

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

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

もともと、1列の内有毛細胞、3列の外有毛細胞、分化した支持細胞など、蝸牛の複雑な細胞構成の構築には側方抑制が機能しているといわれていたが、Notch 情報伝達系のリガンドである Jagged2 の遺伝子欠失マウスの蝸牛においては内毛細胞が2列、外毛細胞が4-5列になっており、Notch 情報伝達系が蝸牛における細胞構成に重要な役割を果たしていることが示された⁵⁹⁾。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⁶⁰⁾、逆にラットの器官培養の系で Math1 を過剰発現させた

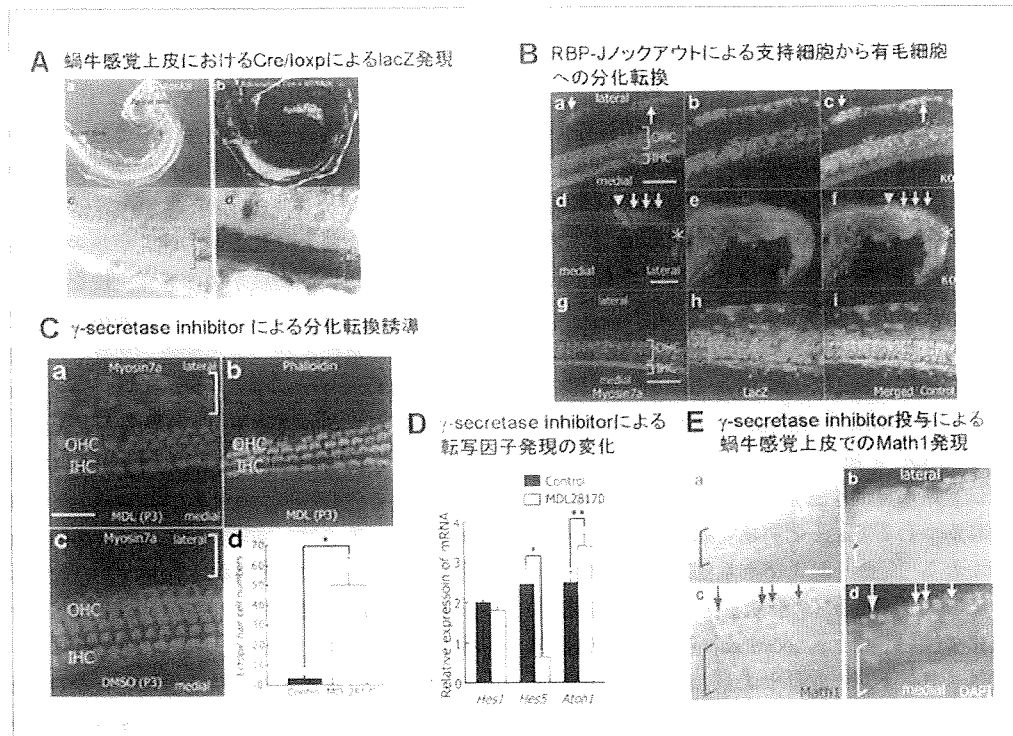
場合、有毛細胞が誘導された⁶¹⁾。

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

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

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

図12 Notch 情報伝達系の制御による有毛細胞再生



A : アデノウイルスベクターにより Cre が発現すると, lacZ (緑) 発現が蝸牛感覚上皮で認められる (a・c : コントロール, b・d : Cre 発現組織)。
 B : RBP-J ノックアウトにより, lacZ 発現 (b・e) とともに, 異所性有毛細胞 (a・d) が認められる。正常感覚上皮では, lacZ 発現 (h) は認められるが, 異所性有毛細胞は認められない (g)。
 C : γ -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 : γ -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 : γ -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。

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 γ -secretase 活性の阻害剤 [γ -secretase inhibitor] があげられる。 γ -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。

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 γ -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 γ -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 Parvalbumin 陽性でもあった。

γ -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、 γ -secretase inhibitor で処置したコルチ器から RNA を抽出し、内耳における Notch 情報伝達系の標的遺伝子で、内毛細胞領域の発生にかかわる Hes1 と外毛細胞領域の発生にかかわる Hes5、および有毛細胞の発生に必須の転写因子 Math1 の発現量を定量的 RT-PCR 法にて検討した。 γ -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、 γ -secretase inhibitor 処置が Notch 情報伝達系を抑制していることを示すとともに、生後マウスコルチ器においては外有毛細胞領域に 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、 γ -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 γ -secretase inhibitor の投与が有効であることが示された⁶²⁾。現在、生体内耳への γ -secretase inhibitor 投与により有毛細胞の誘導が可

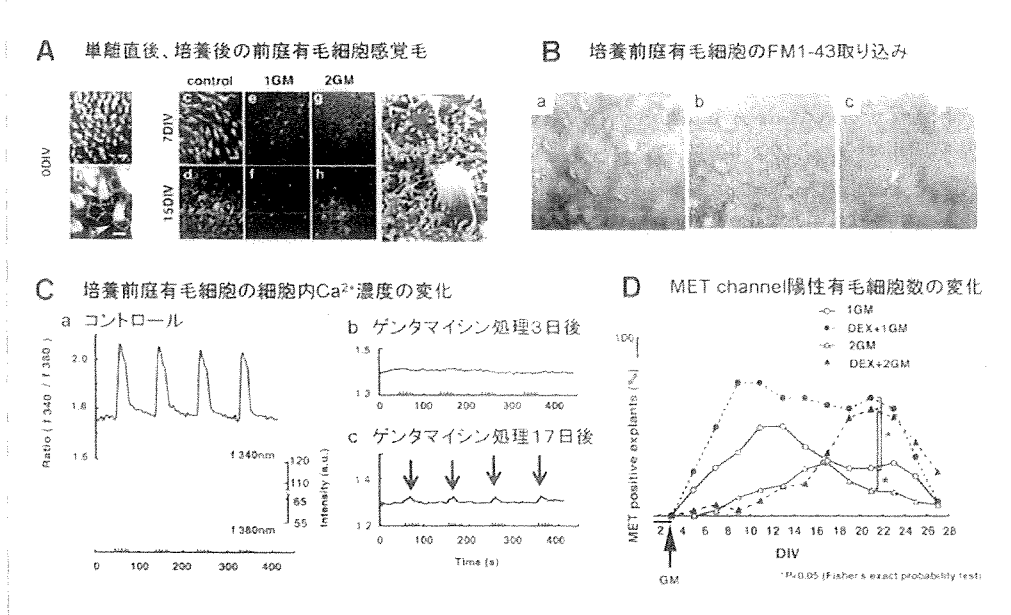
能かどうかを検討中であり、その結果によっては一気に臨床応用への可能性が開かれる。

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⁶⁰⁾⁶⁵⁾。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⁶⁶⁾。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囊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⁶⁷⁾。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、感覚毛の物理的的刺激に対応する有毛細

図13 自己修復による機能的な前庭有毛細胞の再生



A: 単離直後 (a・b)、コントロール培養 (c) 感覚上皮表面に感覚毛を認める。培養15日後には感覚毛が減少している (d)、1 mM ゲンタマイシン投与後では、7日後、感覚毛が減少しているが (e)、15日後やや増加している (f)、2 mM 投与では、投与7日後には全く感覚毛が認められないが (g)、15日後には未熟な形態を持つ感覚毛の再生が認められる (h・i)。

