論 説

聴 覚 系 の 再 生

— 将来の難聴の治療に向けて —

伊 藤 壽 一

Regeneration of the Auditory System

—The Future Treatment of Sensorineural Hearing Disturbance—

Juichi Ito

(Kyoto University)

In order to investigate the possibility of the treatment of sensorineural hearing disturbance, two kinds of experiments were performed using animals. First, the ventral cochlear tract in the brain stem to pons was transected in adult rats. Tissue from embryos was transplanted to the lesion site. In 20% of the rats examined, the axons regrew beyond the transected site and regenerated into the denervated side and terminated at the normal targets. The hearing function of animals also recovered. Those findings contradict the widely held view that the adult mammalian central auditory system cannot be restored following damage.

In addition, adult rat hippocampus-derived neural stem cells (NSC) were grafted into newborn rat cochlea. Within two to four weeks of grafting to the cochlea, some NSC survived in the cochlear cavity and some of them had adopted the morphologies and positions of hair cells. This suggests that NSC can adapt to the environment of the cochlea and gives hope for the treatment of damaged cochlea and sensorineural hearing loss.

Key words : regeneration, central auditory pathway, stem cell, hair cell

はじめに

ヒトを含め、哺乳動物の中枢神経系は一度損傷を受けると再生は困難であるとされてきた。また、哺乳動物の中枢神経伝導路も同様に、ほとんど再生しないというのが従来通説であった。しかし最近では、哺乳動物の中枢神経系は潜在的に再生能力があり、実際に再生したという報告もみられるようになってきた。

一方、聴覚系に関しても、中枢聴覚路、内耳の感覚細胞の再生に関する報告がみられるようになってきた。特にこれまで治療が困難であると考えられてきた感音難聴は内耳有毛細胞の障害であることが多く、逆にいえば有

毛細胞の障害を防ぐかまたは再生を促すことができれば将来の感音難聴の治療に結びつくことも考えられる。本稿ではまず、一度損傷を受けた場合再生が困難と考えられてきた中枢神経伝導路のなかで、中枢聴覚伝導路の切断実験を行い、組織学的に再生が起り得るかどうか、機能回復が起こるかについて動物を使って検討した。

次いで、内耳の感覚細胞(有毛細胞)の再生について解説を加える。内耳の有毛細胞が障害を受けることにより生じる感音難聴はこれまで治療が非常に困難とされている。内耳有毛細胞の障害は音響暴露、各種薬物、加齢などによって生じる。この内耳有毛細胞は一度障害を受け

ると再生することは困難で、このため一度生じた感音難聴は治癒しないと考えられている。しかし、薬物などで感音難聴をきたした動物の蝸牛を検索すると、比較的初期の段階では内耳の形態はほぼ正常に保たれており、内耳有毛細胞のみが障害を受けていることが多い。つまり、内耳有毛細胞の機能が何らかの方法で回復すれば、感音難聴も回復するのではないかと期待を抱かせる所見である。これまでも内耳有毛細胞は自然再生することが鳥類などで報告されている^{1)~5)}。今後の検討課題は哺乳動物での有毛細胞の機能回復である。

一方、再生に関し、最近特に注目を受けているのが「幹細胞」である。幹細胞は自己増殖能と多分化能を持ち、種々の器官の元になる細胞であり、そのなかでも神経幹細胞は神経細胞、グリア細胞の元になる細胞である。神経幹細胞はこれまで幼若な動物にのみ存在すると考えられてきたが、最近成動物の中枢神経系、特に哺乳動物の脳室近辺や海馬でも見つかり、抽出・培養が可能となってきた。海馬由来の神経幹細胞を嗅球、網膜などに移植すると、移植部位の細胞に分化するという報告もある^{6)~11)}。つまり、この神経幹細胞は順応性、可塑性を有すると考えられ、内耳への移植のドナーの候補とも考えられる。著者らは海馬由来の神経幹細胞を内耳に直接投与し、その経過を観察したのでそれらの研究についても解説する。

