

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592545

研究課題名(和文)人工内耳成績改善と適応拡大のためのトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文)Tranlational research for the improved outcome and the broader indication of the cochlear implantation

研究代表者

山本 典生 (Yamamoto, Norio)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70378644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：1. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)が蝸牛有毛細胞障害に対して、有毛細胞のプロテグラム細胞死の減少と支持細胞の増殖を起こして、予防・回復効果をもたらすことを見出した。その下流分子としてGap43とNetrin1を同定し、Netrin1にもIGF-1と同様の効果があることを確認した。

2. 細胞骨格を構成するタンパク質Septin7の内耳におけるコンディショナルノックアウトマウスの解析を行い、このマウスの内耳に奇形があるが、有毛細胞などの感覚上皮は形成されていることが判明した。また、聴神経は形成されている感覚上皮に向けて分布していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1. We found that Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) protects cochlear hair cells from injury through the inhibition of hair-cell apoptosis and supporting-cell proliferation. We identified Gap43 and Netrin1 as effector molecules of IGF-1 by performing comprehensive analysis of the gene expression within the cochlea. Among these two molecules, Netrin1 had similar effects with IGF-1 on injured cochlear hair cells.

2. Septin7 constitutes the cytoskeleton and exerts various functions. We analyzed the phenotypes of Septin7 knockout mice. The inner ears of the mice had severe hypomorphic malformation. However, sensory epithelium developed within the inner ear and the epithelium was innervated by the auditory nerve. The proliferation of the mutant inner ear was normal although apoptosis was promoted.

研究分野：耳科学

キーワード：再生医学 人工内耳 IGF-1 Septin

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴や薬剤性難聴、多くの先天性難聴を引き起こす感音難聴のほとんどは、蝸牛内で音の受容を司る有毛細胞やそれを支える支持細胞が存在する内耳感覚上皮が傷害されることによって引き起こされる。哺乳類の感覚上皮細胞は生後の傷害後に再生することがなく、感音難聴の根本的治療法は確立されていない。

このような感音難聴のうち、高度なものに対して有効な治療方法が人工内耳である。人工内耳は、機能を喪失した蝸牛に電極を埋め込み、音刺激を機械で電気信号に変換した上で残存している聴神経を電極で刺激し音情報を聴覚中枢に伝えるシステムである。臨床応用されて、30年が経過し、最も成功した埋め込み型医療機器のひとつといえ、申請者の施設でも450例近くの人工内耳埋め込み術が施行され、高度感音難聴の患者には大きな福音となっている。しかし、現在の人工内耳はすべての感音難聴患者に満足いくものではない。人工内耳の現在の問題点としてあげられているのは、

1. 長期の失聴期間による成績不良（主に成人）
2. 内耳奇形による成績不良（主に乳幼児）
3. 人工内耳適応の制限
4. 音高の弁別の制限

である。これらの点を克服することができれば、人工内耳の成績向上および適応拡大により、より多くの感音難聴患者が聴こえや言語を獲得することができるようになるはずである。

長期失聴による成績不良の原因としては中枢の聴皮質の機能低下とともに、らせん神経節細胞（聴神経）の減少も関与すると言われており、また内耳奇形による成績不良の原因としては、内耳の形態の異常により聴神経の分布が通常と異なり、人工内耳電極による刺激を有効に行えないことがあげられるが、これらを解決するための方法はいまだ実用化されていない。

人工内耳手術は、蝸牛に開窓し電極をいれるという破壊的な操作が伴うため、適応が蝸牛の機能が完全に消失した高度難聴に限られ、低音部分に聴力の残っている（残聴のある）難聴の場合、現在日本では人工内耳手術の適応とならない。最近、欧米では **Electrical Acoustic Stimulation (EAS)** と称して、残聴のある周波数は蝸牛の音刺激で、ない部分は人工内耳を用いて聴神経の電気刺激で聴覚を獲得しようとする試みがあるが、この場合、蝸牛内の残聴部分を破壊せずに人工内耳の挿入を行う必要がある。電極の改良や手術手技の改良により、術後残聴がある確率は高率になってきているが、完全に術前と同様の残聴がある確率はいまだに最高でも50%程度である。また、低音に残聴が有る場合、