B: コントロール培養組織では、有毛細胞に FM1-43 取り込み (赤) が認められる (a)、ゲンタマイシン投与7日後、感覚毛の消失とともに FM1-43 取り込みも消失している (b)、再生感覚毛を有する細胞では、FM1-43 取り込み (赤) が認められる (c)。

C: コントロール培養組織では、感覚毛の物理的的刺激に伴い細胞内カルシウム濃度上昇が認められる (a)、ゲンタマイシン処理3日後の組織では反応は消失している (b)、再生感覚毛の刺激により、細胞内カルシウム濃度上昇が認められる (c)。

D: デキサメサゾン (DEX) 添加により、MET channel 陽性細胞数の減少および再生が有意に増加する

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

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

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

4. 小 括

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

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

②の残存する支持細胞の有毛細胞への分化転換については、Notch 情報伝達系の転写因子の一つである *Atoh1* 遺伝子をウイルスベクターを使用して蝸牛感覚上皮に導入することにより、哺乳類蝸牛で有毛細胞の再生と、部分的ではあるが機能回復が誘導されることが報告されている¹⁴⁾。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¹⁵⁾、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³¹⁾。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¹¹⁾¹²⁾。すなわち、有毛細胞が再生できれば、残存する一次神経節細胞からの神経突起の伸長が再生有毛細胞により誘導され、シナプス結合再生が形成される可能性が高いと考えられる。したがって、内耳感覚上皮で有毛細胞の再生が誘導でき、ラセン神経節細胞が残存していれば、一次神経節との神経接合が自動的に再生されることが期待できる。

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

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

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

IV. 内耳薬物投与システムの開発

内耳障害に関する基礎的研究成果の臨床への応用が進まない原因として、有効な薬物を安全かつ確実に内耳に到達させることが困難であることがあげられる。内耳に至る血流はきわめて少ないので、全身投与された薬物のごく一部しか内耳には到達しない。さらに、内耳には血液脳脊髄液関門と同様の血液内耳関門が存在し¹⁶⁾、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

(2007, 3)

特 報 159(517)

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⁶⁹⁾、異物を中耳に残すことになり、望ましい方法とはいえない。また、反復投与は不可能である。生体内で分解される生体吸収性材料は、生合成される材料と天然材料に分けることができる。

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

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

1. ポリ乳酸/グリコール酸 (PLGA) ナノパー

ティクルを使用した内耳薬物投与システム
ポリ乳酸およびポリグリコール酸ポリマーで薬物を包み込んだ粒子を作製し、薬物を徐放する方法の有効性がすでに報告されている⁷⁰⁾⁷¹⁾。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⁷⁰⁾。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⁷¹⁾。

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 μ 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か認められなかった。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⁷²⁾。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⁷²⁾。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。

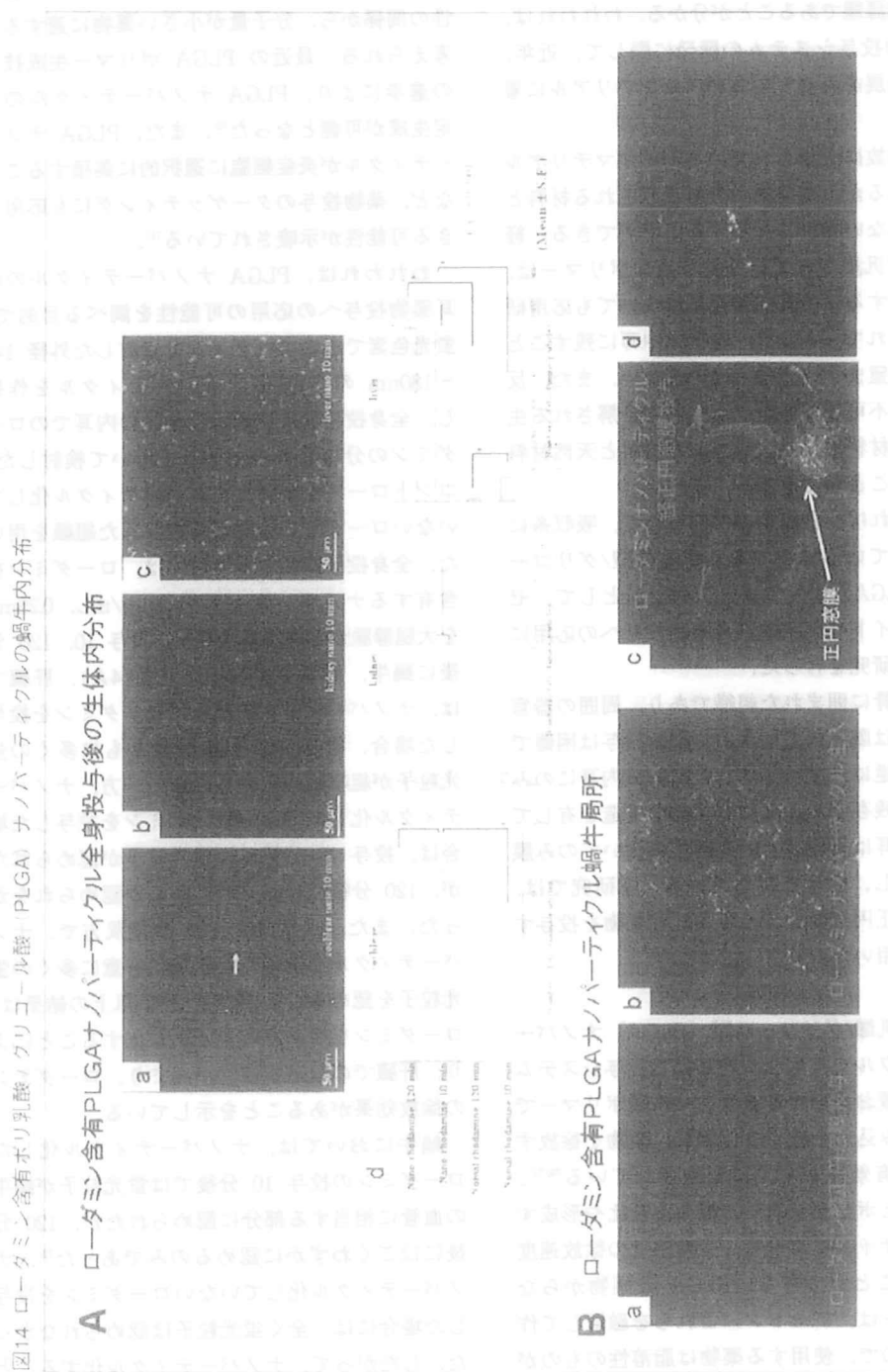


図14 ローダミン含有ポリ乳酸グリコール酸 (PLGA) ナノバナーティクルの蝸牛内分布

A ローダミン含有 PLGA ナノバナーティクル全身投与 10 分後、蝸牛では血管に相等する部位でのみローダミン蛍光 (赤) が認められた (a)。腎臓 (b)、肝臓 (c) では、多くの蛍光が認められた。肝臓でのみローダミンの弥散が示唆された (d)。ローダミン含有 PLGA ナノバナーティクルを蝸牛内に注入する通常のローダミン正円窓膜上投与 24 時間後、蝸牛内に蛍光は認められない (a)。ローダミン含有 PLGA ナノバナーティクル正円窓膜上投与後、蝸牛全体に蛍光が認められた (c・d)。

(2007, 3)

特 報 161 (519)