幼若哺乳動物の中樞聴覚路の再生

1) 中枢神経伝導路の再生具体例

幼若動物は成動物に比べ再生の可能性が高い。脊髄および錐体路の切断実験などを通し、幼若動物の中樞神経伝導路が再生したという報告や、機能的にも四肢運動が回復した例などが報告されている。また、幼ネコ上小脳脚を交叉部で完全切断すると、小脳遠心投射に再生線維が観察され、その線維の大部分は切断面を貫いて伸び、ほぼ正常な投射線維と同じ経路をたどって正常な投射部位に終止したとする例など、組織学的再生例だけでなく、機能的にも回復するという例が報告されている^{12)~15)}。そのような研究をもとにし、著者らは障害を与えた中枢聴覚路が再生することを確認した。以下、その研究につき述べる。

2) 障害を与えた中枢聴覚路の再生と機能回復

著者らはラットの中樞聴覚伝導路の切断実験を行い、切断された聴覚路が果たして再生するかどうかを観察し

た¹⁶⁾。しかし仮に組織学的に再生するとしても、問題は機能回復が起こりうるかである。そのため機能回復(この場合は聴覚の回復)に関しても電気生理学的に、聴性脳幹反応を経時的に測定し、評価の指標とした。

実験には生後6日目から20日目の幼若ラットを用いた。中枢聴覚路の切断部位として、蝸牛神経腹側核から延髄・橋の最腹側部を通り、両側の上オリーブ核群、反対側の外側毛体核、下丘に至る腹側聴索を切断した。切断後1日目から1カ月目にかけて、順行性トレーサーとしてwheat germ agglutinin horseradish peroxidase (WGA-HRP)を切断と同側の蝸牛神経腹側核に注入し、トレーサーで標識された神経軸索が切断部位を越えて目的の投射部位に伸びていくか、つまり再生が起こりうるかを検討した。再生線維の機能回復を評価する手段として、聴覚路の切断前後に随時、聴性脳幹反応を測定した。その結果、幼若ラットでは切断の条件が良ければ(組織の過度の損傷や異常出血がないなど、主にシャープに切断された場合であるが)、WGA-HRPで標識された軸索は切断部を越えて上オリーブ核群、反対側の外側毛体核、下丘に投射し、再生が認められた(図1)。切断部の条件が悪ければ(組織の浮腫や瘢痕の形成など)WGA-HRPで標識された軸索は切断部を越えて伸びることはなく、再生は不成功に終わった。生後20日目以内の幼若ラットでは再生の確率はほぼ60%であった。

再生の成功、不成功は切断の条件の良悪が問題となる。神経軸索が切断されると、切断部周囲の環境が変化し、周囲のグリア細胞その他から神経成長因子などが分泌され、再生を促す環境が形成されと考えられる。しかし、再生が不成功に終わった例を観察すると、切断部周囲にグリア性瘢痕が形成されている例などが多くみられる。このような例では切断部の神経軸索から新たに形成される成長円錐などがこの瘢痕を越えて伸びていくことができず、再生が不成功に終わると推測される。

再生が組織学的に確認された動物では、聴性脳幹反応はほぼ正常な波形を示した(図2)。つまり機能回復する結果となった。このように、これまで再生はほとんど起こらないと考えられてきた哺乳類の中樞聴覚伝導路でも、動物が幼若であり、切断実験の際の切断部に瘢痕形成が少ないなど、条件が良ければ再生が起こり得ることが組織学的に確認された。しかも再生した神経線維は、聴性脳幹反応でみる限り、機能的にもほぼ正常と同様の働きをすることが認められた。

図1 中枢聴覚伝導路切断後の再生の成功
WGA-HRP で標識された神経軸索が切断部(矢頭)を越えて反対側に伸長している。図は脳幹から橋部の環状断を示す。

図2 中枢聴覚伝導路切断実験での ABR 記録
再生成功例(B)では ABR の振幅はコントロール(A)に比べ減少しているが、各波はすべて観察でき、聴覚機能の回復が推測される。再生不成功例(C)では ABR の振幅も減少し、特にⅣ～Ⅴ波が消失している。この結果は聴覚機能が回復していないと考えられる。