補聴器単独による補聴効果が充分でなくても、人工内耳の効果が高まれば、声の音高の認識が高まり、対話者以外の声が存在する場合の聞き取りが向上すると報告されている。残聴を可能な限り保護するため、電極、手術手技以外に、現在のところ内耳感覚上皮保護のため、ステロイドホルモンが用いられているのみである。

2. 研究の目的

本研究では、人工内耳成績不良症例の成績改善と人工内耳の適応拡大をはかるため、予後不良因子の解明と手術時の残存蝸牛有毛細胞の保護手法を含む解決手段を開発することを目標とする。具体的には、以下の2つの課題の解決を目的とした。

(1) 蝸牛神経と蝸牛有毛細胞の保護および再生

人工内耳成績改善のため、蝸牛神経の変性防止および人工内耳の低侵襲手術に必要な有毛細胞保護を実現する方法として、薬剤徐放ゲルに包埋した既知または新規の神経細胞活性化物質、有毛細胞保護物質や神経分化誘導後幹細胞を用いて人工内耳成績の向上と手術の低侵襲化をはかる。

(2) 奇形における聴神経解剖および遺伝子変異の解明

特定の内耳奇形症例での問題点のひとつは、蝸牛神経の分布が不明であることにある。内耳奇形における蝸牛神経の分布を同定するため、内耳奇形を呈する遺伝子改変動物、あるいはヒトの内耳奇形症例の遺伝子異常を同定し作成した遺伝子改変動物の蝸牛神経の蝸牛内分布を検討する。

3. 研究の方法

(1) 蝸牛有毛細胞や蝸牛神経を保護・再生する物質として Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) に注目して研究を進めた。生後マウス蝸牛器官培養を用いて、有毛細胞を傷害するアミノグリコシドを投与して薬剤の効果を観察する系が実験の主体である。アミノグリコシドによる有毛細胞傷害に対する IGF-1 の効果の有無の検討、その効果発現の細胞メカニズムの解明（プログラム細胞死、増殖の有無の観察、下流で活性化されるシグナル経路の検定）を行った。さらに、器官培養のサンプルを用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析も行い、IGF-1 の下流で発現が増加する遺伝子の探索も行った。

(2) 内耳奇形における聴神経の内耳内での分布を検討するために、まず内耳奇形を起こすモデル動物の探索を行った。その候補の一つとして、細胞質分裂や細胞の

極性を決める役割などが報告されている細胞骨格を構成するタンパク質 Septin7 の内耳内での分布を検討したのち、Septin7 の内耳特異的コンディショナルノックアウトマウスの内耳形態の観察、細胞の増殖、細胞死の検討などを行った。また、神経系において細胞運命決定に関わる basic helix loop helix 遺伝子の一つ Olig ファミリーの内耳における発現パターンについても検討した。

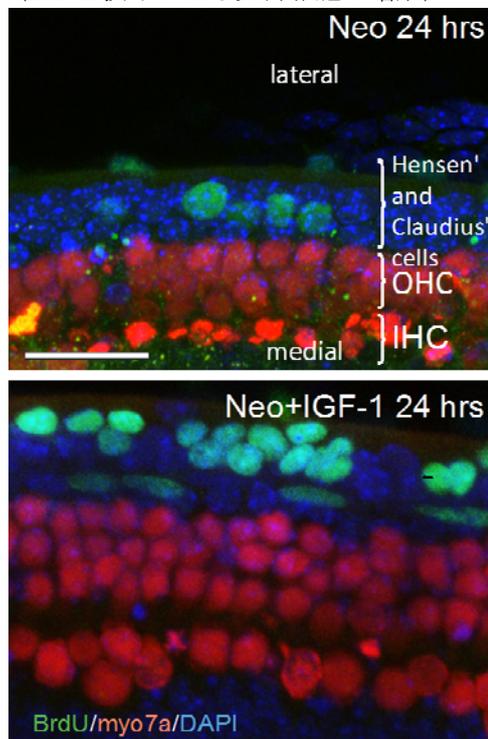
また、次世代シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子解析を行い、内耳奇形の原因遺伝子を同定するために、人工内耳手術を行った患者のうち、内耳奇形をもつ患者及びその家族より血液を採取し、DNA を精製した。