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 μ 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⁷³⁾⁷⁴⁾。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⁷³⁾⁷⁴⁾。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⁷⁵⁾。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⁷⁶⁾⁷⁷⁾ BDNF を投与薬物とし、ゼラチンハイドロゲルを正円窓膜上に留置した場合の蝸牛外リンパ液中への移行について、モルモットを用い、ELISA 法にて解析した。コントロールとして、生食を浸透させたハイドロゲルを留置した蝸牛、正円窓膜から同用量の BDNF を直接注入した蝸牛を用い、投与 3, 7 日後に蝸牛外リンパ液を採取し、BDNF の濃度を調べた。その結果、生食留置および直接注入例の蝸牛外リンパ液中にはごくわずかの BDNF しか認められなかったが、ハイドロゲルを正円窓上に留置した蝸牛では有意に高濃度の BDNF が検出された (図15A)。投与 3 日後で直接注入例の 30 倍、投与 7 日後では 100 倍以上の BDNF 濃度が、ハイドロゲルを用いて投与した蝸牛で認められた¹⁹⁾。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

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⁷⁹⁾。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へて、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、われわれの行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

内耳再生の ストラテジー

● 中川隆之 京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

内耳は、聴覚と平衡感を司る感覚器であり、側頭骨内に存在する骨で囲まれた器官である。哺乳類の場合、内耳の感覚細胞である有毛細胞や1次ニューロンであるラセン神経節細胞は、再生能力に乏しい。このため一度これらの細胞が障害を受けると感音障害が残る。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。

内耳の解剖とその生理機能

内耳は、その複雑な形態から解剖学用語で「迷路」とよばれる。骨で囲まれた空間を骨迷路、その内部にある膜で囲まれた空間を膜迷路という。膜迷路は、リンパ液で満たされており、膜様の構造物で内リンパ腔と外リンパ腔に隔てられている。

聴覚を司る蝸牛と平衡感を担当する前庭は、それぞれ特徴的な構造をもった感覚上皮を有し、それらには特有の感覚細胞である有毛細胞

が存在する。有毛細胞は、音響刺激などの機械的刺激を神経刺激に変換し、おのおのの1次神経節細胞に刺激を伝達する。このシグナルは第8脳神経を介して脳幹に伝えられる。脳幹で2次ニューロンに刺激が伝えられ、中枢に伝達され

図1

内耳障害のメカニズム
図は蝸牛の断面。内耳障害には主に①～③の原因が考えられる。

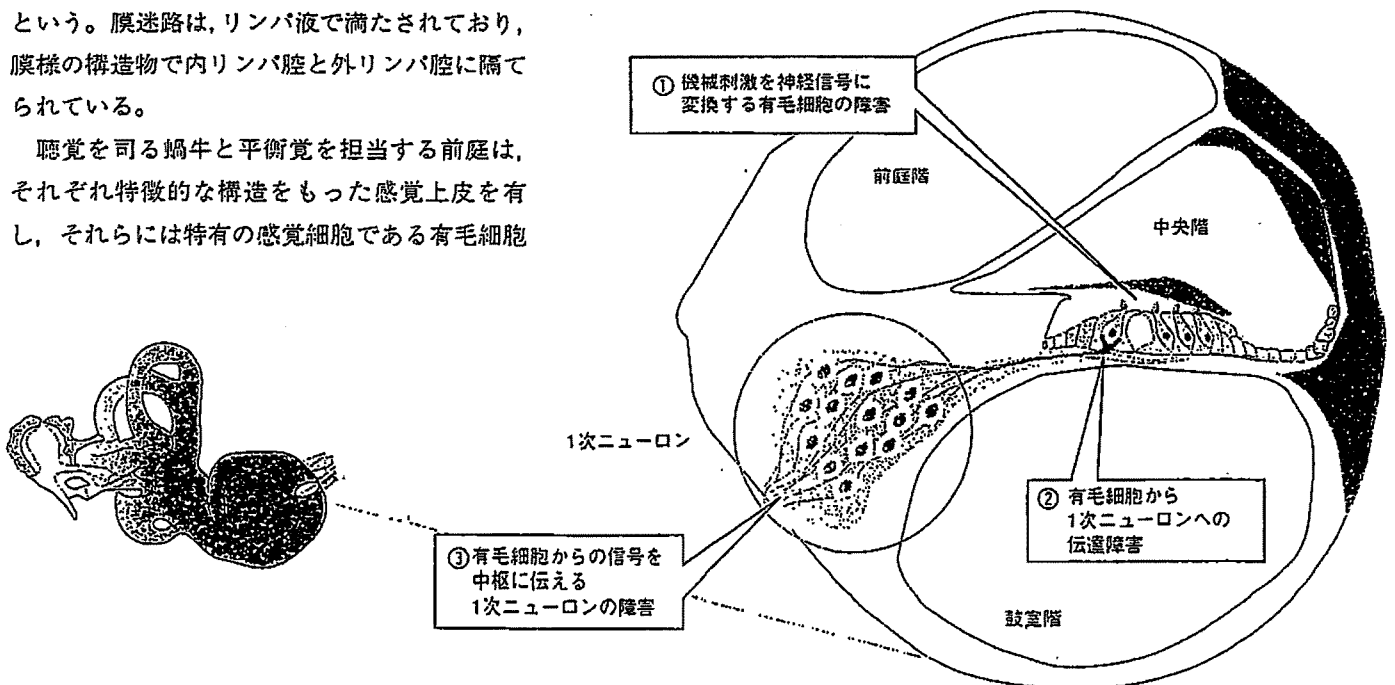
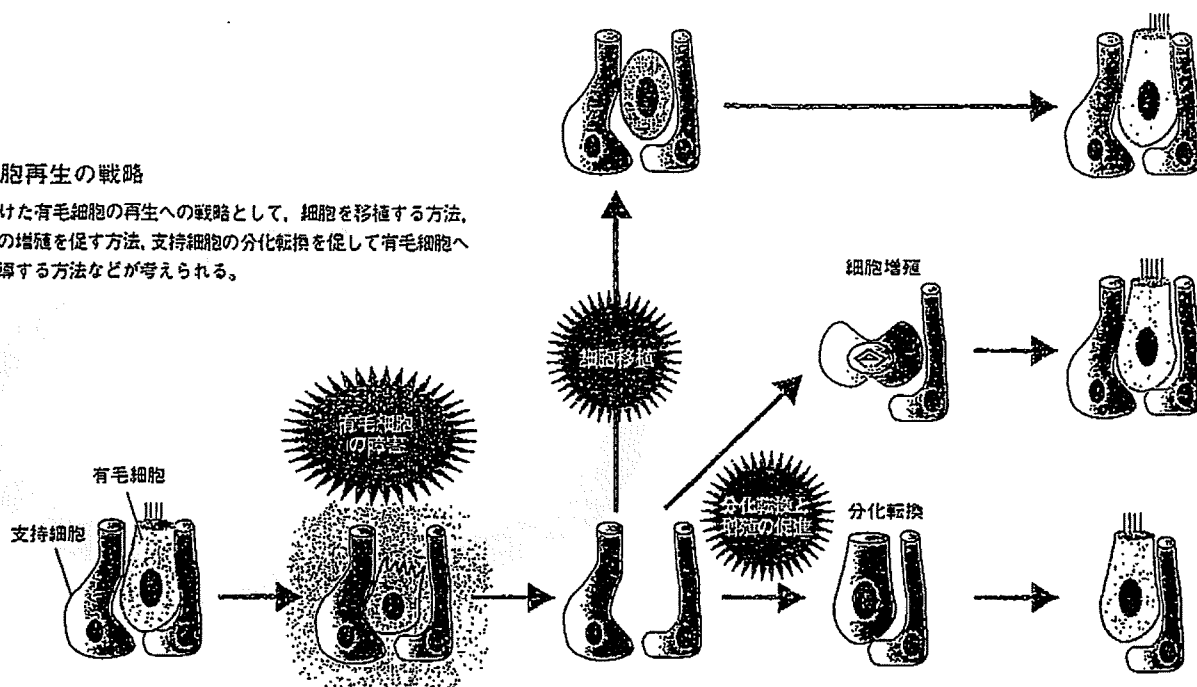