成哺乳動物の再生能力に関して

1) 成哺乳動物の中枢神経伝導路の再生を促進する方法

成哺乳動物は幼若動物に比べ再生は困難であると考えられる。しかし、臨床的に重要な問題は、損傷を受けた成動物の中枢神経伝導路の再生を促進する方法はあるか

どうかということである。これまで再生を促進する試みとして動物を用いた研究がいくつかみられる。

①末梢神経の移植

成哺乳動物の再生を促す方法として古くから用いられている方法に末梢神経の移植がある¹⁷⁾¹⁸⁾。特に重要な役割を果たすものはシュワン細胞である。シュワン細胞は

神経成長因子の合成を調節し、神経伸長を促進する働きをする。ラットを使った研究ではこれら末梢神経移植は組織学的にも機能的にもかなり回復するとの報告がある¹⁹⁾。機能の回復に関しては、神経が切断されてから移植するまでの時期、末梢神経を切除してから移植に使用するまでの時期なども問題になると思われる。前者に関しては移植までの時期が早いほどよいと考えられるが、後者に関しては必ずしも末梢神経切断直後に移植するより、少し時間をおき、神経成長因子の分泌が促進される時期に移植した方がよいとする考えもある。

②培養細胞の移植

一方、シュワン細胞は人間のシュワン細胞も含め、培養可能である²⁰⁾。この培養細胞を中枢神経切除部に置き、その部位の再生を促す試みもされている。シュワン細胞

に類似した性質を持つ olfactory ensheathing cell (OEC) を、損傷を与えた脊髄に投与した時、皮質脊髓路が正確な投射部位に向かって再生したという報告もある²¹⁾。

③神経成長因子の投与

上記の神経、培養細胞を投与するよりさらに現実的なものは神経成長因子の投与である。現在、各種神経成長因子が抽出・合成されているが、どのような種類の神経成長因子をどこに投与するか、またいかにすれば内因性の神経成長因子のレベルを高めることができるのか、などが問題となる。遺伝子操作で内因性神経成長因子の合成を上げるなどの方法もある²²⁾。

④胎児組織の移植

損傷した中枢神経系の修復のために胎児組織や胎児からの細胞を投与する方法がある。実際に臨床応用されて

図3 成ラットの中樞聴覚伝導路の単純切断例(A)、切断時に胎児脳幹部を切断部(矢印)に移植し、再生が成功した例(B)。再生成功例では、WGA-HRPで標識された神経軸索は切断部(矢印)を越えて反対側へ投射している(図は脳幹から橋部の環状断)。

いるものに、線条体に胎児由来のドーパミン細胞を移植する方法があり、いくつかの動物モデル実験が行われている²³⁾。本方法でも周囲環境の神経成長因子の増加は期待されるが、この場合は再生というより失われた細胞の置換という意味合いが強い。成動物の脊髄に損傷を加え、胎児組織で置換することにより、組織学的再生が起こり、機能的にも下肢麻痺が回復したという報告もあり、胎児組織の移植は再生を促進させる有効な手段と考えられるが、倫理的問題も含め、将来の臨床応用には難点が残る。

2) 成哺乳動物の中樞聴覚路の再生

著者らは成哺乳動物の中樞聴覚路の再生に関しても幼若ラットの時と同様の研究を行った。方法は幼若ラットの中樞聴覚伝導路切断の場合と同様であるが、結果的には中樞聴覚路も他の中枢神経伝導路と同じく、一度損傷を受けると普通の条件下ではほとんど再生しないという結果となった。一方、単純な切断実験に加え、再生を促進させる方法として、切断面に胎児から摘出した脳幹部～橋部の組織片を移植し、再生が促進されるかどうか検討した。単純切断の場合は再生が認められた例はほとんどなかったが、胎児組織を切断面に移植した例では、検討した例のうち約20%に再生が認められた。図3は単純切断を行い、再生の認められなかった例、切断面に胎児組織を移植し、再生の認められた例を示す。聴性脳幹反応による機能の検討では、幼若ラットの時と同様に、

