するというものである。

### 1) 幹細胞から内耳有毛細胞の分化誘導は可能か？

さまざまな幹細胞を用いて、内耳有毛細胞を作製することが試みられてきた。Liら<sup>11)</sup>は、マウスES細胞から胚様体を形成し、EGF, bFGF, IGF-1存在下に付着細胞を選択して分化させることによって、Myo VIIaやParvalbuminなどの有毛細胞のマーカーを発現し、

さらに発生中のニワトリの耳胞に移植すると耳胞に取り込まれて聴毛を有するまでに分化したとしている。ほかにも、ラットの神経幹細胞を有毛細胞に分化誘導する試み<sup>17)</sup>やヒトES細胞から分化させる方法<sup>18)</sup>なども報告されている。これらの報告は、有毛細胞のような高度に分化した細胞でも原理的には幹細胞から分化誘導することが可能であることを示している。しかし、細胞移植の材料として用いるほど多量に、安定して得られるというほどの制御を得られているわけではない。また、誘導された有毛細胞が機能することを確認するためには、聴毛の動きに対する膜の脱分極や細胞内カルシウム濃度の上昇がみたいところであるが、そこまで成熟した有毛細胞が得られているわけではない。さらに、有毛細胞には、蝸牛の内毛細胞・外毛細胞、前庭のI型・II型の4種類があり、それぞれ役割が異なるものであるが、そもそもこれらの発生学上の差違についての研究はほとんど進んでおらず、上記の方法で誘導された有毛細胞がどれに相当するかもわかっていない。有毛細胞の分化発生機構について、前節に述べたような詳細が明らかになってきたのはむしろ上記の報告以降であり、今後、これらの新しい知識を用いることで、有毛細胞の*in vitro*での誘導という面での新たな展開がある可能性がある。



## 2) 有毛細胞の移植治療は可能か

内耳有毛細胞が得られたとして、それを移植することによる難聴の治療はできるものであろうか。内耳有毛細胞は、細胞自体が高度に分化した機能細胞であるだけでなく、整然と配列することも聴覚に必須であり、そのような複雑な構築をもった配列を移植によって再現することは、細胞を作製することよりもさらに困難が予想される。これまで、内耳に幹細胞を導入するさまざまな方法が報告されており<sup>19)~22)</sup>、内耳のさまざまな部分に細胞の導入が可能であることは示されているが、多数の有毛細胞が望ましい配列で感覚上皮に挿入されるというところまで制御できるわけではない。あるいは、有毛細胞として移植するよりも、支持細胞を作製・移植して有毛細胞への分化転換を図るとか、これらの前駆細胞を移植して感覚上皮を形成させるというのも、今後試すべき方法であろう。障害を与えた内耳に有毛細胞発生のキーになる遺伝子である *Atoh1* をウイルスベクターを用いて導入することで整然とした配列をもった有毛細胞が発生したという報告もあり<sup>23)</sup>、有毛細胞発生機構あるいは分化誘導から得られた情報をもとに、遺伝子導入や阻害剤の導入を行って有毛細胞の自発的再生を促すという考え方は、細胞移植と並行して、あるいは組み合わせて考えていかなければならないと考えている。

## 3) ラセン神経節細胞の幹細胞治療

聴覚の一次感覚ニューロンであるラセン神経節細胞は、内耳障害において第一義的に傷害されるほか、有毛細胞の障害に引き続いて二次的に失われることも知られている。現時点で高度感音難聴に対する唯一の治療方法である人工内耳は、蝸牛に電極を挿入し、外部のマイクで拾った音に応じて蝸牛内電極でラセン神経節細胞を直接刺激することで聴覚を得るという人工臓器である(図4)。保険適応にもなっており、すでに日常の診療で用いられているが、ラセン神経節の障害が高度になると人工内耳の効果が低下すると考えられており、ラセン神経節が再生できるならその意義は大きい。

