Mini Review

内耳への神経幹細胞移植

中川隆之，井口福一郎，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

Transplantation of neural stem cells into the inner ear

Hearing and balance disorders are included in most common disabilities, and the majority is incurable because of the low capability for regeneration of the inner ear. New therapeutic approaches including cell transplantation are therefore subjected to overcome degenerative diseases of inner ears. Firstly, transplantation of neural stem cells (NSCs) into inner ears has been attempted as well as the retina. Grafted NSCs can survive and migrate into inner ear tissues including sensory epithelia after transplantation into inner ears of newborn rats. Histological analysis following transplantation of NSCs into injured, matured inner ears of mice demonstrates the potential of NSCs for replacement of inner ear hair cells or primary neurons. *In vitro* analysis also support the hypothesis that NSCs can differentiate into inner ear hair cells. In addition, NSC-derived cells have the potential for producing several neurotrophins in the inner ear, suggesting the potential of NSC transplantation for protection of inner ear tissues from degeneration.

Rec.3/29/2004, Acc.5/12/2004, pp562-566

Takayuki Nakagawa, Fukuichiro Iguchi, Juichi Ito
Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery,
Kyoto University Graduate School of Medicine

Key words transplantation, inner ear, neural stem cell, regeneration, protection

はじめに

内耳は聴覚および平衡覚の末梢受容器であり，内耳障害は感音難聴，めまいの主な原因の一つとされている。高度の内耳障害は聾や高度の平衡障害を来し，日常生活を著しく障害する。これら内耳障害の頻度は決して低いものではなく，例えば感音難聴は60歳以上の人口の約60%に存在し，身体障害者に該当する高度内耳障害者は，本邦で40万人以上存在する。このように多くの高度内耳障害者が存在する要因として，内耳の脆弱性があげられる。哺乳類の内耳は，一旦傷害されると機能的に再生することは，極めて困難とされている。このような背景から，現在内耳障害に対する有効な治療法はほとんどなく，ごく限られた場合にのみ機能回復が期待できる。人工内耳は，蝸牛に電極を挿入し，ラセン神経節を有毛細胞にかわり，刺激することにより聴覚を再獲得させる医療機器として広く用いられている。しかし，適応は高度感音難聴者に限定され，また得られる聴力も自然な聴力とは異なる。

内耳における聴覚や平衡覚の受容には有毛細胞が不可欠である。有毛細胞は，音響や振動といった物理的な信号を電気信号に変換する役割を果たしている。また，有毛細胞が受容した信号を脳に伝える一次ニューロンも内耳に存在し，内耳感覚受容に不可欠な細胞である。しかし，有毛細胞とこれと連なる一次ニューロンは，哺乳類での再生は極めて困難であり，ごく限られた再生能力が前庭感覚上皮に存在することが報告されているのみである¹⁾。しかしながら，近年の分子生物学および幹細胞医学の発展とその内耳への応用により，哺乳類内耳再生が不可能なものでなくなりつつある。このような新しい研究の流れの一つとして，内耳への遺伝子導入がある。有毛細胞の分化運命決定機構に関係する遺伝子を感じ覚上皮の支持細胞に導入することにより，有毛細胞が再生することが報告されている^{2,3)}。しかし，機能的再生を証明する報告はなされていない。一方，内耳で再生能力が低い要因として，再生細胞の元となる幹細胞や前駆細胞といえる細胞が内

耳に存在しても^{4,5)}, その数が不十分であることが想定されている。そこで内耳有毛細胞や神経細胞の元になる細胞を内耳へ移植してやり, 再生を誘導する方法が注目されている。

内耳は再生しない, あるいは再生する能力が極めて低いという前提に基づけば, 内耳をいかにして保護するかということも重要となる。一部の神経栄養因子が高い内耳保護効果を有することが報告されており^{6,7)}, いかにして内耳に長期的に神経栄養因子を投与することができるかが一つの課題となっている。中枢神経系では, これら神経栄養因子を分泌する能力がある細胞を移植することにより, 長期的に神経栄養因子を中枢神経系に投与する方法が開発されつつある⁸⁾。内耳への細胞移植は, この目的にも応用できることが期待できる。そこで, どのような細胞をどのような方法で内耳に移植すれば, 期待される効果が得られるのかが問題となる。内耳は複雑な構造を持つ脆弱な組織からなるため, 特に, いかに移植するのが大きな問題となる。

