

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20249068

研究課題名（和文）内耳再生医療の開発

-内耳発生分子機構を応用したトランスレーショナルリサーチ-

研究課題名（英文）Development of the regeneration method for inner ear disorders

- Applying molecular mechanisms of inner ear development-

研究代表者

伊藤 壽一（ITO JUICHI）

京都大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号：90176339

研究成果の概要（和文）：本研究によって内耳発生に重要な因子が内耳再生医療に有用であることを発見した。細胞増殖制御因子 p27Kip1 を生後マウス蝸牛で抑制すると、増殖能がないとされていた生後哺乳類の蝸牛支持細胞が増殖した。HGF や EP4 アゴニストが内耳障害の予防や治療に有用であることを発見し、そのメカニズムを解明した。Notch シグナルが、内耳内の細胞運命決定だけでなく感覚上皮前駆細胞の分化タイミングの制御や維持を担うことを発見した。

研究成果の概要（英文）：In this research we found several factors that are important for inner ear development contributed to regenerative medicine of inner ears. Silencing of p27Kip1, cell cycle dependent kinase inhibitor, caused proliferation of postnatal mammalian cochlear supporting cell that had been considered to be non-proliferative. HGF and EP4 agonist protected or treated inner ear disorders including noise induced hearing loss and hearing loss due to aminoglycoside treatment. We also identified downstream mechanisms of how these molecules affect on inner ear hair cells. In addition novel roles of Notch signaling in inner ear development. Notch signaling not only specifies cell fates between inner ear hair and supporting cells but also regulates timing of differentiation of sensory epithelial progenitors and maintains those cell population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
平成21年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
平成22年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
年度			
年度			
総計	36,200,000	10,860,000	47,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：再生医学、発生学、細胞増殖、転写因子、幹細胞、支持細胞、有毛細胞

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 哺乳類でも内耳有毛細胞は再生する

最も高頻度に見られる身体障害である感音難聴の主要な原因は有毛細胞の障害であり、内耳再生研究の中心は「有毛細胞再生による聴覚再生」にある。われわれを含め、内耳再生への世界的な取り組みの結果、目的ご

とに、適切な内耳再生への戦略がどのようなものかが明らかになりつつある。内耳再生への戦略としては、① 内耳自身が持つ再生能力を高めて、内在する細胞からの再生を誘導する② 再生能力がある細胞を内耳に導入し、目的とする細胞を再生する（細胞移植）という2つの方法がある。

これまでの研究成果から、蝸牛の一次神経節であるラセン神経節再生には、細胞移植が有効な方法であることが示されつつある。一方、感覚上皮にある聴覚受容細胞である有毛細胞の再生については、①に相当する内在する細胞、すなわち、支持細胞を用いた再生誘導が有効な戦略であることが示唆されている。Izumikawaらは、ウイルスベクターを用い、ノッチ情報伝達系に関連する転写因子(遺伝子)を支持細胞に導入することにより、有毛細胞再生が可能であることを示した。われわれは、薬物で遺伝子導入と同様の効果を内耳感覚上皮内で引き起こすことでも、有毛細胞再生が起こりうることを示した(Hori 2007)。また、細胞生物学的な解析から、成熟した蝸牛の支持細胞が有毛細胞再生能力を持つことも示されている(White 2006)。

#### (2) 機能的な有毛細胞再生に求められるもの

哺乳類においても有毛細胞再生が可能であることは示されたといえるが、治療としての実用性を証明するレベルの再生には至っていない。研究開発の次の段階として、実用的な聴力回復を得るために必要な条件は、以下の通りである。①必要な「数」の有毛細胞再生②適切な「位置」での有毛細胞再生③機能的な感覚上皮の再生(機能的有毛細胞とラセン神経節とのシナプス形成)④再生有毛細胞の維持これらは本来、発生過程において厳密に制御されているが、再生の過程においては制御し得ていないものと言い換えることができる。