### 1) 幹細胞移植によるラセン神経節細胞の再生

神経細胞は幹細胞から比較的容易に作製することができる細胞であるが、ラセン神経節細胞に対する移植には、ES細胞・神経幹細胞・骨髄由来間葉系細胞な

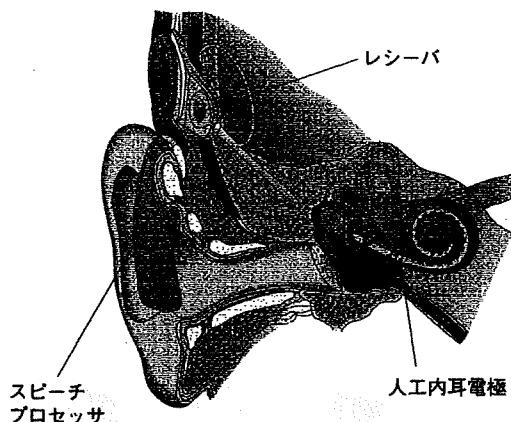


図4 人工内耳

<http://corporate.cochlear.com/Corp/Press/186.asp>  
より改変

どに由来する未分化な神経細胞や内耳由来の不活化神経細胞株<sup>24)</sup>などさまざまな細胞が用いられている。実験動物でラセン神経節に移植する方法として、3つの方法が主に用いられている。①蝸牛壁あるいは半規管から内腔(外リンパ腔)に注入する方法<sup>19)</sup>、②蝸牛壁からラセン神経節を容れているローゼンタール管<sup>\*4</sup>を直接穿刺して注入する方法<sup>25) 26)</sup>、③内耳道から聴神経に沿って逆行性に注入する方法<sup>27)</sup>である(図5)。①は手技的に容易であり、汎用されていたが、最近では②のように目的とする場所に直接注入するより確実な方法が好まれる。②は蝸牛の破壊を伴うのに対し、③は蝸牛を温存できるが、内耳道からローゼンタール管へ到達する細胞数は限られている。

### 2) 移植幹細胞は内耳で機能するか

われわれはさまざまな試みを行ってきた中で、齧歯類と霊長類(サル)において、ES細胞由来の未熟な神経細胞を内耳障害を与えたラセン神経節に移植することで、いったん高度に悪化した電気聴性脳幹反応(eABR)<sup>\*5</sup>が改善するというデータを得ている(投稿準備中)。いかにしてこのような機能回復が起こるのであろうか。ラセン神経節細胞はグルタミン酸作動性の双極性ニューロンである。われわれを含めて、グ

#### \*4 ローゼンタール管

蝸牛軸のうち最もコルチ器に近い部分で、ラセン神経節の細胞が存在する。

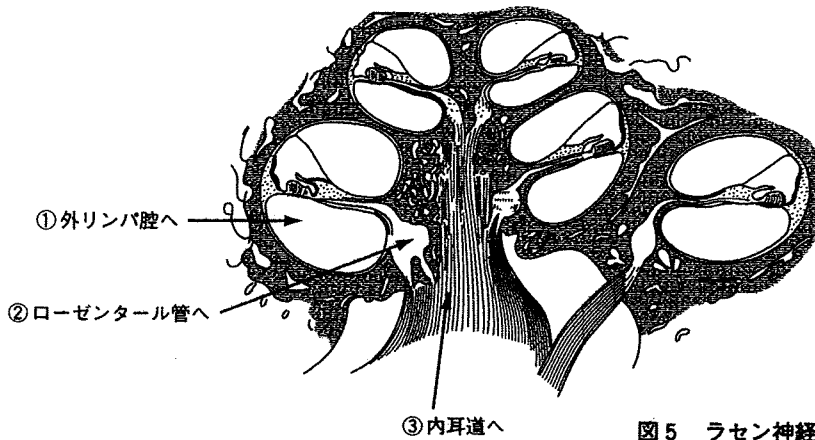


図5 ラセン神経節への移植経路

ルタミン酸作動性ニューロンを特異的に誘導した幹細胞由来神経を移植したという報告はないが、少なくともES細胞由来の神経細胞にグルタミン酸受容体が存在することは知られている<sup>28)</sup>。また、ローゼンタール管に移植された神経細胞が有毛細胞基底部へ、あるいは内耳道を中枢の方向へと線維を伸張すること<sup>25)</sup>、ES細胞由来の神経細胞が培養コルチ器の有毛細胞とシナプスを形成することが示されている<sup>29) 30)</sup>。以上から考えると、移植神経細胞が有毛細胞と脳幹の蝸牛神経核をつなぐ神経回路を再構成し、機能しているという可能性がある。

もう1つの可能性としては、移植した細胞が分泌する神経栄養因子が障害を受けたラセン神経節細胞を保護する<sup>31)</sup>ということがあり得る。NT-3やBDNFなどの神経栄養因子が障害を受けたラセン神経節細胞の生存を助けることはよく知られており<sup>32)</sup>、移植した細胞がこれらを分泌することで、残存したラセン神経節細胞を生存させるというものである。この効果のみを目的とするならば、移植する細胞は幹細胞である必要はなく、BDNFを発現する線維細胞を蝸牛に移植するという cell-gene therapy という方法がすでに報告されている<sup>33)</sup>。

※5 電気聴性脳幹反応 (eABR)