4. 研究成果

- (1) IGF-1 は、アミノグリコシドによる内耳有毛細胞傷害から有毛細胞を保護することがわかった。蝸牛には内毛細胞と外毛細胞があるが、両者ともに保護される。

その細胞学的な機序としては、有毛細胞のプログラム細胞死の防止と支持細胞の増殖があることが分かった。特に支持細胞の増殖が関与していたことは、従来生後マウスでは感覚上皮は増殖しないとされていたため、大きな発見であった。(図1)

図1 (IGF-1 投与による支持細胞の増殖)



IGF-1 受容体が IGF-1 結合時に活性化する下流のシグナル経路は MEK/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の 2 つが主なものであるが、内耳有毛細胞の保護作用では 2 つの経路共に関与することが分かった。ただし、Akt は内毛細胞の保護の際のみ活性化される。以上の成果は下記主な発表論文の⑨にて公表した。

IGF-1 の下流で有毛細胞保護作用の際に発現が増加する遺伝子は、マイクロアレイと定量的 RT-PCR の結果から、Netrin1 と Gap43 であることが証明された。これらの遺伝子は IGF-1 投与後 3 時間で最も発現量の増加が認められる。また、その増加は MEK/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の両方に依存する。これらの成果は下記主な発表論文の⑤で公表した。

これらの結果は、残存聴力活用型事項内耳 (EAS) において内耳有毛細胞の保護が必要な際に、ステロイド以外に IGF-1 が有用な薬剤の候補であることを示唆している。

- (2) Septin7 は発生初期の内耳 (マウスでは胎生 9 日から) に発現し (下記主な発表論文⑩)、内耳の発生に役割を果たすことが予測された。Septin7 の内耳特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、内耳の形態の高度の低形成が観察された (図 2 上段。下段はコントロールマウスの内耳)。

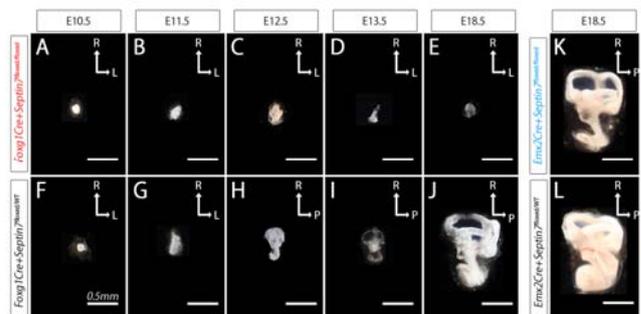
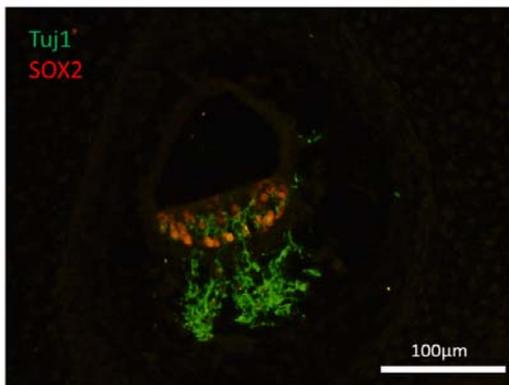


図2 (Septin7 ノックアウトマウスとコントロールマウスの内耳の形態)