#### (3) 内耳機能再生のための戦略＝内耳発生の内耳再生への応用

1990年代以降分子生物学の発生学への応用が進み、内耳についてもかなり詳細な分子発生機構が明らかになってきた。この知見を応用することにより、有毛細胞再生をさらに発展させ、実用的なレベルでの聴覚再生が可能になると考えられる。現段階では、再生できる有毛細胞は少数で、配列は不整であるが、聴毛は形成されることが分かっている。また、再生有毛細胞の位置は、本来有毛細胞が存在する部位とは異なる(異所性)ことが多い。再生した有毛細胞が聴覚振動受容器として機能しているのか、再生した細胞が長期に生存可能なのかは不明である。本研究では、表さまざまな内耳発生に関連した分子を操作することにより、機能再生に貢献する有毛細胞再生を実現する。

#### 2. 研究の目的

鳥類では、内耳に再生能力が残されており、機能的な再生が起こりうるということが20年前に明らかにされた。一方、哺乳類での内耳再生について、われわれのグループを含めて世

界的に多くの研究がなされた結果、一定の成果がえられ、哺乳類での内耳再生も不可能ではないということが分かってきた。しかし、現状では、十分なレベルでの機能的な再生は実現されておらず、明確な臨床応用へのロードマップは完成されたとは言い難い。本研究では、これまでの独自の研究成果に立脚し、最近10年間で急速に充実した内耳発生についての知見を系統的に応用することにより、有毛細胞再生による実用的なレベルでの聴覚再生を実現するための基盤となる技術開発を行う。

#### 3. 研究の方法

##### (1) p27Kip1の生後蝸牛における役割

p27Kip1は、そのノックアウトマウスにおいては有毛細胞の数が増加しているため、内耳発生に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、生後の哺乳類蝸牛において、p27Kip1を欠失させることによって、有毛細胞の再生はおこらないとされる生後哺乳類蝸牛で有毛細胞数が増加するか検討した。生後において初めてp27Kip1が欠失させるため、まず生後マウス蝸牛の器官培養を行い、その後p27Kip1のRNA interference (RNAi)を起こすコンストラクトを電気穿孔法にて強制発現させる。それによって、蝸牛上の細胞で増殖が生じるか、形態変化が生じるか、などを観察した。

##### (2) HGF投与による内耳保護効果の検討

HGFは、内耳を構成するメラノサイトの発生途上での維持や聴覚の成熟に必要なものであるといわれている。本研究では、内耳の音響障害あるいは薬剤による障害に対して、HGF投与の効果を検討するため、音響外傷時の成体へのHGFの投与および新生児蝸牛の器官培養への薬剤による内耳障害モデルへのHGF投与の効果を検討した。また、器官培養の計ではHGF受容体の内耳での発現パターンの検討も行った。

##### (3) EP4アゴニストによる内耳音響外傷治療とそのメカニズム

生理活性物質であるプロスタグランジンEは、急性感音難聴の治療に使われているが、その効果については十分でないとの報告がある。我々は、プロスタグランジンEの受容体が複数あり、そのうちいくつかは拮抗する作用があることに注目し、まずEP4受容体の機能を検定することとした。成体モルモットに音響外傷を加え、音響外傷前、あるいは後にEP4アゴニストを投与し、聴性脳幹反応にて聴力を測り、EP4アゴニストにより聴力がどのように変動するか検討した。また、EP4受容体の蝸牛における局在を免疫染色により検討した。さらに、その作用機序を確認す