聴性脳幹反応 (ABR) は音刺激に対する聴神経・脳幹聴覚路の神経活動電位を記録したものであるが、eABRは音刺激の代わりに蝸牛に挿入した電極からの電気刺激に対する活動電位を記録したもの。有毛細胞の機能に依存せずに聴神経よりも中枢の神経活動を評価できる。

どちらにしても、幹細胞移植による機能回復がみられるという点での意義は大きい。このラセン神経節の再生を人工内耳と組み合わせることを想定すれば、すでに人工内耳挿入術は通常行われている手術であり、細胞移植はその延長で行える。その結果として相乗的な機能回復が期待できるので、ヒトにおける臨床応用に向けての現実性は高いと考えられる。

おわりに

内耳障害に対する幹細胞を中心とした細胞移植治療に関連するいくつかのトピックスについて説明した。有毛細胞に対する細胞移植は、移植細胞の準備という点でも移植による組織の再構築という点でも現時点ではまだ模索中であるが、発生学からの情報が急速に集まりつつあるので今後の展開が望まれる。ラセン神経節に対する細胞移植は臨床応用の実現により近い段階にある。現在はES細胞を用いて実験動物における機能回復を得た段階であるが、今後は脂肪幹細胞やiPS細胞などの自己由来幹細胞へと移行していくことになるであろう。

有毛細胞、ラセン神経節・前庭神経節と並んで内耳障害の原因と考えられている部位にラセン靭帯・血管条がある。薬物や遺伝子異常によるこれらの部位の障害が知られているが、幹細胞治療をここに応用しようという試みも最近報告された<sup>34)</sup>。内耳のような複雑な構築をもった組織を幹細胞を用いて治療することは決して簡単ではないが、今後も再生医療による内耳障害治療の実現に向けてさまざまなアプローチで取り組んでいく必要がある。

本稿執筆にあたり、ご指導、ご監修いただいた京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科伊藤壽一教授に深謝いたします。

## 文献

- 1) Rubel, E. W. et al. : Science, 267 : 701-707, 1995
- 2) Chardin, S. & Romand, R. : Science, 267 : 707-711, 1995
- 3) Tucci, D. L. & Rubel, E. W. : Otolaryngol. Head Neck Surg., 103 : 443-450, 1990
- 4) Rocha-Sanchez, S. M. & Beisel, K. W. : Int. J. Dev. Biol., 51 : 585-595, 2007
- 5) Kelly, M. & Chen, P. : Int. J. Dev. Biol., 51 : 535-547, 2007
- 6) El-Amraoui, A. & Petit, C. : J. Cell Sci., 118 : 4593-4603, 2005
- 7) Montcouquiol, M. E. et al. : J. Neurosci., 26 : 5265-5275, 2006
- 8) Oesterle, E. C. et al. : J. Comp. Neurol., 463 : 177-195, 2003
- 9) Zheng, J. L. et al. : J. Neurosci., 19 : 2161-2170, 1999
- 10) Malgrange, B. et al. : Mech. Dev., 112 : 79-88, 2002
- 11) Li, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 13495-13500, 2003
- 12) Oshima, K. et al. : J. Assoc. Res. Otolaryngol., 8 : 18-31, 2007
- 13) Kojima, K. et al. : Acta Otolaryngol., Supplementum : 53-55, 2004
- 14) Zhai, S. et al. : J. Neurobiol., 65 : 282-293, 2005
- 15) Chen, W. et al. : Hear. Res., 233 : 23-29, 2007
- 16) Warchol, M. E. : Hear. Res., 227 : 11-18, 2007
- 17) Kojima, K. et al. : Acta Otolaryngol., Supplementum : 26-30, 2004
- 18) Rivolta, M. N. et al. : Methods Mol. Biol., 330 : 71-92, 2006
- 19) Tateya, I. et al. : Neuroreport, 14 : 1677-1681, 2003
- 20) Naito, Y. et al. : Neuroreport, 15 : 1-4, 2004
- 21) Sharif, S. et al. : Neuroreport, 18 : 351-354, 2007
- 22) Parker, M. A. et al. : Hear. Res., 232 : 29-43, 2007
- 23) Izumikawa, M. et al. : Nature Med., 11 : 271-276, 2005
- 24) Sekiya, T. et al. : Eur. J. Neurosci., 25 : 2307-2318, 2007
- 25) Okano, T. et al. : Neuroreport, 16 : 1919-1922, 2005
- 26) Tamura, T. et al. : Acta Otolaryngol., Supplementum : 65-68, 2004
- 27) Sekiya, T. et al. : Neurosurgery, 60 : 417-433, 2007
- 28) Raye, W. S. et al. : Eur. J. Neurosci., 25 : 1961-1970, 2007
- 29) Matsumoto, M. et al. : Neuroreport, 16 : 787-790, 2005
- 30) Kim, T. S. et al. : Brain Res., 1057 : 127-133, 2005
- 31) Iguchi, F. et al. : Neuroreport, 14 : 77-80, 2003
- 32) Fritzsche, B. et al. : Cell Tissue Res., 295 : 369-382, 1999
- 33) Okano, T. et al. : Mol. Ther., 14 : 866-871, 2006
- 34) Kamiya, K. et al. : Am. J. Pathol., 171 : 214-226, 2007