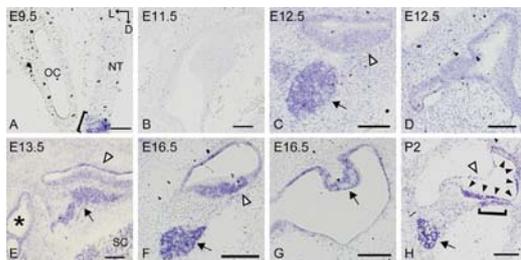
すなわち、内耳奇形の動物モデルを得ることができたわけであるが、このマウスの低形成の内耳内には感覚上皮は形成されており、感覚上皮には神経支配も認められた。このことは、臨床において高度の内耳奇形の際も人工内耳は有効であることを示唆するものである (図3)。

図3 (Septin7 ノックアウトマウスの内耳感覚上皮)



OligファミリーはOlig1、Olig2、Olig3からなるが、Olig1は発生初期の耳胞と呼ばれる内耳の原基の腹側に発現するが、後期には発現しなくなり、Olig2は発生途上の内耳の聴神経節にのみ発現、Olig3は発生後期から生後まで内耳内の上皮全体に発現する(図4)ことが分かった。この結果から、Oligファミリーも内耳の発生に重要な役割を果たすことが示唆され、これらの遺伝子のノックアウトマウスも内耳奇形を起こす可能性が示唆される。これらの成果は主な発表論文①にて公表した。

図4 (Olig3の発現パターン)



内耳奇形患者及びその家族のDNAの収集は11家族分が完了した。これらの解析は今後行う予定である。

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18件)

- ① Kanaya E., Yamahara K., Okano T., Yoshida A., Katsuno T., Takebayashi H., Ito J., and Yamamoto N.: Expression of the Olig gene family in the developing mouse inner ear. *Gene Expr Patterns* 17: 79-86, 2015. doi: 10.1016/j.gep.2015.03.001. 査読有
- ② Yamamoto N., Nakagawa T., and Ito J.: Application of insulin-like growth factor-1 in the treatment of inner ear disorders. *Front Pharmacol* 5: 208, 2014. doi: 10.3389/fphar.2014.00208. 査読有

- ③ Tona Y., Hamaguchi K., Ishikawa M., Miyoshi T., Yamamoto N., Yamahara K., Ito J., and Nakagawa T.: Therapeutic potential of a gamma-secretase inhibitor for hearing restoration in a guinea pig model with noise-induced hearing loss. *BMC Neurosci* 15: 66, 2014. doi: 10.1186/1471-2202-15-66. 査読有
- ④ Nakagawa T., Kumakawa K., Usami S., Hato N., Tabuchi K., Takahashi M., Fujiwara K., Sasaki A., Komune S., Sakamoto T., Hiraumi H., Yamamoto N., Tanaka S., Tada H., Yamamoto M., Yonezawa A., Ito-Ihara T., Ikeda T., Shimizu A., Tabata Y., and Ito J.: A randomized controlled clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment. *BMC Med* 12: 219, 2014. doi: 10.1186/s12916-014-0219-x. 査読有
- ⑤ Hayashi Y., Yamamoto N., Nakagawa T., and Ito J.: Insulin-like growth factor 1 induces the transcription of Gap43 and Ntn1 during hair cell protection in the neonatal murine cochlea. *Neurosci Lett* 560: 7-11, 2014. doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.062. 査読有
- ⑥ Toritsuka M., Kimoto S., Muraki K., Landek-Salgado M. A., Yoshida A., Yamamoto N., Horiuchi Y., Hiyama H., Tajinda K., Keni N., Illingworth E., Iwamoto T., Kishimoto T., Sawa A., and Tanigaki K.: Deficits in microRNA-mediated Cxcr4/Cxcl12 signaling in neurodevelopmental deficits in a 22q11 deletion syndrome mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 17552-17557, 2013. doi: 10.1073/pnas.1312661110. 査読有
- ⑦ Lou X. X., Nakagawa T., Nishimura K., Ohnishi H., Yamamoto N., Sakamoto T., and Ito J.: Reprogramming of mouse cochlear cells by transcription factors to generate induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* 15: 514-519, 2013. doi: 10.1089/cell.2013.0020. 査読有
- ⑧ Hori R., Nakagawa T., Yamamoto N., Hamaguchi K., and Ito J.: Prostaglandin E receptor subtype EP4 agonist serves better to protect cochlea than prostaglandin E1. *Auris Nasus Larynx* 40: 539-542, 2013. doi: 10.1016/j.anl.2013.05.003. 査読有
- ⑨ Hayashi Y., Yamamoto N., Nakagawa T., and Ito J.: Insulin-like growth factor 1 inhibits hair cell apoptosis and