図2

有毛細胞再生の戦略

障害を受けた有毛細胞の再生への戦略として、細胞を移植する方法、支持細胞の増殖を促す方法、支持細胞の分化転換を促して有毛細胞へと分化誘導する方法などが考えられる。



る。蝸牛における1次ニューロンは、ラセン神経節細胞とよばれ、蝸牛の軸にあたる部分にらせん状に配列している。

内耳障害と再生の標的

感音難聴に代表される内耳障害は、音響刺激などの機械的刺激を神経信号に変換する有毛細胞障害、有毛細胞から1次ニューロンへの伝達障害、有毛細胞からの信号を中枢に伝える1次ニューロンの障害が主因と考えられている(図1)。鳥類では、有毛細胞が再生し、機能も回復することが知られているが⁽¹²⁾、哺乳類では、有毛細胞やラセン神経節細胞は、再生しない、あるいは、ごく限られた再生能力しかもたないとされている。

有毛細胞から1次ニューロンへの伝達障害としては、強大音響暴露後の一時的な聴覚障害のメカニズムがよく知られている⁽⁹⁾。これは可逆性であるが、ほかの障害機構は一般的に不可逆である。平衡覚を司る前庭系では、末梢性の障害は中枢で代償されて、機能障害の多くは回復するが、聴覚系では恒久的な感音難聴が残る。このような背景から、内耳における再生研究は、蝸牛有毛細胞、ラセン神経節細胞(1次ニューロン)を中心に展開してきた。

内在性細胞による再生

鳥類では、有毛細胞消失後、隣接する支持細胞が分裂、増殖し、一部が有毛細胞へと分化することによって、有毛細胞が再生されることが報告されている⁽¹²⁾。哺乳類でも鳥類と同様に支持細胞の分裂を誘導し、有毛細胞を再生しようという試みがなされている。また、残存している支持細胞を分化転換させて有毛細胞を再生させる方法も研究されている。この方法は、発生段階における有毛細胞への分化運命決定機構の知見を応用している。以上は、内耳に内在する細胞を用いて、有毛細胞を再生しようとするものであるが、外部から再生能力がある細胞を内耳に移植し、再生を誘導するという方法も研究されている(図2)。

①p27とskp2による細胞増殖と分化制御機構

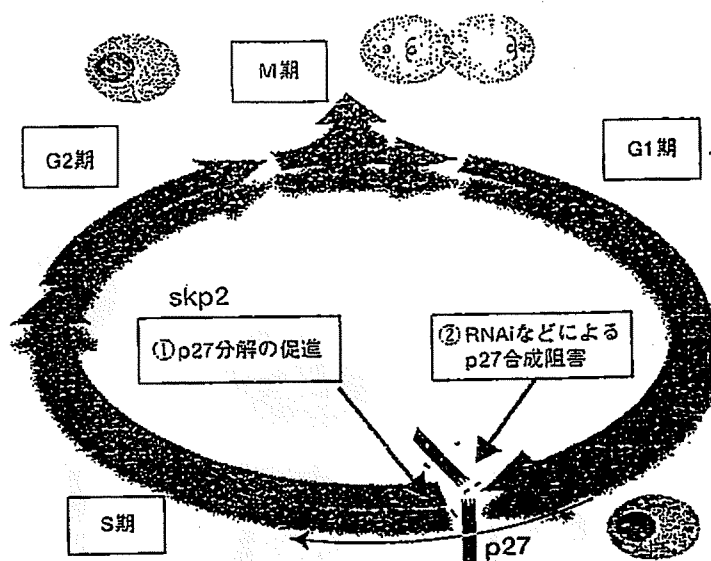
哺乳類における支持細胞増殖誘導の手段としては、増殖活性を高める方法と増殖を停止させている機構を解除する方法が考えられる。内耳の発生段階における細胞増殖制御機構の分子生物学的な知見から、後者の方向性、すなわち増殖を停止させるシグナルを解除する方法が有効と考えられている。

支持細胞の増殖停止機構として、細胞周期を抑制するサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質であるp27の役割がもっとも注目されている。蝸牛感覚上皮でp27は、発生後期から支持細胞に選択的に発現している⁽⁴⁾。またp27ノックアウトマウスでは、生後も支持細胞の増殖が継続することが示されている⁽⁵⁾。したがって、生後の蝸牛感覚上皮においても支持細胞のp27の発現を抑制することができれば、支持細胞が再び分裂、増殖する可能性がある。

p27の発現制御メカニズムとしては、p27遺伝子からの転写、翻訳レベルとp27タンパク質の細胞内での分解レベルの二つがある(図3)。後者のメカニズムにかかわるのが、Fボックスタンパク質の一つであるskp2である。skp2はp27のユビキチン化に関与し、skp2などの働きでユビキチンを付加されたp27はプロテアソームにて分解される。

発達段階に応じてマウス内耳感覚上皮でのskp2の発現変化を組織学的に解析すると、マウス内耳感覚上皮予定領域での細胞増殖が盛んな胎生期12日目までは、内耳感覚上皮予定領域で強い発現がみとめられ、p27が内耳感覚上皮予定領域に発現すると同時にskp2の発現は消失する⁽⁶⁾。つまり、内耳感覚上皮でのp27の発現制御にskp2が関与していると考えられる。一方、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タイミングにおいては、p27の発現は支持細胞だけに限定され、有毛細胞では消失する。この有毛細胞でのp27の発現の消失にskp2は関与していない⁽⁶⁾。すなわち、有毛細胞では、遺伝子からの転写レベルよりも上流でp27の発現が制御されている。

最近、転写レベルでのp27発現制御が、とくに有毛細胞への分化調節で重要な役割を果たすことが報告されている⁽⁷⁾。成熟した内耳感覚上皮支持細胞でのp27発現抑制には、skp2過剰発現によるタンパク質分解の促進もしくはRNA干渉による翻訳の抑制が有効な手段と推察される。しかし、細胞周期にリエントリーすること



は、細胞死の誘導につながる可能性もあり、今後の検討が注目される。また、内耳感覚上皮の細胞増殖制御については、Rb/E2F系^{*1}も重要な役割を果たすことが報告されており⁽⁸⁻¹⁰⁾、成熟した蝸牛感覚上皮での再生実験への応用が期待される。

② Notch 情報伝達系による細胞分化運命決定機構

残存する支持細胞を分化転換し有毛細胞を再生させる方法は、発生段階における有毛細胞と支持細胞への分化運命決定機構についての分子生物学的な知見を応用している。なかでも、内耳有毛細胞の分化におけるNotch情報伝達系の応用が試みられている。Notch情報伝達系は、内耳感覚上皮における有毛細胞と支持細胞の分化運命決定機構に関与している^(11,12)。

内耳感覚上皮においてNotch情報伝達系が活性化すると、抑制性bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子HESが発現する。HESは有毛細胞への分化に関与するbHLH型転写因子Atoh1の発現を抑制し、これによって有毛細胞への分化が阻害されて、支持細胞へと分化する(図4)。