## <著者プロフィール>

坂本達則：1995年京都大学医学部卒業。2004年京都大学大学院医学研究科修了後、理化学研究所発生・再生科学総合研究センターリサーチアソシエイト、'06年より京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科助教。ES細胞の分化誘導と内耳発生についての研究を行い、医学博士取得。現在、再生医学を用いた内耳障害の治療に向けての研究を行っている。

**DDS を用いた感覚器領域における  
再生医療***Regenerative medicine using DDS in sensory organs***Keywords**ドラッグデリバリーシステム  
感音難聴  
視力障害

坂本 達則 中川 隆之 伊藤 壽一

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

**Summary**

Drug delivery to the cochlea is hampered by blood-inner ear barrier together with its dense bony capsule. The round window is a possible access to deliver drugs effectively into the cochlea. Intratympanic injections and osmotic mini-pump has been utilized to get access to the round window membrane (RWM). Gelatin hydrogel immersed with brain derived-neurotrophic factor (BDNF) or IGF1 is successfully applied to the RWM to protect spiral ganglion neurons or cochlear hair cells. PLGA nano-particles are shown to penetrate round window membrane, and are expected to provide sustained-release in the cochlea. Drug delivery to the retina is also a challenge due to the existence of blood-retina barrier. Photo dynamic therapy and intraocular implants are clinically utilized methods to overcome this difficulty. Iontophoresis using drug immersed hydrogel as a contact electrode effectively brings drugs into vitreous. PLGA nano-particles with pigment epithelium-delivered factor protected the retina from ischemic injury. PLGA nano-particles may also be used as vehicles to transfect cells with plasmid DNA. Pegaptanib, an RNA aptamer which inhibit vascular endothelium-delivered growth factor, is used for ocular vascular disease. PLGA nano-particles will also be used for better sustained-release of pegaptanib.

**はじめに**

耳や眼は外界と接した臓器であり、アクセスは一見容易に思えるが、全身投与でも局所投与でも薬剤がターゲットとなる細胞に到達するまでにはさまざまな阻害要因があり、効率的な薬物投与は決して容易ではないため、これまでも Drug Delivery System (DDS) の工夫がなされてきた。本稿では、この領域で使われている DDS を紹介し、その再生医療としての応用について述べる。

**感音難聴に対する DDS**

感音難聴は非常に頻度の高い身体障害で、その原因としては、音響外傷、耳毒性薬剤、遺伝子異常、老化、メニエール病を含む内リンパ水腫関連の疾患などが挙げられるが、多くは蝸牛の障害が難聴を引き起こしている。空気

Sakamoto, Tatsunori / Nakagawa, Takayuki / Ito, Juichi

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

E-mail : sakamoto@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

の疎密波として鼓膜に到達した音は、3つの耳小骨を介して蝸牛に伝えられ、蝸牛内では感覚上皮が振動する。感覚上皮に存在する感覚細胞(有毛細胞)では、振動が神経伝達物質の放出を引き起こし、一次感覚ニューロンであるらせん神経節細胞を興奮させ、中枢へと伝達される(図1)。多くの感音難聴ではこの有毛細胞やらせん神経が傷害されているため、治療の際には蝸牛がターゲットとなる。感音難聴に対して臨床的に実際に行われている治療はステロイドやビタミン剤、循環改善薬などの全身投与(経口、または経静脈)であるが、効果のある症例は限られている。感音難聴が治りにくい第一の理由は、いったん傷害された有毛細胞やらせん神経節細胞が再生しないことがまず挙げられるが、もう一つの理由が蝸牛への薬剤到達の難しさであ

