

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19599011
研究課題名 (和文) 肝細胞増殖因子 (HGF)・徐放ハイドロゲルを用いた内耳障害の低侵襲 高度選択的治療に関する研究
研究課題名 (英文) A research on low-traumatic, highly selective inner ear therapy using Hepatocyte growth factor (HGF) and sustained release hydrogels
研究代表者 吉川 弥生 (KIKKAWA YAYOI) 京都大学・医学研究科・客員研究員 研究者番号：00452350

## 研究成果の概要：

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor:HGF) は、中村らにより精製・クローニングされた多彩な機能をもつ増殖因子である。本研究では HGF の再生能力をより強力に発揮させるための再生医療技術として、徐放技術を用いたドラッグデリバリーシステム (DDS: drug delivery system) を採用することとした。DDS は体内に投与した HGF が時間をかけて徐々に放出されるようにデザインされたもので、徐放化にはゼラチンハイドロゲルを用いる。本研究ではこのゲルを蝸牛正円窓から作用させることで、内耳有毛細胞に対する低侵襲・高度選択的な HGF 投与を実現した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

## 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：HGF (肝細胞増殖因子)、内耳再生、DDS (ドラッグ・デリバリー・システム)

## 1. 研究開始当初の背景

## ① 感音難聴と再生医療の必要性

ヒトのコミュニケーションの2割以上は聴覚に依存している。にもかかわらず、成人人口の13%は老人性難聴や騒音性

難聴などの感音難聴に苦しんでいる。

## ② HGF の生理活性と内耳

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor:HGF) は、初め肝細胞増殖の本体として中村らにより精製・クローニング

された日本オリジナルな増殖因子である。HGFは、その発見の発端となった強力な増殖促進活性に加え、血管新生や器官形成促進作用など多彩な機能をもつ**天然の生体修復因子**である。さらにその後の研究でHGFは肝臓以外にも心臓、腎臓、肺、骨、さらには脳・脊髄といった神経系でも機能することが明らかとなってきた。

### ③ 徐放水素ゲルによるDDS (ドラッグ・デリバリー・システム)

以上の経緯をふまえ、本研究ではHGFの再生能力をより強力に発揮させるための医療技術として、徐放技術を用いたドラッグデリバリーシステム (DDS: drug delivery system) を採用することとした。DDSは体内に投与したHGFが時間をかけて徐々に放出されるようにデザインされたもので、徐放化には京都大学再生医科学研究所、田畑泰彦教授の協力のもと、ゼラチン・水素ゲルを用いる。この水素ゲルはコラーゲンとグルタ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り、重合するグルタルアルデヒドの濃度により体内での分解速度を自在に制御可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、強力な生体修復作用を持つ肝細胞増殖因子(HGF)を徐放性水素ゲルを用いて内耳蝸牛窓から作用させ、騒音や薬剤、加齢などで傷害された内耳細胞を再生し、感音難聴を改善することである。具体的には、上で述べたゼラチン・水素ゲルを蝸牛正円窓から作用させることで、内耳有毛細胞に対する低侵襲・高度選択的なHGF投与を実現する。

## 3. 研究の方法

### ① *in vitro* 実験 - HGF 効果発現のメカニズム

#### ・傷害耳でのHGF、c-METの発現パターン

内耳傷害時にどの部位にどのタイミングでHGFおよびその受容体c-METが発現するかはHGF投与治療を計画する際の最も基本的な情報となるので、これを

計測する。(胎生ラット内耳では、HGFは支持細胞、c-METは有毛細胞に発現する。図) 計測方法としては、マウス内耳器官培養系(当教室にすでに確立されている)を用い、生後10日齢マウスの蝸牛コルチ器を培養し、アミノグリコシド系薬剤を培養液中に添加することで有毛細胞傷害を起こす。次にwhole-mount