るために、EP4 受容体によってコントロールされると報告されている VEGF の発現の変化を EP4 アゴニスト投与前後で検討した。

(4) Notch シグナルの内耳発生におけるあらたな役割の検証

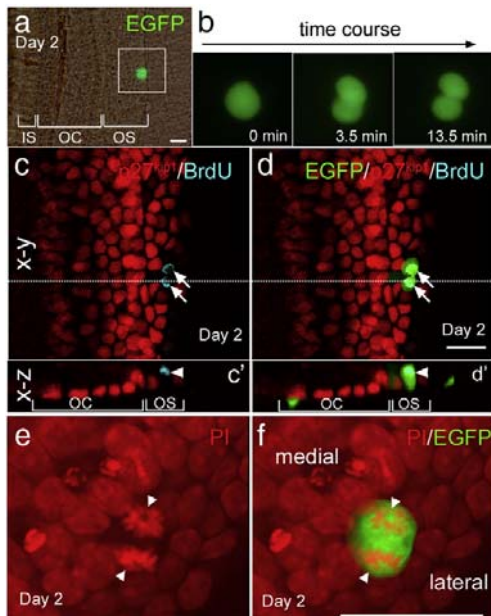
これまでに、Notch シグナルは内耳の発生において、有毛細胞と支持細胞との運命決定に関わるとの報告があったが、各リガンドや受容体のノックアウトマウスがそれぞれ異なる表現型を示すため、その機能が完全に解明されてはいなかった。そこで、Canonical な Notch シグナルを完全にブロックできる Notch の Co-transcriptional factor である Rbpj の内耳特異的コンディショナルノックアウトマウスを用いて内耳の形態や細胞機能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) p27Kip1 の生後蝸牛における役割

生後マウス蝸牛において、RNAi を用いて p27Kip1 の Silencing を行った結果、生後は増殖することのないとされてきた支持細胞の一部で増殖を確認することができた (図 1)。ただし、増殖能を獲得した支持細胞はプログラム細胞死を起こしやすかった。これらの結果は、p27Kip1 のサイレンシングは本来の増殖能のない生後哺乳類の蝸牛支持細胞を増殖させ、内耳感覚上皮の再生に応用する可能性のある方法であることを示唆している。

図 1



(2) HGF 投与による内耳保護効果の検討

まず、音響外傷をおこした成体モルモットにあらかじめ、HGF を投与した群では、投与しなかった群と比べて聴力がよく保存された。また、組織学的に残存有毛細胞数を数え

たところ、HGF 投与群で有意に残存有毛細胞数は多かった (図 2)。

図 2

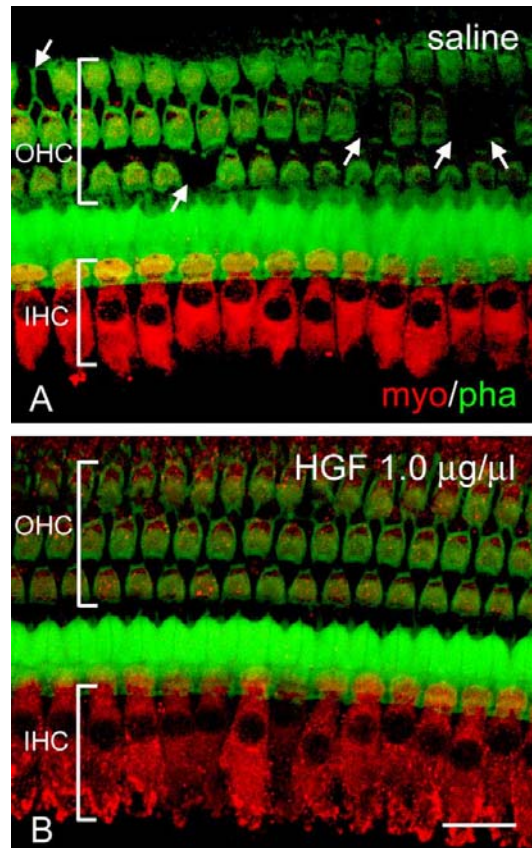
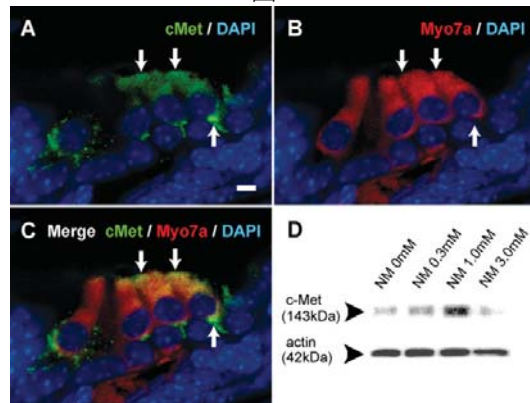