る。蝸牛を含めた内耳は非常に密な骨に囲まれており、血流も限られていること、さらに、「血液-脳関門」と同様の「血液-内耳関門」が存在することが蝸牛への薬物到達を難しくしている。ただ、蝸牛には正円窓という小さな開窓部があって、薄い正円窓膜が蝸牛を満たす外リンパ液をシールしているため、薬物投与のルートとしては可能性がある。ただし、膜を損傷して外リンパ瘻を起こすと難聴やめまいを引き起こし、またもう1枚の偽性膜が存在するために確実に正円窓膜上に投与できない例も多いといわれており、取り扱いに注意を要する。鼓膜を穿刺してあるいは鼓膜穿孔があればそこから薬液を鼓室内に充満させる方法(鼓室内投与法)は、簡便であるが、薬物は耳管を通じて鼻腔へ容易に排出されるため、蝸牛への到達の程度も決

して高くはなく、その効果を持続させることも難しい<sup>10)</sup>。マイクロカテーテルを正円窓膜近傍に留置する方法も報告されていて、より確実に正円窓に向けて薬物を持続投与できる。突発性難聴に対するステロイド投与方法として臨床的に有効であることも示されているが<sup>11)</sup>、マイクロカテーテル留置には中耳手術と同程度の侵襲が必要であり、普及するには至っていない。

## ハイドロゲル

ハイドロゲルとは、ゼラチンやコラーゲン、ヒアルロン酸、アルギン酸などの親水性高分子化合物を架橋してできるゼリー状物質の総称である。特に、カチオン化、あるいはアニオン化したゼラチンを用いたハイドロゲル(ゼラチンハイドロゲル)は、静電的に薬物と結合し、生体内で加水分解されるに従って薬物を徐放することが知られている。結合が静電的であるため薬物を修飾する必要がなく、その架橋の程度を変えることで分解速度を制御できるので、DDS基材としては使いやすい。

Endo<sup>12)</sup>らは、脳由来神経栄養因子(BDNF)を浸潤させたハイドロゲルをモルモットの正円窓膜上に留置して、蝸牛におけるその効果を検証した。外リンパ液中のBDNF濃度を調べると、1週間以上にわたってBDNFは徐放されており、また、らせん神経節細胞に対する保護効果が組織学的、機能的に確認された。また、Iwai<sup>13)</sup>らは

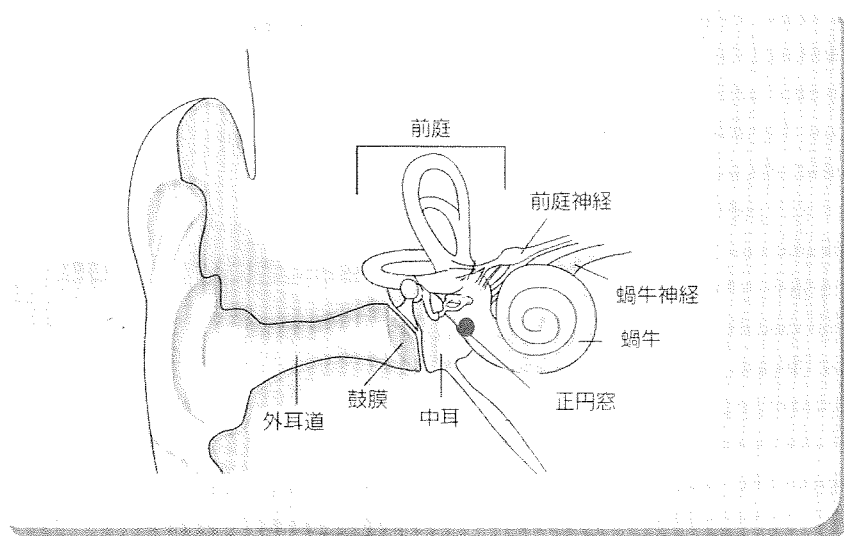


図1 外耳・中耳・内耳

IGF1を含ませたゼラチンハイドロゲルを正円窓膜上に留置して、音響外傷による感音難聴に対する予防効果を検討した。その結果、機能的には難聴の防止効果が、組織学的には蝸牛有毛細胞の細胞死を防御する効果があることを確認した。現在我々はゼラチンハイドロゲルを用いたIGF1投与による急性高度難聴治療の臨床応用を準備中である。

### 生体適合性プラスチックによるナノパーティクル

PLGA (copoly lactic acid/glycolic acid) は、手術用吸収糸や創傷被覆膜として医療で広く用いられている生体適合性高分子である。材料である乳酸とグリコール酸の比率を変えることで分解を遅延することができ、生体内で加水分解されたあとの単量体は無害である。最近の微粒化技術の進歩によって、幅広い薬剤をPLGAナノパーティクル化できるようになり、新しいDDS基材として注目されている。