ウイルスベクターを用いてAtoh1を成熟後の蝸牛感覚上皮で過剰発現させた場合(図4)、支持細胞から有毛細胞への分化転換がおこること

図3 蝸牛支持細胞増殖誘導方法

支持細胞の細胞周期を停止させているp27の発現を抑制する方法として、①p27タンパク質を分解するskp2の発現を亢進させる、②RNAiなどを用いてp27を翻訳レベルで阻害する、という二つの方法が考えられる。

*1 Rb, E2Fは両方とも細胞周期の制御にかかわる分子。Rbは非リン酸化時に標的分子と結合して、その働きを阻害する。またS期、M期の前にリン酸化されて、標的分子と解離する。E2FはRbの標的となる転写因子の一つで、G1期、G2期はRbと結合し、S期、M期では応答配列と結合し、遺伝子の発現を制御する。

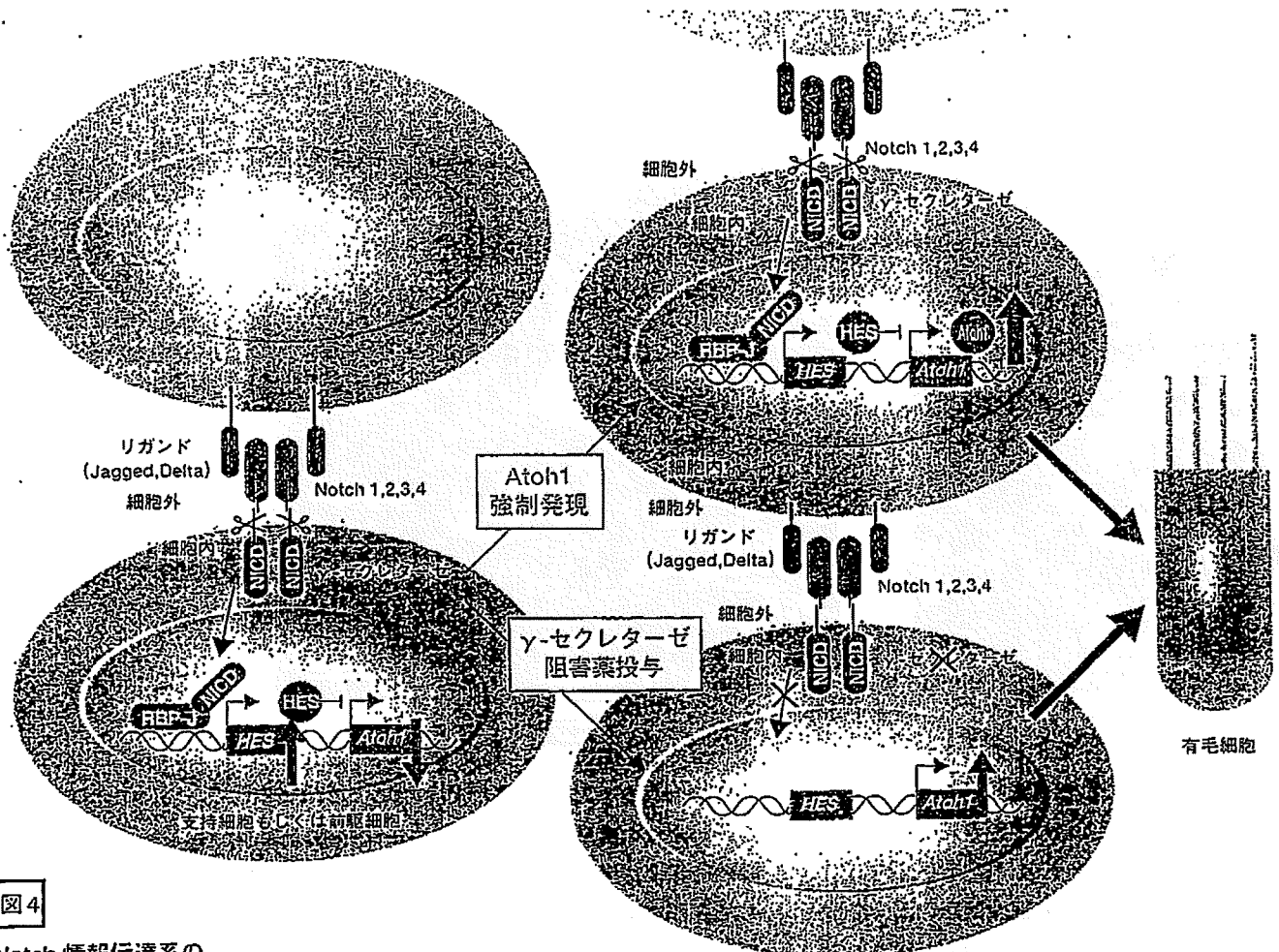


図4

Notch 情報伝達系のコントロールによる有毛細胞再生

Notch 情報伝達系に関連する転写因子である Atoh1 の強制発現、あるいは γ -セクレターゼ阻害薬による Notch 情報伝達系抑制、これら二つの方法で支持細胞から有毛細胞への分化転換を誘導できる。

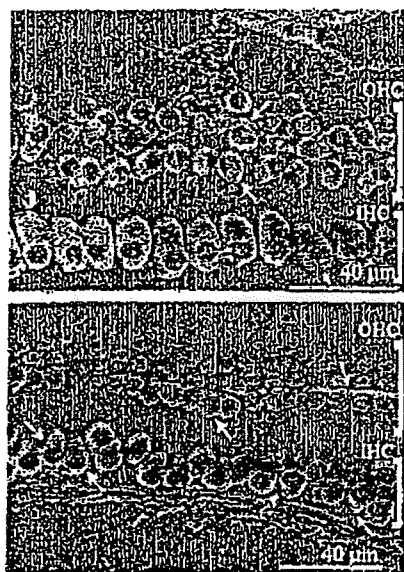
が報告され⁽¹³⁾、さらに機能回復が期待できることが示唆され⁽¹⁴⁾、有毛細胞再生への有望なストラテジーとして脚光をあびている。 γ -セクレターゼ阻害薬による Notch 情報伝達系の抑制でも(図4)、相対的な Atoh1 発現の上昇がみとめられ、同様の結果が得られることが器官培養系の実験で示されている⁽¹⁵⁾。薬物による伝達系の抑制は、遺伝子導入に比べてより臨床に近い手法であり、今後の研究発展による臨床応用が期待できる。最近の報告では、*in vivo* でも効果は限られるものの、薬物による Notch 情報伝達系の抑制によって有毛細胞の新生が誘導されることが観察されている⁽¹⁶⁾。

細胞移植による再生

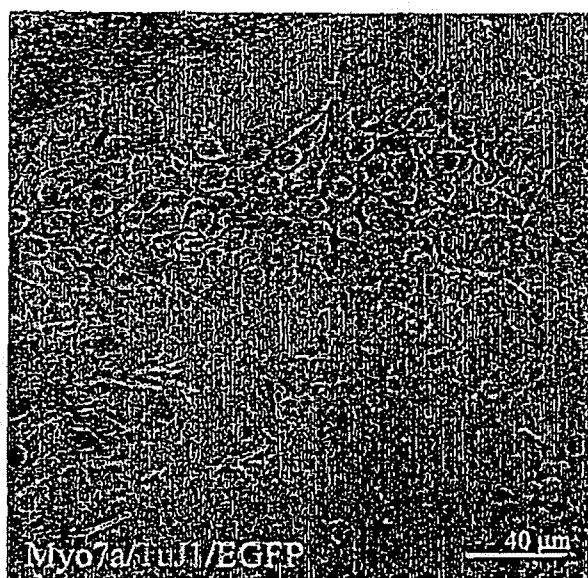
種々の幹細胞の発見とその能力が明らかにされるにしたがい、細胞移植が内耳再生でも応用され始めた。最初の内耳への細胞移植実験は、内耳と同じ外胚葉系の幹細胞である神経幹細胞