図 3



次に、生後マウスの蝸牛器官培養にアミノ配糖体を加えて有毛細胞を傷害するモデルにおいて HGF を用いると、音響外傷と同様、HGF 投与群では有意に残存した有毛細胞数が多かった。本実験では、アミノ配糖体を投与した際には、HGF の受容体である c-MET の発現が有毛細胞において亢進していることが確認できたため (図 3)、HGF が有毛細胞に直接働いてなんらかの保護効果をもたらしていると考えられた。また、HGF 投与群では酸化ストレスの指標である HNE の産生が減少し



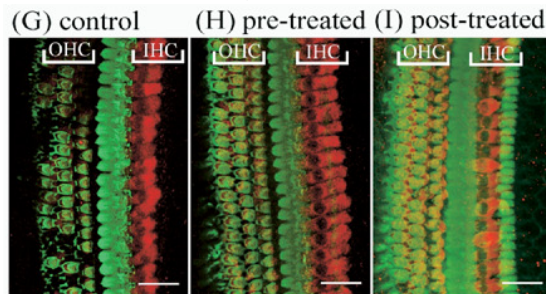
ていたため、HGFは酸化ストレスを軽減させることによりアミノ配糖体による有毛細胞障害を抑制していると考えられた。

これらの結果は、HGFが内耳障害治療の有効な物質となりうることを示唆している。

### (3) EP4 アゴニストによる内耳音響外傷治療とそのメカニズム

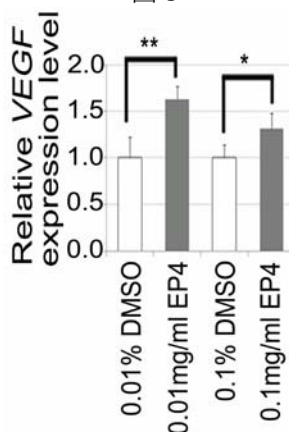
まず、EP4 アゴニストの内耳障害への効果を見るために、成体モルモットに音響外傷を与えたところ、EP4 アゴニストは、傷害前に投与しても、傷害後に投与しても有意に聴力の回復がコントロール群に比べて認められた。また、残存有毛細胞数もEP4 アゴニスト投与群では有意にコントロール群よりも多かった(図4)。EP4 受容体は、蝸牛内では有毛細胞、支持細胞、血管条、らせん神経節細胞に発現を認めた。

図4



次に、EP4 受容体を介した有毛細胞保護効果のメカニズムを解明するため、その下流に有るといわれる VEGF の発現量を蝸牛内で測定したところ、mRNA レベルでもたんぱく質レベルでも、EP4 アゴニスト投与群のほうが VEGF の発現が蝸牛内において亢進していた(図5)。

図5



また、VEGF 受容体の発現が蝸牛内の有毛細胞、支持細胞などで認められたことから、VEGFが蝸牛内で作用するEP4受容体のエフェクターであることが示唆された。

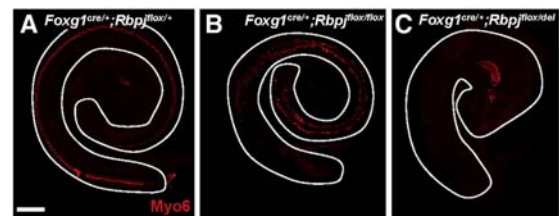
これらの結果から、EP4 アゴニストは、従来内耳障害の治療に使われていた PGE1 に代

わりうる内耳障害治療薬であることが確認された。

### (4) Notch シグナルの内耳発生におけるあらたな役割の検証

内耳内の Rbpj 欠失により、内耳内の有毛細胞と支持細胞の数が減少した(図6)。Rbpj コンディショナルノックアウトマウス蝸牛の感覚上皮の増殖能はコントロールマウスと変わりなかったが、ノックアウトマウスでは細胞死が亢進しており、また分化のタイミングがコントロールマウスに比べて早まっていた。このことから、Notch シグナルは内耳において、感覚上皮前駆細胞の分化タイミングを制御し、またそれらの細胞の維持を行っていることが解明された。この知見を用いて、Notch シグナルの操作による内耳感覚上皮の再生を行う予定である。

図6



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計39件)