Tamuraら<sup>10)</sup>は、PLGAナノパーティクルが正円窓膜を超えて蝸牛まで到達できるかどうかを調べた。ローダミン含有PLGAナノパーティクルを蝸牛の正円窓膜上に留置して24時間後の蝸牛内の分布を組織学的に調べると、ローダミン含有PLGAナノパーティクルは蝸牛の正円窓に近い基底回転から頂回転までの広い範囲にわたって存在しており、PLGAナノパーティクルは正円窓膜を通過して、蝸牛の外リンパ液中を拡散することがわかっ

た。ハイドロゲルでは薬物はいったん徐放されてから拡散してターゲットへと輸送されていくが、ナノパーティクルの場合はパーティクルのままターゲットに輸送され、その場で徐放するので、薬物の安定性やターゲティング性能などの点で有利である。突発性難聴に用いられているステロイドやメニエール病の治療に用いられるアミノ配当体、さらに前述のBDNFやIGF1などをPLGAナノパーティクル化して用いれば、全身的な副作用などを回避しながら、蝸牛のみに高濃度かつ長期間、薬物を維持することができるので、今後の有効性の検証・臨床応用が待たれる。

### 視力障害に対する DDS

重篤な視力障害の原因として頻度の高いものは、糖尿病網膜症、緑内障、

加齢黄斑変性症、網膜色素変性症などがあげられるが、その主な障害部位は網膜・視神経である(図2)。網膜において幹細胞の存在が明らかになっているが、それが傷害された網膜を再生させるといった報告はいまだなく、細胞障害を受けると修復されることは困難であるということの意味する。眼球は強膜、結膜による強固なバリアーや涙によるクリアランスのほか、「血液-網膜関門」<sup>11)</sup>が存在するため、点眼や全身投与を行っても、眼球後方への薬物投与の効率は低い。

滲出性加齢黄斑変性症は、脈絡膜に新生血管が生じ、出血、網膜剥離、浮腫などが生じ、病変が中心窩に及ぶと重大な視力低下をきたす疾患である。これに対して、光線力学的療法(photo dynamic therapy : PDT)が行われている。PDTは、新生血管集積性の光反応薬剤を全身投与した後、病

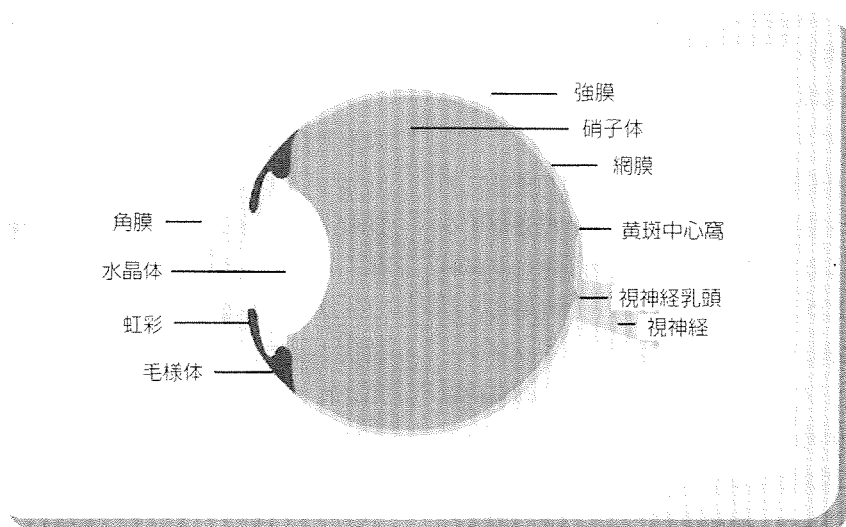


図2 眼球断面図

変部分である網膜の脈絡膜に弱いレーザーを照射することで局所の血管を閉塞させるという、ターゲティング DDSである。

また、日本国内では未承認であるが、ステロイド徐放インプラント (Retisert<sup>®</sup>:フルオシノロンをベレット状にしてポリビニルアルコールとシリコンで被覆して徐放化)<sup>11)</sup> や抗ウイルス薬徐放インプラント (Viterasert<sup>®</sup>:ガンシクロビルベレットをポリビニルアルコールとエチレン酢酸ビニル共重合体で被覆して徐放化)<sup>12)</sup> といった、眼球内に埋め込む形の徐放剤が実用化されている。