神経幹細胞は内耳に生着するか

神経幹細胞は, 胎生期だけではなく, 成熟後の脳からも分離できることが知られている。さらに, 神経幹細胞は脳, 脊髄のみならず, 網膜にも生着することが報告されている⁹⁾。そこで, 神経幹細胞の内耳への生着能力を調べる目的で新生ラットの蝸牛に神経幹細胞を直接注入し, 組織学的解析を行った。すると, 移植された神経幹細胞が蝸牛内に生着し, 一部の移植細胞は感覚上皮内にも生着していることが確認された¹⁰⁾。この結果は, 神経幹細胞が内耳環境下で生着しうことを示唆し, 神経幹細胞が内耳移植に用いることができる細胞であり, 神経幹細胞の内耳生着後の分化能力が注目されるところとなった。

内耳への細胞移植経路

成熟した内耳は骨に囲まれた複雑な形態を持つ器官であり, 手術操作に対しても脆弱な組織である。このような特徴を有する内耳に細胞を移植するためには, その移植方法を十分に検討する必要がある。そこで内耳に細胞を移植する2つの経路を考案し, それぞれの侵襲について聴覚障害を指標とした研究を行った¹¹⁾。移植経路として, 蝸牛に直接細胞を注入する方法と末梢前庭器の一つである半規管から細胞を注入する方法について検討した。胎生11.5日のGFPマウス脳室からNeuro sphere法を用いて, 分離・培養した神経幹細胞を移植細胞とした。成熟したマウス内耳に細胞を蝸牛側壁もしくは半規管から注入し, 移植前後の聴力を聴性脳幹反応を用いて評価し, 移植細胞

の蝸牛での生着について検討を加えた。いずれの移植方法でも内耳に神経幹細胞由来の細胞を確認することができたが, 蝸牛から細胞を移植した場合, 約50dB SPLの聴覚閾値上昇が認められた(図1)。一方, 半規管から細胞移植を行った場合, 聴力閾値の上昇は10dB SPL以内にとどまり, 低侵襲であることが判明した。つまり, 内耳への侵襲を考慮した場合, 半規管からの移植が優れていることといえる。一方, 移植細胞の生着部位を詳細に検討すると, 蝸牛から移植した場合, 感覚上皮に接する中央階に細胞が高頻度に認められるのに対して, 半規管から移植した場合は, 中央階に存在する細胞の割合が顕著に低下することが分かった。したがって, 内耳に低侵襲に細胞を移植する方法としては, 半規管からの移植が優れるが, 感覚上皮に近い中央階に細胞を導入するという観点からは, 蝸牛に直接細胞を移植する方法を用いる方が合理的と考えられた。そこで, 実験的に内耳有毛細胞の再生への潜在能力を検証する場合には, 蝸牛からの注入を用い, 神経栄養因子投与目的の移植には半規管から移植する方法を選択することとした。

神経幹細胞の分化能力

内耳有毛細胞の再生を目的とした場合, 移植する神経幹細胞が内耳有毛細胞に分化する能力を持たなければならない。そこで, *in vitro*で神経幹細胞の分化誘導を促し, 有毛細胞としての性質を持つ細胞に分化するのかがかを免疫組織学的に検討した。神経幹細胞を分化誘導の条件下で培養すると, 多くの細胞は神経系の細胞に分化する傾向を示した。しかし, 少数であるが, 有毛細胞のマーカーであるmyosin VIIaおよびBrn 3c双方に陽性を示す細胞が認められた(図2)¹²⁾。つまり, 詳細な誘導のメカニズムは不詳であるが, 神経幹細胞は内耳有毛細胞の方向にも分化しうることが判明した。したがって, 神経幹細胞を内耳に移植した場合, 条件が整えば, 内耳で有毛細胞に分化し, 感覚上皮の再生に寄与する可能性があることが期待された。

神経幹細胞移植による内耳再生

他の組織でも移植細胞の生着は, 傷害を受けた組織に移植した場合の方が良好であることが知られている⁹⁾。全く傷害を与えていない網膜上皮には移植した神経幹細胞が上皮内に侵入しえないが, 上皮に傷害を与えることにより数多くの移植細胞が網膜上皮内に生着することが示されている。そこで, 耳毒性薬物であらかじめ内耳感覚上皮に傷害を与えた後に, 内耳に神経幹細胞を移植し, その分化傾向を免疫組織学的に解析した。感覚上皮への移植