再生が組織学的に確認された動物では、聴性脳幹反応もほぼ正常な波形を示したが、再生が不成功に終わった動物では、聴性脳幹反応でも回復が認められず、幼若動物で聴覚路切断実験を行った場合と同様に、成動物の場合でも組織学的再生の結果と機能回復の結果が一致した。

以上の結果により、成哺乳動物の場合でも中枢聴覚伝導路は胎児組織を移植するという方法で再生が促進されることがわかった。これは以前からの胎児組織を利用した際の再生促進機構と同様に、胎児組織からの神経成長因子の放出、また周囲環境の変化などにより再生を促進させる機構が働いたものと考えられる。

以上の結果は、これまで一度損傷を受けると回復不能と思われていた中枢性の聴覚障害に対しても、方法によっては回復する潜在能力を有するというを示唆するものである。しかし、実際の臨床場面で、脳幹から橋にかけての腹側聴糸が切断されるという例はほとんどなく、難聴をきたす大部分は内耳有毛細胞の障害である。

内耳有毛細胞の再生—神経幹細胞の利用

再生に関し、最近特に注目を受けているのが「幹細胞」である。著者らは海馬由来の神経幹細胞を内耳に直接投与し、内耳への生着、有毛細胞への分化への期待を含めてその経過を観察した。以下の研究では比較的分離・培養技術が確立してきた海馬由来神経幹細胞を用いた。海

図4 蝸牛コルチ器内に投与された海馬由来神経幹細胞が有毛細胞上に生着し(矢印)、一部有毛細胞に置き換わっている所見(矢頭)。

馬由来神経幹細胞は1個の細胞から増殖する単クローン性の細胞群を作り出すことができ、かつこの単クローン細胞が神経細胞、2種類のグリア細胞に分化することから神経系の幹細胞であることが証明できる。この細胞にレトロウイルスベクターを用いて β ガラクトシダーゼ蛋白が発現するべく操作を加えると、移植した先でドナー細胞を同定することが可能である。この海馬由来神経幹細胞は1 μ l中10万個の細胞数がある。著者らはこの海馬由来神経幹細胞を新生ラット(生後2~3日)の蝸牛内に投与した。投与にあたっては、ガラス電極を用い、約5万個の細胞を注入した。投与2~4週間後、動物を還流固定し、内耳を摘出、連続切片を作って抗 β ガラクトシダーゼ抗体、内耳有毛細胞の特異抗体であるファロイジンなどで反応させた。

内耳(蝸牛)に β ガラクトシダーゼを投与して2~4週間後、蝸牛の鼓室階、前庭階、蝸牛管の内部、管空壁には β ガラクトシダーゼを発現する海馬由来神経幹細胞が一塊となって見いだされ、海馬由来神経幹細胞が移植後数週間経っても生着し続けることがわかった。ある動物では海馬由来神経幹細胞が有毛細胞上に生着したり、場合により、蝸牛コルチ器内に侵入し、一部有毛細胞に置き換わっているのではないかという所見もみられた(図4)。これらの事実は海馬由来神経幹細胞であっても内耳有毛細胞に対する移植・再生のドナーの候補となりうることを意味する。