### ハイドロゲル, PLGA ナノパーティクルによる徐放

ポリヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) は、コンタクトレンズの材料として1960年代から用いられている高分子素材である。Eljarrat-Binstockら<sup>13)</sup> はゲンタマイシンで膨潤させたHEMAハイドロゲルを角膜表面に、あるいはHEMAにエチレングリコールジメタクリレート (EGDMA) を組み合わせたハイドロゲルを強膜面にあて、1分程度通電することで房水、あるいは硝子体に効率的にゲンタマイシンを輸送できることを示した。このようなイオントフォーシスと呼ばれる方法は、耳鼻咽喉科臨床的には局所麻酔薬を鼓膜に効率よく到達させるために古くから頻用されているが、眼球後方の薬物到達が困難な領域へのDDSとしても、簡便で有効

な方法である。

Liら<sup>14)</sup> は、網膜血管新生を抑制する作用をもつ色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor: PEDF) を PLGA ナノパーティクルに封入し、網膜虚血モデルマウスの眼球内に投与した。PEDF 封入 PLGA ナノパーティクルを使うことで、PEDF 単体で投与するよりも長期にわたって網膜神経節細胞と内網状層の保護できることを示した。

### 核酸導入

*In vivo* で用いられている遺伝子導入法は、ウイルスベクターによるものがほとんどである。ウイルスベクターによるものは遺伝子導入効率が高いが、ウイルス蛋白に対する免疫反応、増殖能をもったウイルス混在の可能性が排除できないこと、ベクターがゲノムに挿入される場合には他の遺伝子に影響する可能性があることなどが問題になる。非ウイルスベクター法として、プラスミド DNA とカチオン性脂質との複合体 (リポプレックス) を用いるリポフェクションと、プラスミド DNA とカチオン性ポリマーとの複合体 (ポリプレックス) を用いるポリフェクションなどが用いられている。現状ではリポフェクションのほうが頻用されているが、ポリフェクションは①均一で安定な複合体形成、②遺伝子導入率が高い、③血清の影響を受けやすいなどの利点がある<sup>15)</sup>。前述のように、PLGA ナノパーティクルが正門窓

から蝸牛に導入できることから、同じ方法で蝸牛への遺伝子導入ができると期待される。

米国では、加齢性黄斑変性症などによる毛細血管新生を抑制して視力障害の進行を抑える効果をねらって、血管内皮増殖因子 (VEGF) 抑制性の RNA アプタマー (pegaptanib, Macugen<sup>®</sup>) が使用されており<sup>16)</sup>、日本でも臨床試験が行われている。アプタマーとは標的蛋白と特異的に結合するようにデザインされた核酸分子であるが、pegaptanib の場合、核酸残基の置換、40kDa のポリエチレングリコール (PEG) との結合によって、硝子体液中での安定性と反応特異性を向上させた<sup>17)</sup>。これを PLGA マイクロスフェア化することでさらなる徐放効果をねらう試みも行われている<sup>18)</sup>。

### おわりに

感覚器領域においても、昨今の再生医学研究の成果で、これまで機能回復が難しかった病態に対して治療に用いることのできる多数の因子が同定されつつあり、それとともに、それぞれに適した DDS の開発も進みつつあり、近い将来の臨床応用が期待される。さらに我々は、骨髄由来幹細胞を末梢血管から導入するとマクロファージ様の細胞が内耳に集積することに着目して、これを利用した DDS を模索している。