図1 マウス内耳への神経幹細胞移植後の聴力変化と蝸牛内神経幹細胞の局在

A: 半規管から細胞移植後の聴覚閾値(中央値±標準偏差)の変化. 閾値上昇は約10dBにとどまる. B: 蝸牛第2回転での移植細胞(緑色蛍光)の局在. 蝸牛内に移植細胞を認めるが, 中央階(SM)には認められない. C: 蝸牛から直接細胞を移植した後の聴覚閾値の変化. 移植直後より約50dBの閾値上昇を認め, 回復傾向を認めない. D: 蝸牛から直接移植した場合, 移植細胞(緑色蛍光)は中央階(SM)にも認められる.(文献11)より一部改変)

図2 神経幹細胞から誘導された有毛細胞 phenotype

myosin VIIa (赤色蛍光)の発現を細胞質, Brn3c(緑色蛍光)発現を核に認める細胞を認める.(文献12)より一部改変)

図3 前庭感覚上皮内に生着した神経幹細胞由来細胞

前庭感覚上皮内に myosin VIIa (赤色蛍光)陽性, GFP(緑色蛍光)陽性の細胞を認める(矢印). 青色蛍光はDAPIによる核染色を示す.(文献13)より一部改変)

細胞の移行を期待する観点から, 蝸牛側壁から直接細胞を注入する方法を用いた. 結果, 移植細胞の生着が蝸牛, 前庭感覚上皮内およびラセン神経節に認められた¹³⁾. この結果を無処置の内耳に移植した場合と比較すると, 内耳組織内への神経幹細胞の移行が良好であり, 内耳においても, 組織傷害が移植細胞の生着に影響を及ぼすこと

が推察された. 有毛細胞のマーカーである myosin VIIa 陽性細胞は, 前庭感覚上皮に生着した細胞にのみ認められた(図3). したがって, 内耳に移植された神経幹細胞は, 内耳感覚上皮内に生着し, 有毛細胞の特徴を有する細胞に分化することが明らかとなった. この結果は, 神経幹細胞移植が内耳有毛細胞再生に応用できる可能性を示す

ものといえる。しかし、有毛細胞のマーカー陽性の細胞は前庭感覚上皮内に生着した移植細胞の5%にしか認められなかった。したがって、移植方法もしくは移植細胞に何らかの工夫を加えることが、機能的再生の実現には必要と考えられる。

神経幹細胞は神経細胞にも分化することから、内耳への神経幹細胞移植は、蝸牛軸に存在する聴覚の一次ニューロンであるラセン神経節再生にも応用できる可能性がある。ラセン神経節は有毛細胞が受容した音刺激を脳に伝える役割を担う細胞であり、高度感音難聴者における聴覚再獲得の唯一の手段である人工内耳の臨床有用性の獲得には不可欠という側面も持つ。人工内耳は蝸牛内に電極を挿入し、ラセン神経節を直接刺激することによって聴覚を再獲得する電子器機であり、現在では本邦を含め世界中で聾からの回復の手段として広く用いられている。耳毒性薬物により、ラセン神経節に変性を誘導するマウスモデルを用い¹⁴⁾、ラセン神経節が本来存在する蝸牛軸に神経幹細胞を移植し、その分化傾向を免疫組織学的に検討した¹⁵⁾。移植された神経幹細胞は蝸牛軸に広く生着し、神経およびグリア細胞に分化していることが確認された。神経とグリアの比率は、損傷脊髄に移植された場合¹⁶⁾と同様にグリア細胞が多い傾向を示した。したがって、神経幹細胞移植はラセン神経節再生にも応用可能であると考えられる。しかし、機能的再生には効率よく神経細胞に、特に蝸牛求心性神経としての性質を持つ細胞に誘導する工夫が必要である。

神経幹細胞移植による神経栄養因子投与

先述したように内耳への細胞移植は、内耳保護を目的に、内耳へ長期的に神経栄養因子を投与する方法としても応用することが期待できる。内耳への侵襲が低い半規管からの移植経路を用い、移植細胞の神経栄養因子分泌能力について組織学的に検討した¹⁷⁾。すると、マウス内耳に生着した神経幹細胞の約90%がグリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)陽性であり、約半数の細胞が脳由来神経栄養因子(BDNF)陽性であることが判明した¹⁷⁾。GDNFおよびBDNFの内耳保護作用はすでに報告されており^{6,7)}、神経幹細胞移植は、内耳への神経栄養因子投与方法として応用可能であると考えられる。

