

本リリースのカラー版をご希望の方は、  
下記担当者までご連絡ください。

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課  
広報担当 富田・吉野

Tel : 03-5363-3611 E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp



2013年1月10日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

## 蝸牛有毛細胞の再生による聴力の改善にマウスで成功

- 再生医療による内耳性感音難聴に対する新たな治療法に光明 -

音刺激を電気信号に変換する役割を果たす蝸牛有毛細胞(注1)は自発的に再生する能力を持たず、有毛細胞のダメージによる難聴は非可逆的で、残念ながら一度失われた聴力は改善しません。そのため、内耳性感音難聴にはかねてから再生医療が待ち望まれていました。

慶應義塾大学医学部の岡野栄之教授(生理学教室)らの研究グループは、米国ハーバード大学医学部(アルバート エッジ准教授)との共同研究で、手術による薬剤の内耳局所投与により、過大音曝露による難聴(注2)の後に蝸牛外有毛細胞を再生させ、聴力を改善させることに成功しました。

本研究で使用した薬剤は、個体発生で内耳有毛細胞への分化を細胞レベルで抑制する“Notch情報伝達系”(注3)の阻害剤で、*Cre/lox*系(注4)を用いた明快な実験系によって、有毛細胞に隣接し、より障害に強い“支持細胞”が薬剤によって有毛細胞に誘導されたことを、生体内で直接的に証明しました。この研究結果は、加齢によるものも含めると世界人口の1割以上が罹患する感音難聴(注5)に対する抜本的治療となり得るもので、内耳再生による難聴治療という次世代の治療法への臨床応用が期待されます。

本研究成果は2013年1月9日号の *Neuron* 誌に掲載されます。

### 1. 研究の背景

難聴は世界的に見ると最も大きな身体障害の原因で、人口の1割以上におよんでいると言われています(WHO, 2004)。この中でも「きこえ」のセンサーである蝸牛有毛細胞は、加齢や薬剤、音響曝露などさまざまな原因によって傷害を受けて難聴の原因となります。根本的原因として、この細胞には再生能がないため、胎生期に器官形成を終えた後では障害を受けても再獲得することはなく、したがって難聴はほとんど不可逆であるため、再生医療のよいターゲットと昔から言われてきました。

人為的に、ある特定の細胞を再生誘導させる一つの方法として、その細胞が作り出される発生時にみられるシグナル伝達=情報伝達系(注6)に注目する方法が頻用されています。内耳有毛細胞の発生においては隣接細胞間でのNotch情報伝達系が重要であることがかねてから知られていました。すなわち、有毛細胞になる素養を兼ね備えた細胞同士の間では、隣接細胞を有毛細胞にさせないようにこのシグナルを互いに送り合います。その結果、有毛細胞に隣接して支持細胞(注7)という別の細胞が分化誘導されることが、ショウジョウバエやマウスを使った実験からよく知られていました。

## 2．研究方法と成果・その意義

本研究は、胎生期において内耳有毛細胞への分化を細胞レベルで抑制する“Notch 情報伝達系”の阻害剤を手術的に局所投与することで、音響外傷後に蝸牛外有毛細胞数を増加させ聴力を改善することを示した、世界で最初の報告です。

小さな臓器である蝸牛に十分な濃度の薬剤を到達させることは技術的に困難を伴います。研究グループはまず Notch 情報伝達系を阻害する薬剤の候補を絞り込むことから始めました。有毛細胞が緑に光るマウス（注 8）の前庭（注 9）からニューロスフェア法（注 10）により、試験管内で殖やした幹細胞に対し、候補薬剤を加えて有毛細胞へ分化誘導させ、緑色に光る細胞数をカウントすることで、低濃度で高い誘導効率を持つ薬剤を選択しました。続いて有毛細胞のみでアポトーシスが生じる遺伝子改変動物（注 11）から取り出した蝸牛感覚上皮の器官培養に同薬剤を投与することで、有毛細胞数の回復と同時に、同程度の支持細胞の減少を確認しました。この結果は、隣接する支持細胞から新たな有毛細胞が作り出されていることを示唆するものでした。支持細胞は有毛細胞に隣接しますが、有毛細胞より障害に対して強い耐性を持っていることが知られており、傷害後の細胞のソースとしては最適です。そこで続いて音響外傷モデルマウス個体において手術的に正円窓（注 12）を經由して、薬剤を内耳に投与し効果を見ることにしました。音響外傷モデルは過大音曝露による難聴という点で実際の難聴症例にも類似しており、臨床における治療応用が近い利点がありますが、上部構造の障害を受けるのみで細胞死には至らない有毛細胞も生じるため、細胞数のカウントだけでは薬剤の効果を正確に評価できません。そこで *Cre/lox* 系を用いてあらかじめ支持細胞をラベルしておく方法（lineage tracing; 図 1）を採り、これにより、生きた動物で実際に、傷害を受ける前には支持細胞だった細胞が、傷害を受けてから薬剤を投与することで新たに有毛細胞に分化したことを証明しました（図 2）。最後に聴力と組織学的変化を検討したところ、音響外傷で最も障害される外有毛細胞の数が増え、薬剤非投与群と比べて難聴が軽減されていることが明らかになりました（図 3）。