を用いたものである⁽¹⁷⁾。有毛細胞障害を惹起した内耳に神経幹細胞を移植すると、内耳組織内に移植細胞の侵入を示唆する所見がみとめられた。また、ごく限られてはいるが、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であるミオシン7aを発現している所見がみとめられた⁽¹⁸⁾。この結果は、神経幹細胞は障害を受けた内耳感覚上皮には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示すものとして内外の注目を集めた。

しかしながら、機能面を論ずるレベルまで、ミオシン7a陽性の移植細胞数を増やすことは困難であった。ほかの細胞、内耳組織由来の細胞⁽¹⁹⁾や胚性幹細胞由来の細胞移植⁽²⁰⁾でも、感覚上皮内に移植細胞が侵入し、有毛細胞様の細胞に分化することが報告されているが、機能再生をみとめた報告はない。いかに、有毛細胞や支持細胞といった感覚上皮特有の細胞に効率



蝸牛



前庭

図5

ES細胞由来神経細胞を用いた1次ニューロンへの分化誘導

ES細胞由来神経細胞(EGFPにより緑色に標識)は蝸牛および前庭感覚上皮と共培養すると、有毛細胞(Myo7a:ミオシン7aにより青色で標識)に向かって神経突起(TuJ1により赤色で標識)を伸長する。OHC:蝸牛外有毛細胞、IHC:蝸牛内有毛細胞を示す。

よく分化する細胞を開発するか、また、移植した細胞をいかにして感覚上皮内へと誘導するかが、解決すべき問題点として残されている。

内耳障害に対する再生医学研究で、内耳有毛細胞が主役であることに異論はないが、聴覚刺激を中枢に送るラセン神経節細胞も重要なターゲットの一つである。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、人工内耳を埋め込んでもラセン神経節細胞に障害がある場合、良好な聞き取りは得られない。細胞移植によって、ラセン神経節細胞が再生すれば、人工内耳での聞き取りも向上すると期待される。このような臨床的背景に加え、神経細胞は種々の細胞から比較的分化誘導しやすいことから、細胞移植によるラセン神経節細胞再生実験は数多くおこなわれている。神経幹細胞の移植では、移植細胞の蝸牛軸や内耳道での生着および神経細胞への分化が報告されている^(21,22)。しかし分化効率は低く、さらに機能的な解析はなされていない。背側神経節細胞由来の細胞株の移植実験もおこなわれていたが、組織学的な解析にとどまっている⁽²⁴⁾。

高率に神経細胞に分化する移植細胞が望ましいとの発想から、胚性幹細胞(ES細胞)が注目された。ES細胞では、高率に神経細胞へと分

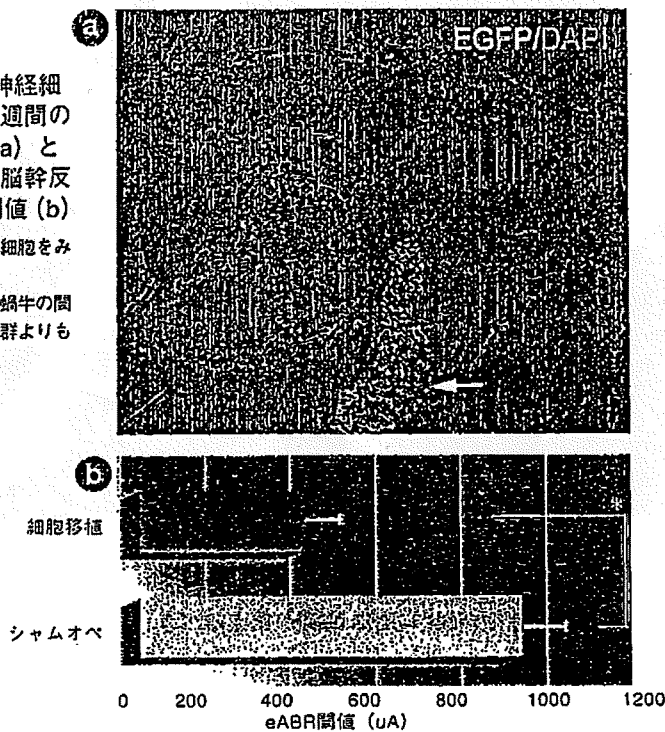
化誘導する方法が確立されており、*in vitro*、*in vivo*での移植実験がいくつかおこなわれている。いずれの実験系でも移植細胞由来の神経細胞の局在が、元来ラセン神経節細胞あるいは蝸牛神経が存在する部位で確認されている^(25,26)。機能的な側面としては、*in vitro*での解析であるが、内耳有毛細胞との間にシナプスを形成する能力があることを示す所見も得られている^(27,28)(図5)。もっとも注目すべき点としては、*in vivo*の移植実験で機能回復を示唆する所見がみとめられているという点である。

SDIA法^{*2(29)}を用いて神経細胞へ分化誘導したマウスES細胞を、ラセン神経節変性をあらかじめ誘導したモルモットに移植し、4週間後に、電気刺激聴性脳幹反応にて機能評価したところ、コントロールとしたシャムオペ(偽手術)群よりも有意に機能が回復していることがみとめられた(図6)。組織学的にも、移植細胞由来神経細胞の蝸牛軸での局在が確認されている⁽³⁰⁾。その後の追加実験で、ES細胞由来の神経細胞を移植した動物では、経時的に電気刺激聴性脳幹反応の閾値が改善するのに対して、シャムオペをおこなった動物では明らかな改善傾向がみとめられないことを確認しており、ES細胞由来神経細胞移植は蝸牛機能再生に寄与すると考

*2 stromal cell-derived inducing activity
マウス骨髄細胞由来のストロマ細胞であるPA6細胞とES細胞を共存培養し、高い確率で神経細胞分化を誘導する方法。

図6

ES細胞由来神経細胞の移植後4週間の蝸牛組織像(a)と電気刺激聴性脳幹反応(eABR)閾値(b)
 (a) 蝸牛軸に移植細胞をみとめる(矢印)。
 (b) 移植を受けた蝸牛の閾値は、シャムオベ群よりも有意に低い(*)。



えられる。今後、移植細胞由来神経細胞が直接的に機能回復に寄与しているのか、栄養因子の供給などの間接的な効果なのか検証が求められる。

今後の展開

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もっとも自然な方向であると思われる。今後、内耳の発生・再生に関連する遺伝子についての解明がさらに進み、臨床応用可能な遺伝子導入法が開発されれば、内在する細胞による再生研究は、大きく進展すると思われる。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。たとえば、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。再生能力をもつ細胞が残存していない場合には、細胞移植が必要となる。

細胞移植による内耳再生に関しては、ラセン神経節細胞の再生が臨床応用にもっとも近い段階にあると考えられ、今後の展開として二つの方向性が考えられる。一つは、ES細胞をソ

ースとした移植研究がサルES細胞での研究を経て、ヒトES細胞に進むという方向性である。ES細胞はほかの幹細胞に比べて、均一な性質をもつ細胞を大量に準備することが可能で、ラセン神経節細胞再生に関しても現在のところもっとも能力の高い細胞といえる。