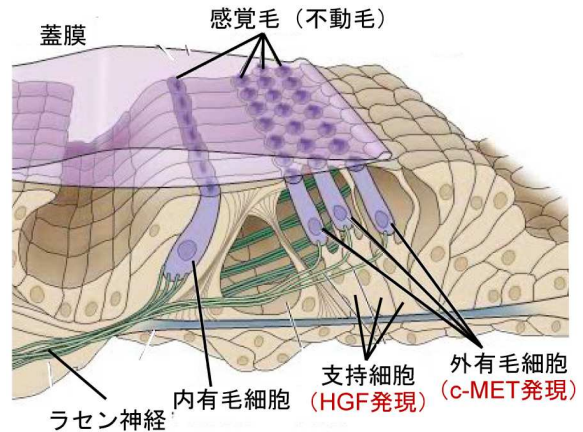


図 蝸牛コルチ器の解剖

免疫染色、*in situ* hybridization (ISH) を行いHGF、c-METの発現時期、部位、量を詳細に測定し、支持細胞と有毛細胞の間の相互作用を明らかにする。

#### ・HGF投与実験

薬剤傷害した培養内耳に種々の濃度でHGFを投与し、ファロイジン (F-アクチン) 染色で有毛細胞再生を確認する。その際、前項で得られたc-MET受容体の発現データに沿って投与タイミングを調整する。

#### ・マーカータンパク染色によるHGF作用機序の解明

Whole-mount免疫染色を用い、有毛細胞のマーカーであるMyosin VIIa、感覚毛のマーカーであるファロイジン等がHGF投与後どのように変化するか観測する。

### ② *in vivo* 実験

#### ・騒音難聴・薬剤難聴モデルの開発

モルモットおよびマウスを使い、騒音曝露による難聴モデル動物を作製する。具体的には対象動物を音響箱内で固定し、115デシベルで2-6時間ホワイトノイズ曝露した場合の有毛細胞損傷を顕微鏡で確認する。同時に聴覚機能を聴性脳幹

反応 (ABR) にて評価する。モルモットについては *in vitro* 実験系と同様のアミノグリコシド系薬剤静脈投与による難聴モデルも用意する。

・モルモットへの HGF 投与、蝸牛内への移行計測

実験 2 の結果から数種の徐放動態を持つ HGF—ハイドロゲルを選び、モルモットへの投与を行う。騒音傷害したハートレー系モルモット (10-12 週齢、350g 前後) をイソフルレン吸入にて麻酔したのち、両側の耳包を解放し、片側の正円窓小窩に 0.1ml の HGF—ハイドロゲルを注入する。1d、2d、1w、2w 後に ABR (聴性脳幹反応) を測定し、3w 後に両側蝸牛を摘出。組織学的解析を行う。実験結果により HGF—ハイドロゲルの徐放効果と至適濃度を検討する。本実験は将来的にヒト臨床試験を申請する際の基礎データとなる。

・組織学的解析

一般に HGF は正常組織の過形成は起こさないと考えられているが、傷害後に HGF 投与を行った側頭骨を摘出、パラフィン包埋 HE 染色などを用いて組織病理学的に炎症や異物反応、過形成がないか確認する。また、再生した感覚毛の形態確認のため走査電子顕微鏡で撮影を行う。

4. 研究成果

① *in vitro* 実験 - HGF 効果発現のメカニズム

・障害後 HGF 投与

マウス内耳器官培養系を用いて、有毛細胞傷害後に HGF 投与を行った。Whole-mount 法ののち免疫染色・ファロイジン染色により有毛細胞残存数を計測し、HGF の効果を測定した。HGF はネオマイシン障害内耳に対して保護作用を有し、最適濃度は 20ng/ml と微量であることが確認できた。同時に障害内耳での HGF および受容体 c-MET の発現量および時期的なパターンを、Western blotting 法により測定した。