謝 辞

本稿作成に当たり、神戸市立中央市民病院眼科 山城健児先生にご協力いただきましたことを深謝いたします。

●文 献

- 1) Angelborg C, Hillerdal M, Hultcrantz E, et al: The microsphere method for studies of inner ear blood flow. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **50**: 355-362, 1988
- 2) Juhn SK, Hunter BA, Odland RM: Blood-labyrinth barrier and fluid dynamics of the inner ear. *Int Tinnitus J* **7**: 72-83, 2001
- 3) Ho HG, Lin HC, Shu MT, et al: Effectiveness of intratympanic dexamethasone injection in sudden-deafness patients as salvage treatment. *Laryngoscope* **114**: 1184-1189, 2004
- 4) Salt AN, Plontke SK: Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug Discov Today* **10**: 1299-1306, 2005
- 5) Lefebvre PP, Staecker H: Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol* **122**: 698-702, 2002
- 6) Plontke S, Lowenheim H, Preyer S, et al: Outcomes research analysis of continuous intratympanic glucocorticoid delivery in patients with acute severe to profound hearing loss: basis for planning randomized controlled trials. *Acta Otolaryngol* **125**: 830-839, 2005
- 7) Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al: Novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* **115**: 2016-2120, 2005
- 8) Iwai K, Nakagawa T, Endo T, et al: Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* **116**: 529-533, 2006
- 9) Tamura T, Kita T, Nakagawa T, et al: Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* **115**: 2000-2005, 2005
- 10) Cunha-Vaz JG: The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res* **78**: 715-721, 2004
- 11) Jaffe GJ, Yang CH, Guo H, et al: Safety and pharmacokinetics of an intraocular fluocinolone acetonide sustained delivery device. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 3569-3575, 2000
- 12) Musch DC, Martin DF, Gordon JF, et al: Treatment of cytomegalovirus retinitis with a sustained-release ganciclovir implant. The Ganciclovir Implant Study Group. *N Engl J Med* **337**: 83-90, 1997
- 13) Eljarrat-Binstock E, Raiskup F, Fruchtpery J, et al: Hydrogel probe for iontophoresis drug delivery to the eye. *J Biomater Sci Polym Ed* **15**: 397-413, 2004
- 14) Eljarrat-Binstock E, Raiskup F, Stepensky D, et al: Delivery of gentamicin to the rabbit eye by drug-loaded hydrogel iontophoresis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 2543-2548, 2004
- 15) Li H, Tran VV, Hu Y, et al: A PEDF N-terminal peptide protects the retina from ischemic injury when delivered in PLGA nanospheres. *Exp Eye Res* **83**: 824-833, 2006
- 16) 有馬英俊: 遺伝子導入法としてのポリフェクシオン— $\alpha$ -シクロデキストリンを基本素材とする高機能性遺伝子導入ベクターの構築を中心として. *薬学雑誌* **124**: 451-464, 2004
- 17) Rakic JM, Blaise P, Foidart JM: Pegaptanib and age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **352**: 1720-1721, 2005
- 18) Ng EW, Shima DT, Calias P, et al: Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 123-132, 2006
- 19) Carrasquillo KG, Ricker JA, Rigas IK, et al: Controlled delivery of the anti-VEGF aptamer EYE001 with poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 290-299, 2003



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\*\*<sup>1</sup> 中川 隆之\*<sup>1</sup> 山本 典生\*<sup>2</sup>

## 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

\*<sup>1</sup> 京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 \*\*<sup>1</sup> 同 教授

\*<sup>2</sup> 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

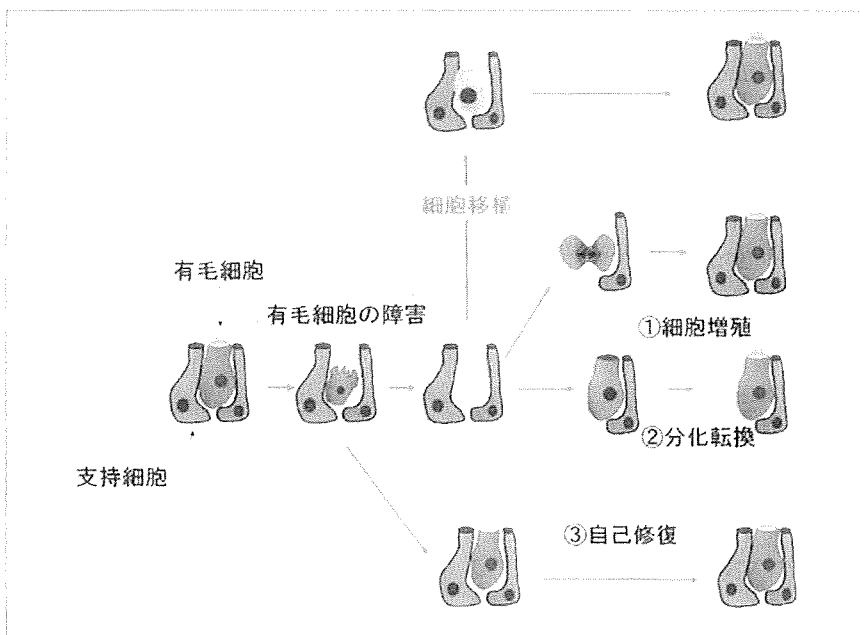
- I. 緒言
- II. 細胞移植による内耳再生
  - 1. 内耳細胞移植技術の開発
  - 2. 神経幹細胞移植
  - 3. 内耳前駆細胞の分離培養と移植
  - 4. 胚性幹細胞移植
  - 5. 骨髄由来細胞移植
  - 6. 細胞移植による内耳遺伝子導入
  - 7. 小括
- III. 内耳の自発的再生の誘導
  - 1. 内耳での細胞増殖制御機構
  - 2. 内耳有毛細胞の分化運命決定機構の解明による内耳再生
  - 3. 内耳有毛細胞の自己修復
  - 4. 小括
- IV. 内耳薬物投与システムの開発
  - 1. PLGA ナノパーティクルを使用した内耳薬物投与システ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