おわりに

内耳障害の治療に細胞移植を応用しようとする試みは、未だ緒についたところである。我々が内耳に細胞を移植するという新しいコンセプトを提示してから3年が経過し、本邦のみならず、細胞移植による内耳再生に関する研

究が広く行われつつある。神経幹細胞のみならず、胚性幹細胞¹⁸⁾、骨髄由来間葉系細胞¹⁹⁾、内耳幹細胞^{5,20,21)}を内耳再生に応用する研究が行われている。しかし、現在のところ、哺乳類内耳に細胞移植を行い、有毛細胞再生を誘導したという結果は我々の報告のみにとどまっている。内耳幹細胞は内耳組織の再生を考慮すると理想的な細胞と思われるが、いかにして細胞のソースを得るかという問題がある。一方、胚性幹細胞は万能細胞として、内耳再生についても期待がもたれるが、自己由来の細胞を用いることはできない。神経幹細胞は自己由来細胞を得られる可能性がある細胞であるが、現実的には問題がある。また、有毛細胞再生に関しては、有毛細胞の誘導効率に問題があり、内耳再生に用いる移植細胞として、どの細胞がベストなのかについては今後の研究成果を待つ必要がある。また、内耳での移植細胞に対する免疫反応についての研究も今後検討されるべき課題といえる。しかし、内耳細胞移植に関する一連の研究結果は、内耳細胞移植の内耳治療への応用への期待を抱かせるものであり、今後の研究成果に期待がもたれる。

文 献

- 1) Rubel EW, Dew LA, Roberson DW: Mammalian vestibular hair cell regeneration. *Science*, 267: 701-707, 1995.
- 2) Zheng JL, Gao WQ: Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat Neurosci*, 3: 580-586, 2000.
- 3) 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: 4395-4400, 2003.
- 4) Malgrange B, Belachew S, Thiry M, Nguyen L, Rogister B, Alvarez ML, Rigo JM, Van De Water TR, Moonen G, Lefebvre PP: Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev*, 112: 79-88, 2002.
- 5) Li H, Liu H, Heller S: Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med*, 9: 1293-1299, 2003.
- 6) Ylikoski J, Pirvola U, Virkkala J, Suvanto P, Liang XQ, Magal E, Altschuler R, Miller JM, Saarna M: Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear Res*, 124: 17-26, 1998.
- 7) 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.
- 8) Kordower JH, Isacson O, Leventhal L, Emerich DF: Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Prog Brain Res*, 127: 414-430, 2000.
 - 9) Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A, Ide C, Honda Y: Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 4268-4274, 2000.
 - 10) Ito J, Kojima K, Kawaguchi S: Survival of neural stem cells in the cochlea. *Acta Otolaryngol*, 121: 140-142, 2001.
 - 11) Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Endo T, Kim TS, 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.
 - 12) Kojima K, Tamura S, Nishida A, 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.
 - 13) Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim TS, 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.
 - 14) Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Dong Y, Yuki K, Naito Y, Lee SH, Ito J: A novel model for rapid induction of apoptosis in spiral ganglions of mice. *Laryngoscope*, 113: 949-999, 2003.
 - 15) Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Tateya I, Endo T, Kim TS, Dong Y, Kita T, Kojima K, Naito Y, Omori K, Ito J: Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. *Acta Otolaryngol*, Suppl. 551: 65-68, 2004.
 - 16) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H: Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res*, 69: 925-933, 2002.
 - 17) Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Kim TS, Endo T, Taniguchi Z, Naito Y, Ito J: Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuroreport*, 14: 77-80, 2003.
 - 18) 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: 13495-13500, 2003.
 - 19) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, Kim TS, 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.
 - 20) Kojima K, Murata M, Nishio T, Kawaguchi S, Ito J: Survival of fetal rat otocyst cells grafted into the damaged inner ear. *Acta Otolaryngol*, Suppl. 551: 53-55, 2004.
 - 21) Kim TS, Kojima K, Nishida A, Tashiro K, Lee JE, Fujino K, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Naito Y, Omori K, Lefebvre PP, Ito J: Expression of calretinin by fetal otocyst cells after transplantation into damaged rat utricle explants. *Acta Otolaryngol*, Suppl. 551: 34-38, 2004.