・マーカータンパクの発現計測による支

持細胞-有毛細胞間相互作用の解明

Whole-mount 免疫染色を行い、HGF 受容体が内耳のどの部分に発現しているかを測定した。

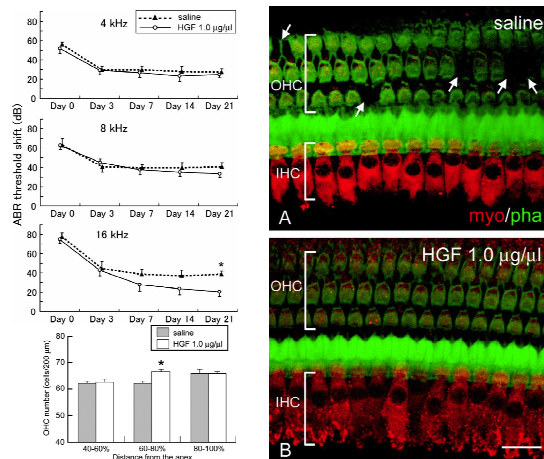
② *in vivo* 実験

・騒音難聴・薬剤難聴モデルの開発

モルモットを使い、騒音曝露による難聴モデルを作製した。4kHz オクターヴ・バンドノイズ (音圧 120 dB SPL)、3 時間にて騒音傷害する方式が threshold shift 60-80dB となり最適であることが判明した。

・HGF の障害モデル動物への投与

器官培養実験の結果を元に、上記のモデルを使って HGF—ハイドロゲルの音響外傷モルモットへの投与を行った。騒音障害したハートレー系モルモット (10-12 週齢、350g 前後) をキシラジン筋注にて麻酔したのち、両側の耳包を解放し、片側の正円窓小窩に 20μl の HGF—ハイドロゲルを注入した。3 日、1 週、2 週、3 週後の時点で ABR (聴性脳幹反応) を測定し、両側蝸牛を摘出。組織解析を行った。コントロールとして、20μl の生理食塩水—ハイドロゲルを挿入した。その結果、HGF が有意に騒音障害後の聴力低下を抑制すること、また有毛細胞損傷を有意に防止することが明らかになった (下図)。また、明らかな組織の過形成は認められなかった。



## 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4件)

1. Kikkawa YS, Nakagawa T, Tsubouchi H, Ido A, Inaoka T, Ono K, Ito J. Local application of hepatocyte growth factor using gelatin hydrogels attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. Laryngoscope, 2009 in print、査読有
2. 中川隆之、吉川弥生、伊藤壽一. 内耳性難聴：新しい治療法開発への展望. 実験医学 25. 3052-5057, 2007, 査読無
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 129, 453-457, 2009、査読有
4. 吉川弥生、伊藤壽一. 内耳感覚細胞の再生医療、総合臨牀 58 112-117, 2009. 査読無

[学会発表] (計3件)

1. Takatoshi INAOKA, Yayoi S. KIKKAWA, Takayuki NAKAGAWA, Yasuhiko TABATA, Hirohito TSUBOUCHI, Akio IDO, Ryusuke HORI, Kazuya ONO, Juichi ITO. THE POTENTIAL OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR (HGF) FOR PROTECTION OF COCHLEAR HAIR CELLS. 31st ARO Midwinter Meeting, 2008. 2. 18-2. 21, Phoenix, Arizona
2. INAOKA T, KIKKAWA Y, NAKAGAWA T, TABATA Y, TSUBOUCHI H, IDO A, HORI R, ONO K, ITO J. Protection of the Cochlear Hair Cells by Hepatocyte Growth Factor (HGF). 25th meeting of Bárány society. 2008. 3. 31-4. 3, Kyoto
3. 稲岡孝敏、吉川弥生、中川隆之、堀龍介、小野和也、伊藤壽一. 肝細胞増殖因子 (HGF) による内耳有毛細胞保護効果の検討. 第109回日本耳鼻咽喉科学会, 2008. 5. 15-17. 大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川 弥生 (KIKKAWA YAYOI)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00452350