promotes the cell cycle of supporting cells by activating different downstream cascades after pharmacological hair cell injury in neonatal mice. *Mol Cell Neurosci* 56: 29-38, 2013. doi:

- 10.1016/j.mcn.2013.03.003. 査読有
- ⑩ Yoshida A., Yamamoto N., Kinoshita M., Hiroi N., Hiramoto T., Kang G., Trimble W. S., Tanigaki K., Nakagawa T., and Ito J.: Localization of septin proteins in the mouse cochlea. *Hear Res* 289: 40-51, 2012. doi: 10.1016/j.heares.2012.04.015. 査読有
- ⑪ Taniguchi M., Yamamoto N., Nakagawa T., Ogino E., and Ito J.: Identification of tympanic border cells as slow-cycling cells in the cochlea. *PLoS One* 7: e48544, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0048544. 査読有
- ⑫ Nakagawa T., Ogino-Nishimura E., Hiraumi H., Sakamoto T., Yamamoto N., and Ito J.: Audiometric outcomes of topical IGF1 treatment for sudden deafness refractory to systemic steroids. *Otol Neurotol* 33: 941-946, 2012. doi: 10.1097/MAO.0b013e31825f251a. 査読有
- ⑬ Eiamprapai P., Yamamoto N., Hiraumi H., Ogino-Nishimura E., Kitamura M., Hirano S., and Ito J.: Effect of cisplatin on distortion product otoacoustic emissions in Japanese patients. *Laryngoscope* 122: 1392-1396, 2012. doi: 10.1002/lary.23336. 査読有

〔学会発表〕(計30件)

- ① 山本 典生. 再生医療から見た音声言語医学の未来 人工内耳と再生医療. 第59回日本音声言語医学会総会・学術講演会. 10月8日~10月9日. 2014. 福岡
- ② 山本典生. 人工内耳について. 人工内耳相談会 in 亀岡市. 2月3日. 2014. 亀岡市
- ③ 山本 典生 他. Septinの内耳発生における役割. 第24回日本耳科学会総会・学術講演会. 10月15日~10月18日. 2014. 新潟
- ④ 山本 典生 他. 難治性感覚器疾患をターゲットとした創薬への挑戦 IGF-1による内耳有毛細胞保護メカニズムの解明. 日本薬学会第134回年会. 3月27日~3月30日. 2014. 熊本
- ⑤ 山本 典生 他. 聴覚成熟期における内耳のアクアポリン発現量の変化. 第115回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会.