以上のように、Notch 阻害剤の手術的な局所投与により、有毛細胞を再生させ聴力を改善することに成功しました。難聴に対する薬剤を用いた再生医療の、世界で最初の報告となります。

## 3．今後の展開

蝸牛はヒトでも太いところでおよそ 2mm 幅という極めて小さな臓器であり、また小部屋の中央に約 2 万の有毛細胞が 4 列に規則正しく整列する極めて精緻な構造をとっているため、細胞移植などの治療では手術手技そのもので構造が壊され機能が損なわれてしまうことが想定されています。今回の研究結果はこの根本的問題にひとつの解決法を提示するものでもあります。すなわち難聴治療においては、有毛細胞への分化誘導を体内で直接行うことがひとつのよい治療法となりうるということです。iPS 細胞経路ないし直接誘導（ダイレクト・インダクション）による特定の細胞への分化誘導が次々と報告される中で、我々は、臨床応用により近い先駆的な内耳再生医療のアプローチを切り拓いたものと考えています。

## 4．論文名

“Notch Inhibition Induces Cochlear Hair Cell Regeneration and Recovery of Hearing after Acoustic Trauma”

「Notch 情報伝達系の阻害は蝸牛有毛細胞の再生を誘導し、音響外傷後の難聴を改善させる」

Kunio Mizutari\*, Masato Fujioka\*, Makoto Hosoya, Naomi Bramhall, Hirotaka James Okano,

Hideyuki Okano and Albert S.B. Edge (\*: equally contribution to the study.)

【参考図】

支持細胞からの有毛細胞再生とそのラベリング(細胞系譜の追跡)

Sox2-CreER(支持細胞特異的CreER) x Cre-Reporter (tdTomato-mGFP)

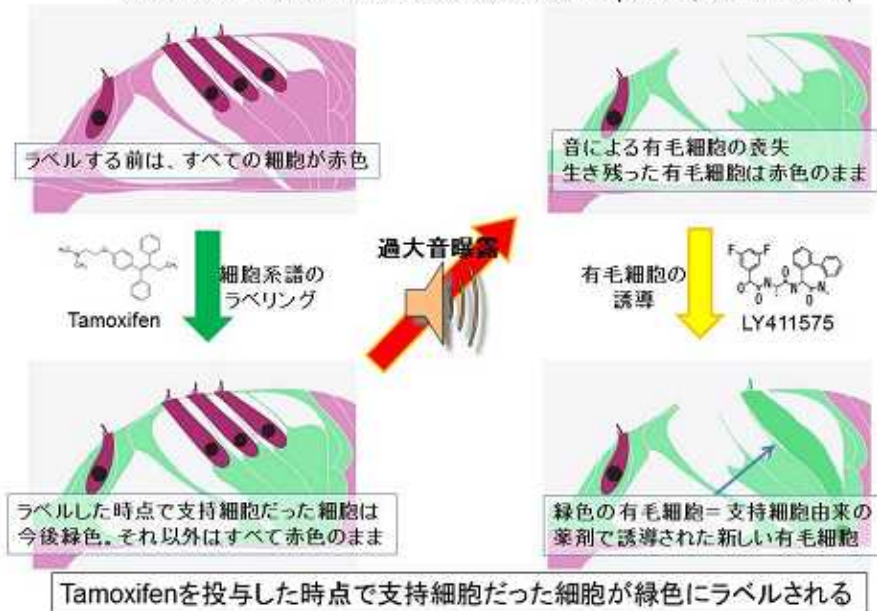


図1：薬剤投与による有毛細胞再生（支持細胞からの新規有毛細胞分化誘導）の証明

音響外傷前に予め支持細胞とそれ以外の細胞とを Cre/lox系を用いてラベリングしてから、薬剤投与により人為的に生体内で支持細胞から有毛細胞へ分化誘導することに成功した。