しかし、日本では、ヒトES細胞を使用した研究承認へのハードルはきわめて高く、将来の臨床応用に関しては、まったく予想ができないのが現状である。したがって、もう一つの展開として、ES細胞をソースとした研究で得られた成果をほかの自己由来細胞で実現しようとする方向性が考えられる。骨髄や脂肪組織由来の間葉系細胞がこのような研究開発の主役になると推測される。一方で、線維芽細胞からES細胞と同様の性質をもった細胞を作製することも報告されている^[30]。自己由来細胞からES細胞様の細胞を作ることが可能となれば、大きく展開は変わる可能性がある。

Profile

なかがわ・たかゆき

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、内耳有毛細胞再生研究にて、医学博士取得。2001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手。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おこなっている。内耳細胞移植、内耳薬物投与システム開発が中心の研究テーマ。

参考文献

- [1] Corwin JT & Cotanche DA : Science 240 (1988) 1772-1774
- [2] Ryals BM & Rubel EW : Science 240 (1988) 1774-1776
- [3] Puel JL et al : J Comp Neurol 341(1994) 241-256
- [4] Chen P & Segil N : Development 126 (1999) 1581-1590
- [5] Lowenheim H et al : Proc Natl Acad Sci USA 96 (1999) 4084-4088
- [6] Dong Y et al : Neuroreport 14 (2003) 759-761
- [7] Lee YS et al : Development 133 (2006) 2817-2826
- [8] Sage C et al : Science 307 (2005) 1114-1118
- [9] Mantela J et al : Development 132 (2005) 2377-2388
- [10] Sage C et al : Proc Natl Acad Sci USA 103 (2006) 7345-7350
- [11] Lanford PJ et al : Nat Genet 21(1999) 289-292
- [12] Birmingham NA et al : Science 284 (1999) 1837-1841
- [13] Kawamoto K et al : J Neurosci 23 (2003) 4395-4400
- [14] Izumikawa M et al : Nat Med 11(2005) 271-276
- [15] Yamamoto N et al : J Mol Med 84 (2006) 37-45
- [16] Hori R et al : Abstracts of the 30th Annual Mid Winter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology (2007)
- [17] Ito J et al : Acta Otolaryngol 121 (2001) 140-142
- [18] Taleya I et al : Neuroreport 14 (2003) 1677-1681
- [19] Kim TS et al : Acta Otolaryngol Suppl 531 (2004) 34-38
- [20] Li H et al : Proc Natl Acad Sci USA 100 (2003) 13495-13500
- [21] Iguchi F et al : Neuroreport 14 (2003) 77-80
- [22] Tamura T et al : Acta Otolaryngol Suppl 551 (2004) 65-69
- [23] Hu Z et al : Exp Cell Res 302 (2005) 40-47
- [24] Hu Z et al : Brain Res 1026 (2004) 68-73
- [25] Corrales CE et al : J Neurobiol 66 (2006) 1489-1500
- [26] Sekiya T et al : Exp Neurol 198 (2005) 12-24
- [27] Matsumoto M et al : Neuroreport 16 (2005) 787-790
- [28] Kim TS et al : Brain Res 1057 (2005) 127-133
- [29] Kawasaki H et al : Neuron 28 (2000) 31-40
- [30] Okano T et al : Neuroreport 16 (2005) 1919-1922
- [31] Takahashi K & Yamanaka S : Cell 126 (2006) 663-676



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部から導入する（細胞移植）、といった内容を中心に述べる（概念図）。

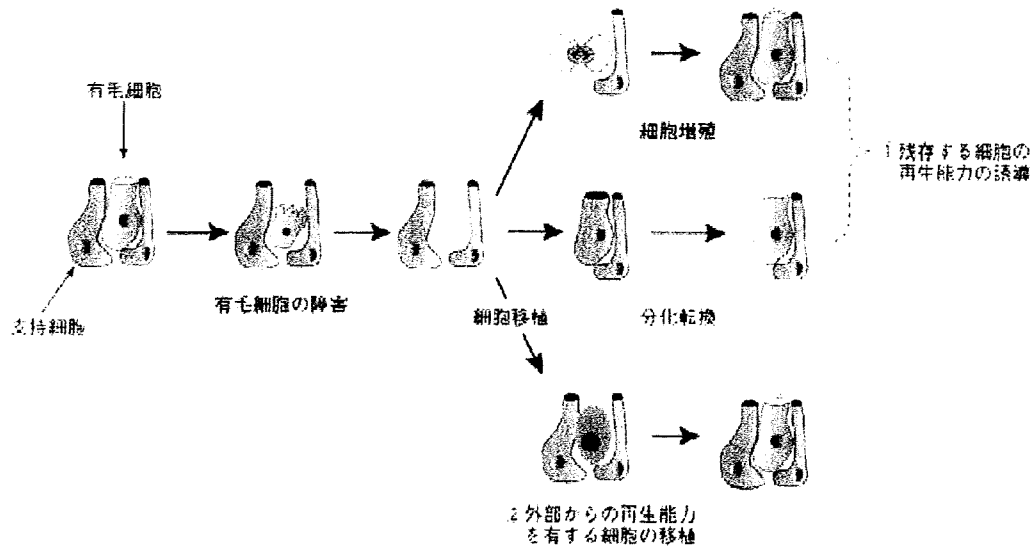
遺伝子・分子レベルでの知見

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)

●概念図● 内耳再生へのストラテジー



感覚上皮における有毛細胞再生へのストラテジーを、内在する再生能力を誘導する方法として、①残存する支持細胞の増殖を誘導し、増殖した支持細胞を有毛細胞に分化させる。あるいは残存する支持細胞を直接有毛細胞へ分化転換する方法が挙げられる。有毛細胞の再生には、②外部から再生能力を有する細胞を内耳に移植する方法「細胞移植」も考えられる。

は遺伝子異常が関与していることが明らかにされつつある。難聴系系調査やゲノムプロジェクト、突然変異マウスなどの研究により、多くの難聴にかかわる遺伝子がこれまでに判明している。代表的なものを表に示す。また、インターネット上に難聴遺伝子データベースが公開されており、新しいデータが逐次報告されている (<http://webhost.ua.ac.be/hhh/>)。これらには転写因子や分子キナーゼ、ギャップジャンクションタンパク質、イオンチャネルタンパク質、細胞外マトリクス分子など多種の遺伝子が含まれており、このような多数の難聴遺伝子の存在は、それだけ内耳の発生、機能が複雑に制御されていることを示している。こうした原因遺伝子を同定し、そのタンパク質の機能を解析することは、該当する遺伝性難聴の治療法の開発や遺伝子スクリーニングなど臨床面においても重要であるが、内耳発生、特に聴覚に関連する細胞の発生、分化機構を解明する点でも重要な意味をもつ。

近年の内耳発生に関する研究成果のなかで、ノッチ情報伝達系に関する知見は、内耳有毛細胞再生へ新しい手がかりを提供した画期的なものといえる¹⁾。内耳感覚上皮の発達過程において、1列の内有毛細胞、3列の外有毛細胞、分化した支持細胞など、蝸牛の複雑な細胞構成の構築にはノッチ情報伝達系による側方抑制が機能していることが、ノッチ情報伝達系のリガンドや関連する転写因子のノックアウトマウスの解析により示されている。ノッチ受容体は隣接細胞が発現するリガンドが結合するとセクレターゼ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。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では、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、有毛細胞が認められ、ノッチ情報伝達系が遮断されることにより、支