今後の臨床応用への展望

近年幹細胞を移植のドナーとして使用しようとする試みは非常に多くなされており、哺乳動物でも種々の部位から幹細胞が抽出されている。海馬由来神経幹細胞は、動物実験の段階では中枢神経系のさまざまな部位に移植されている。海馬由来神経幹細胞を内耳に移植することに多少の無理はありそうであるが、幹細胞の場合、起源はどこの細胞であっても結果的にはうまく生着し、当該組織に分化するという報告もある。しかし、障害を与えた網膜に神経幹細胞を移植した際に、海馬由来神経幹細胞が形態学的には網膜細胞と類似の細胞に分化したが、網膜特異の抗体には反応しなかったという事実もある。このような事実を考えると、内耳由来の幹細胞を抽出、培養できれば、海馬由来神経幹細胞よりも内耳に対する移植の可能性は高まると考えられる。さらにはすべての組織の元になる胚性幹細胞の利用も有望視されている。

倫理的問題が解決されれば、最も臨床応用が可能なものであり、聴覚系への応用も十分考えられる。

参考文献

- 1) Lippe WR, Westbrook EW and Ryals BM : Hair cell regeneration in the chicken cochlea following aminoglycoside toxicity. *Hear Res* **56** : 203~210, 1991.
- 2) Stone JS and Contache DA : Synchronization of hair cell regeneration in the chick cochlea following noise damage. *J Cell Sci* **102** : 671~680, 1992.
- 3) Saunders JC, Adler HJ and Pugliano FA : The structural and functional aspects of hair cell regeneration in the chick as a result of exposure to intense sound. *Exp Neurol* **115** : 13~17, 1992.
- 4) Cotanche DA and Lee KH : Regeneration of hair cells in the vestibulocochlear system of birds and mammals. *Curr Opin Neurobiol* **4** : 509~514, 1994.
- 5) Adler HJ and Saunders JC : Hair cell replacement in the avian inner ear following two exposures to intense sound. *J Neurocytol* **24** : 111~116, 1995.
- 6) Gage EH, Ray J and Fisher LJ : Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Ann Rev Neurosci* **18** : 159~192, 1995.
- 7) Gage FH, Coates RW, Palmer TD, et al : Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 11879~11883, 1995.
- 8) Palmer TD, Ray J and Gage FH : FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* **6** : 474~486, 1995.
- 9) Palmer TD, Takahashi J and Gage FH : The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **8** : 389~404, 1997.
- 10) Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, et al : Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* **383** : 624~627, 1996.
- 11) Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, et al : Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* **12** : 340~348, 1998.
- 12) Kalil K and Reh T : A light and electron microscopic study of regrowing pyramidal tract fibers. *J Comp Neurol* **211** : 265~275, 1982.
- 13) Schreyer DJ and Jones EG : Growth of corticospinal tract axons on prothetic substrates introduced into the spinal cord of neonatal rats. *Dev Brain Res* **35** : 291~299,

- 1987.
- 14) Iwashita Y, Kawaguchi S and Murata M : Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* **367** : 167~170, 1994.
- 15) Kawaguchi S, Miyata H and Kato N : Regeneration of the cerebellofugal projection after transection of the superior cerebellar peduncle in kittens ; morphological and electrophysiological studies. *J Comp Neurol* **245** : 258~273, 1986.
- 16) Ito J, Murata M and Kawaguchi S : Spontaneous regeneration and recovery of hearing function of the central auditory pathway in young rats. *Neurosci Lett* **254** : 173~176, 1998.
- 17) Richardson PM, McGuinness UM and Aguayo AJ : Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* **284** : 264~265, 1980.
- 18) David S and Aguayo A : Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214** : 931~933, 1981.
- 19) Cheng H, Cao Y and Olson L : Spinal cord repair in adult paraplegic rats ; partial restoration of hind limb function. *Science* **273** : 510~513, 1996.
- 20) Casella GT, Bunge RP and Wood PM : Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* **17** : 327~338, 1996.
- 21) Ying L, Field PM and Raisman G : Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* **277** : 2000~2002, 1997.
- 22) Tuszynski MH and Gage FH : Somatic gene therapy for nervous system disease. *Ciba Found Symp* **196** : 85~97, 1996.
- 23) Bjorklund A and Stenevi U : Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res* **204** : 643~647, 1979.
- (別刷請求先 : 伊藤壽一
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54
京都大学大学院医学研究科感覚運動系病態学講座
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学)