薬剤による支持細胞から有毛細胞へのin vivoでの分化誘導の観察

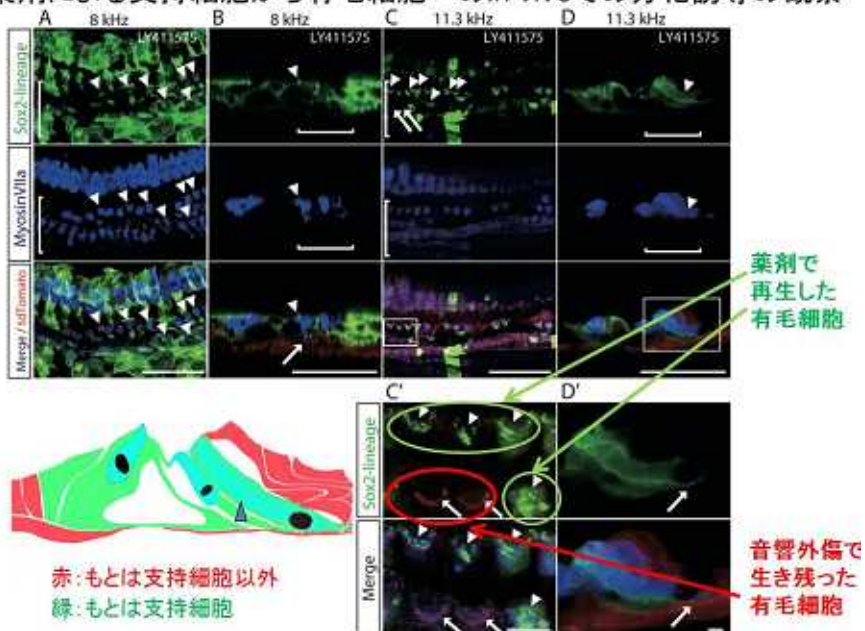


図 2：支持細胞由来の新生有毛細胞が、音響外傷で生き残った有毛細胞の間にモザイク様に分布していることがわかる。

### 薬剤による有毛細胞への*in vivo*での分化誘導による機能的再生

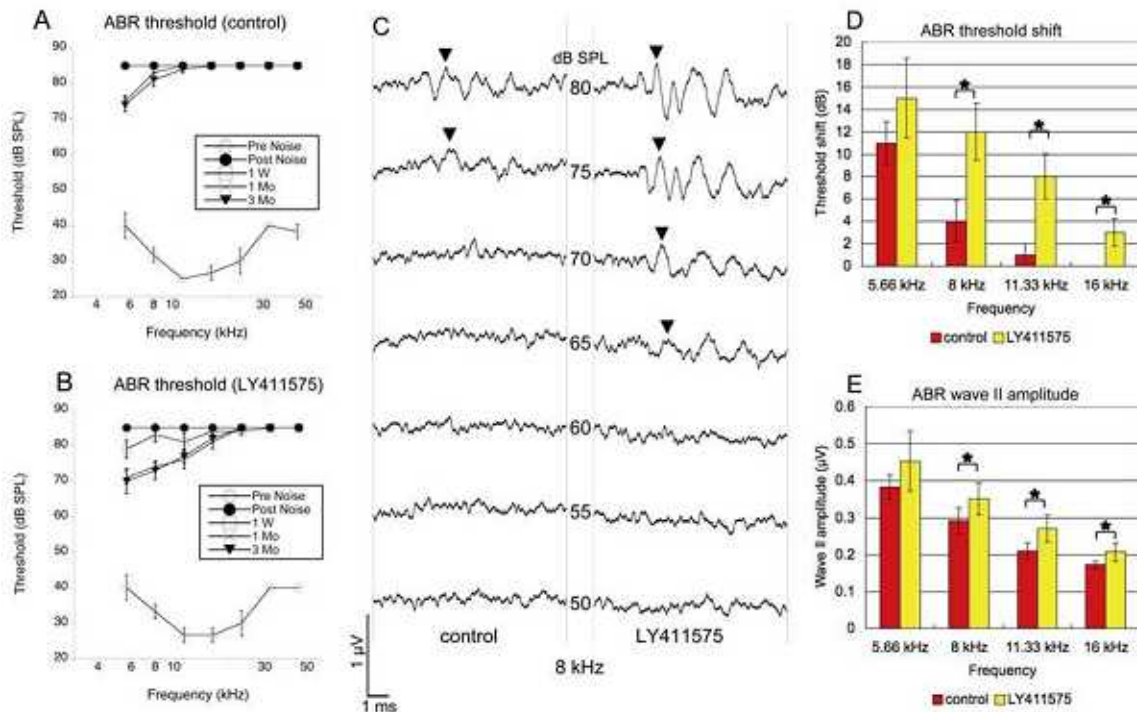


図 3：薬剤投与による機能的再生の証明

聴性脳幹反応(ABR)による聴覚検査の結果、(図 D) 対照群(赤: control 薬剤非投与群)と比較して、Notch 阻害剤を投与した場合(黄色: LY411575) わずか(3dB ~ 8dB)ではあるが、難聴が改善されたことがわかる。

#### 【補足・用語の解説】

注 1：蝸牛有毛細胞(かぎゅうゆうもうさいぼう)

我々は外界からの音刺激、すなわち空気の疎密波としてのエネルギーを、内耳にある蝸牛という臓器の中の有毛細胞という細胞によって電気信号に変換し、脳神経系において音として知覚している。音の変換をする内有毛細胞と、周波数特性や音入力を高める外有毛細胞とがある。哺乳類では有毛細胞は決して生えかわらず、一度傷害されると恒久的ダメージとなる。

注 2：過大音曝露・音響曝露による難聴

加齢や抗がん剤などの耳毒性薬物など、難聴には多くの原因がある。中でも大きな問題となる病気の一つに、大きな音に曝露してしまったことによる難聴(音響外傷性難聴)があり、主に有毛細胞の喪失が難聴の最大の原因である。

注3：Notch 情報伝達系

系統発生上古くから獲得されている隣接細胞間の信号伝達経路のひとつ。隣接細胞間の膜上で、リガンドとレセプターが結合して信号が伝えられる。このレセプターから細胞内へ信号が伝わる最初の反応を阻害する薬剤（ガンマセクレターゼ阻害剤）を当研究では用いている。