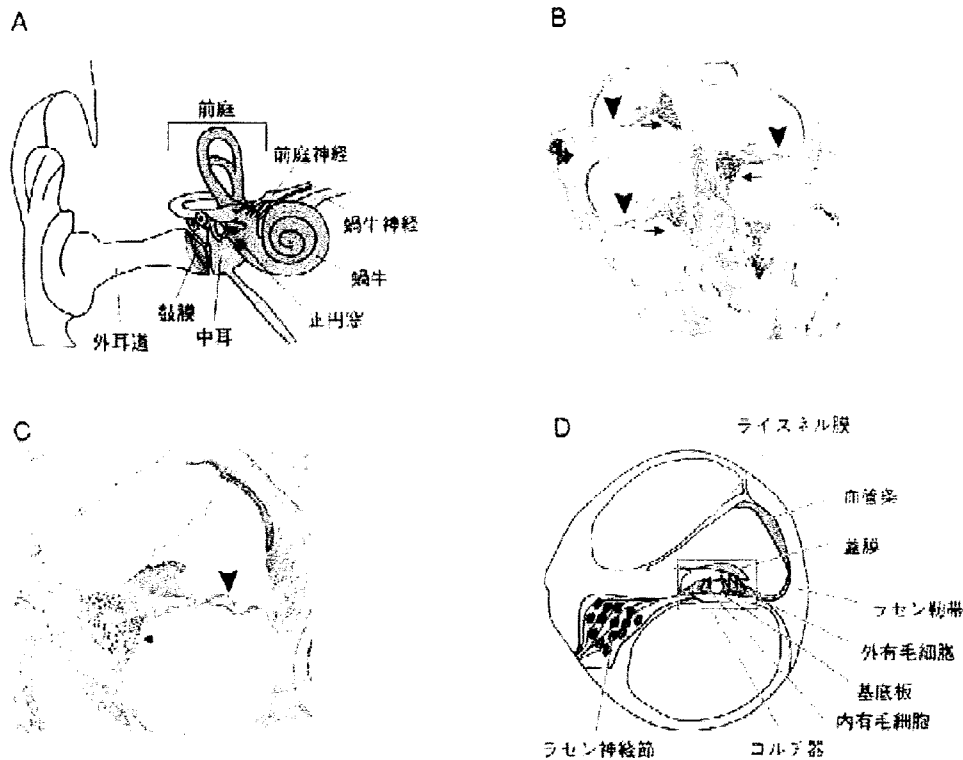


図 2 内耳、蝸牛の解剖

A) 音波は外耳道を通り、鼓膜を振動させ、中耳に存在する耳小骨を振動させる。耳小骨の振動は内耳にある蝸牛に伝達される。
 B) C) マウス蝸牛断面図。蝸牛軸にそってラセン神経節（矢印）が存在する。矢頭は感覚上皮（有毛細胞）の位置を示す。
 D) 蝸牛断面模式図

支持細胞が有毛細胞に分化することが示されている。

内耳発生段階における細胞周期制御機構に関連する一連の報告も、内耳再生に多くの示唆を与えるものといえる。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。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。サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質の一つである p27^{kip1} がこの時期の感覚上皮予定領域の細胞増殖が停止に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、p27^{kip1} 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¹⁾。内耳感覚上皮の細胞増殖制御については、RBP、E2F 系などいくつかの因子が関与している

ことが示されているが、p27^{kip1} は支持細胞に比較的特異的に発現することから、支持細胞の増殖誘導について鍵を握る因子と考えられている。

内耳再生への試み①： 内在する細胞による再生

鳥類では、哺乳類と異なり、内耳有毛細胞が再生することが知られているが、そのメカニズムとして 1) 支持細胞の増殖、分化による再生と 2) 残存する支持細胞が有毛細胞に分化転換する、2つの経路があることが知られている²⁾。哺乳類でも、標的となる分子を操作することにより、同様のストラテジーで再生を誘導できる可能性がある。

前述したノッチ情報伝達系の転写因子を過剰発現することにより、生後の成熟した哺乳類蝸牛感覚上皮で



表 難聴遺伝子

分子名	ヒト遺伝子名	遺伝性難聴の種類	変異マウス	タンパク質の機能
Pou4f3 (Brn3c)	POU4F3	DFNA15		転写因子
Pax3	PAX3	Waardenburg症候群 type I, III	Spotch	転写因子
Myosin VIIa	MYO VIIa	Usher症候群1B DFNB2 DFNA11	Shaker-1	分子モーター
Myosin XV	MYO XV	DFNB3	Shaker-2	分子モーター
Connexin26	GJB2 (CX26)	DFNA3		ギャップジャンクションタンパク質
Claudin14	CLDN14 (Claudin14)	DFNB29		タイトジャンクションタンパク質
KCNQ4 (potassium channel)	KCNQ4	DFNA2		チャネルタンパク質
Cadherin23	CDH23	Usher症候群1D	Waltzer	細胞膜接着因子
Protocadherin15	PCDH15	Usher症候群1F	Ames waltzer	細胞膜接着因子
Usherin	Usherin	Usher症候群2A		細胞膜接着因子
Alpha-tectorin		DFNA8 DFNA12 DFNB21		蓋膜構成タンパク質
Collagen	COL4A5	Alport症候群		細胞外マトリクス分子

代表的な難聴遺伝子と遺伝性難聴の種類、変異マウス、遺伝子がコードするタンパク質の機能を示す

も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が示された。ミシガン大学のRaphaelのグループは、成体モルモットの蝸牛感覚上皮にノッチ情報伝達系の転写因子である *Atoh1* をアデノウイルスを用いて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が起こりうることを示し⁵⁾、アミノ配糖体で聾としたモルモットでも同様の操作により、残存する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た⁶⁾。一方、山本ら⁷⁾は、ノッチ情報伝達系の遮断により、内耳感覚上皮での *Atoh1* 発現が亢進し、支持細胞から有毛細胞への分化転換が起こりうることを器官培養系の実験で示した。そこでわれわれは、Raphaelらのグループが用いたモルモット障害モデルを使用し、薬物の内耳局所投与によるノッチ情報伝達系阻害による支持細胞から有毛細胞への分化転換について調べた。ノッチ情報伝達系阻害薬としては、山本らが培養系で有効性を確認したγセクレターゼ阻害剤であるMDL28170を用いた。結果、支持細胞から有毛細胞への分化転換を示唆する所見が認められた⁷⁾。障害後に認められた新生有毛細胞の数は、ウ

イルスペクターによる *Atoh1* 過剰発現に比較すると少なく、また新生有毛細胞が認められる部位も限定されていた。しかしながら、アデノウイルスベクターによる内耳への遺伝子導入という手法に比べ、内耳への薬物局所投与という方法は、臨床应用到に近い手法といえ、ノッチ情報伝達系の操作による内耳有毛細胞再生を臨床応用するという観点からは、大きな前進といえる。近年、特定のタンパク質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、今後、遺伝子操作で得られた研究成果を「内耳への薬物投与」に置き換えることにより、臨床応用への可能性を高める工夫が積極的になされるであろう。

鳥類での内耳有毛細胞再生のメカニズムを哺乳類に適用するという観点から、哺乳類での支持細胞の増殖誘導も重要な研究アプローチといえる。支持細胞の増殖停止機構として、細胞周期を抑制するサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質である p27^{Kip1} の役割が最も注目されている。生後の蝸牛感覚上皮においても支持細胞の p27^{Kip1} の発現を抑制することができれば、支