- ① Yamamoto N, Chang W, Kelley MW. Rbpj regulates development of prosensory cells in the mammalian inner ear. 査読有, *Dev Biol.* (2011) Epub Mar 21.
- ② Hori R, Nakagawa T, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ito J. Role of prostaglandin E receptor subtypes EP2 and EP4 in autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor in the inner ear. 査読有, *BMC Neurosci.* 11 (2010) 35
- ③ Inaoka T, Nakagawa T, Kikkawa YS, Tabata Y, Ono K, Yoshida M, Tsubouchi H, Ido A, Ito J. Local application of hepatocyte growth factor using gelatin hydrogels attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 査読有, 129 (2009) 453-457
- ④ Kikkawa YS, Nakagawa T, Tsubouchi H, Ido A, Inaoka T, Ono K, Ito J. Hepatocyte growth factor protects auditory hair cells from

- aminoglycosides., 査読有,  
Laryngoscope 119 (2009) 2027-2031
- ⑤ Hori R, Nakagawa T, Sugimoto Y, Sakamoto T, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ito J. Prostaglandin E receptor subtype EP4 agonist protects cochleae against noise-induced trauma. 査読有, Neuroscience. 160 (2009) 813-819
- ⑥ Ono K, Nakagawa T, Kojima K, Matsumoto M, Kawauchi T, Hoshino M, Ito J. Silencing p27 reverses post-mitotic state of supporting cells in neonatal mouse cochleae. 査読有, Mol Cell Neurosci. 42 (2009) 391-398

[学会発表] (計 9 4 件)

- ① Ito J. Regeneration therapy for the inner ear diseases. AAO-HNS 2010 Annual Meeting & OTO EXPO. Sep 28, 2010, USA
- ② Ito J. Regeneration medicine for inner ear diseases. XVth Anniversary Symposium in Audiological Medicine. Sep 21, 2010. Poland
- ③ Ito J. Development of a novel therapeutic method for sensorineural hearing loss. CORLAS Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum 2010. Aug 23-24, 2010, Hungary
- ④ Ito J. Instruction Courses: Regeneration Therapy for the Inner Ear Diseases. AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO. Sep 26-29, 2009. USA
- ⑤ Ito J. Symposia : Translational science - Regeneration of Cochlear. 'Cell Therapy for Inner Ear Diseases.' 27th Politzer Society Meeting. Sep 3-5, 2009. UK
- ⑥ Ito J. Keynote Lecture: Research Forum: Stem cells and Genetic therapy for Hair Cell related Hearing Loss. 3rd International Congress on Rhinology, Otolaryngology & Skull Base Surgery - Current Concepts. May 7-10, 2009, Greece.
- ⑦ Hamaguchi K, Nakagawa T, Hori R, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J. Prostaglandin E Receptor Agonists Stimulate Production of Vascular Endothelial Growth Factor in the Mouse Cochlea 32nd Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. Feb. 15th-18th, 2009, USA
- ⑧ Yamamoto N, Chang W, Kelley MW. Notch Signaling Specifies Prosensory Regions in the Inner Ear. 32nd Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. Feb.

15th-18th, 2009, USA

- ⑨ Ono K, Nakagawa T, Kojima K, Matsumoto M, Kawauchi T, Hoshino M, Ito J. RNA interference targeting p27 can induce cell cycle re-entry followed by mitosis in mammalian cochlear supporting cells. 45th Inner Ear Biology Workshop, Sep 21-24, 2008 Italy
- ⑩ Nakagawa T, Ono K, Kojima K, Matsumoto M, Kawauchi T, Ito J. RNA interference of p27kip1 induces proliferation of post-mitotic supporting cells in mouse auditory epithelia. Conference on Cell Replacement in the Inner Ear. June 13-15, 2008, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 壽一 (Ito Juichi)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90176339

### (2) 研究分担者

中川 隆之 (Nakagawa Takayuki)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：50335270

平海 晴一 (Hiraumi Harukazu)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：10374167

山本 典生 (Yamamoto Norio)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70378644

坂本 達則 (Sakamoto Tatsunori)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60425626

小島 憲 (Kojima Ken)  
京都大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号：60378731

田浦 晶子 (Taura Akiko)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70515345

北尻 真一郎 (Kitajiri Shinichiro)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00532970