5月14日~5月17日. 2014. 福岡

- ⑥ 山本 典生. 小児人工内耳新適応基準における人工内耳手術について. 第24回日本耳科学会総会・学術講演会. 10月15日~18日. 2014.
- ⑦ Yamamoto N et al.. Septin7 contributes to the formation of the inner ear gross morphology. 51st Inner Ear Biology Workshop. Aug 30th - Sep 2nd. 2014. Sheffield, UK
- ⑧ Yamamoto N et al.. Slow-Cycling Cells in Tympanic Border Cells Mostly Distribute Beneath Organs of Corti. 37th Annual MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. February 22-26, 2014. 2014. San Diego, CA, USA
- ⑨ Yamamoto N N et al.. Estimation of the cochlear duct length for MED-EL standard electrode arrays. 13th International Conference on Cochlear Implants and Other Implantable Auditory Technologies. June 18th - 21st. 2014. Munich, Germany
- ⑩ Yamamoto N N et al.. Estimation of the cochlear duct length for MED-EL standard electrode arrays. 15th Korea Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck surgery. April 3rd - 5th. 2014. Seoul, Korea
- ⑪ 山本典生. 聴覚再生医療の現状と未来. 人工内耳友の会[ACITA] 創立25周年記念大会(第26回懇談会). 6月14日. 2013. 東京都
- ⑫ 山本 典生 他. メドエル社製スタンダード電極人工内耳使用症例の蝸牛長の評価. 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 5月15日~18日. 2013. 札幌市
- ⑬ 山本 典生 他. 人工内耳体内装置マグネット脱出例. 第75回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会. 7月11日~12日. 2013. 神戸市
- ⑭ 山本 典生 他. 胎生および新生仔マウス蝸牛におけるセプチンタンパク質発現パターンの検討. 第23回日本耳科学会総会・学術講演会. 11月24日~26日. 2013. 宮崎市
- ⑮ Yamamoto N et al.. Identification of tympanic border cells as slow-cycling cells in the cochlea. The 50th Inner Ear Biology Workshop. Sep. 10th-13th. 2013. Alcalá de Henares, Madrid
- ⑯ Yamamoto N et al.. Mechanisms of Cochlear Hair Cell Protection by IGF-1. The 36th Annual MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. Feb. 16-20th, 2013. 2013. Baltimore, MD

- ⑰ Yamamoto N et al.. Identification of tympanic border cells as slow-cycling cells in the cochlea. 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness. June 22 - 25, 2013. 2013. Palo Alto, CA USA
- ⑱ Yamamoto N et al.. Septin Protein Expression in the Embryonic and Neonatal Mouse Cochlea. The Inner Ear Biology 2012 Workshop and Symposium. Sep 29-Oct 2. 2012. Tuebingen, Germany
- ⑲ Yamamoto N et al.. Septin Protein Expression in the Embryonic and Neonatal Mouse Cochlea. The Thirty-Fifth Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. Feb 25-29. 2012. San Diego, USA
- ⑳ Yamamoto N et al.. Mechanisms of mammalian cochlear hair cell protection by IGF-1. 12th International Conference on Cochlear Implants and Other Implantable Auditory Technologies. May 3-5. 2012. Baltimore, MD USA

〔図書〕(計 6件)

- ① Norio Yamamoto, Hair Cell. In: Juichi Ito ed. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer: 2014: 23-30. ISBN-13: 978-4431548614
- ② Norio Yamamoto, Development and regeneration. In: Juichi Ito ed. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer: 2014: 83-90. ISBN-13: 978-4431548614
- ③ Norio Yamamoto, Regenerative medicine in cochlear implantation. In: Juichi Ito ed. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer: 2014: 149-157. ISBN-13: 978-4431548614
- ④ Norio Yamamoto, Transdiffeentiation. In: Juichi Ito ed. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer: 2014: 199-209. ISBN-13: 978-4431548614
- ⑤ Koji Nishimura and Norio Yamamoto, SGN development. In: Juichi Ito ed. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer: 2014: 247-255. ISBN-13: 978-4431548614
- ⑥ Mirei Taniguchi and Norio Yamamoto, Inner ear stem cells. In: Juichi Ito ed. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer: 2014: 281-287. ISBN-13: 978-4431548614

山本 典生 (Norio Yamamoto)
 京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
 研究者番号：70378644

(2) 研究分担者

平海 晴一 (Harukiazazu Hiraumi)
 岩手医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師
 研究者番号：10374167

中川 隆之 (Takayuki Nakagawa)
 京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師
 研究者番号：50335270

坂本 達則 (Tatsunori Sakamoto)
 京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
 研究者番号：60425626

田浦 晶子 (Akiko Taura)
 京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
 研究者番号：70515345

6. 研究組織

(1) 研究代表者