注4：Cre/lox系

バクテリオファージ由来のCreリコンビナーゼ（Cre）は、loxと呼ばれる塩基配列群を認識してこの配列で挟まれた部分を組替える酵素で、特定の細胞にCreを発現させることで遺伝子発現を人為的にコントロールするのに頻用されている。

注5：感音難聴

難聴のうち、内耳～中枢神経系に原因のある難聴のこと。WHOによると全世界の1割以上がこの疾患で悩んでいるとされる。（"The Global Burden of Diseases" 2004）

注6：シグナル伝達 = 情報伝達系

細胞は常に周囲の環境から情報を得て、自らを保ったり、自らの性質を変えたりしており、その総称をシグナル伝達系と呼ぶ。多くの場合、細胞表面にシグナルを受け取る受容体分子が発現しており、周囲からのシグナル分子がその受容体と結合することで、細胞外から細胞内へとシグナルが伝わっていく。

注7：支持細胞

有毛細胞をくるむような形で隣接する、蝸牛感覚上皮の別のタイプの細胞。有毛細胞を下から裏打ちし、感覚上皮としての構造維持などの役割を有している。

注8：Math1-nGFP マウス (*Lumpkin EA, et al. Gene Expr Patterns. 2003 Aug;3(4)*) を使用

注9：前庭

内耳には聴覚を司る蝸牛のほかに、平衡感覚を司る前庭という臓器が含まれる。前庭においても有毛細胞は存在し、回転加速度をリンパの流れの変化として感知している。幹細胞の採取とその増殖においては、蝸牛よりも前庭由来の細胞のほうが効率がよい。

注10：ニューロスフェア（Neurosphere）法

全世界で汎用されている神経幹細胞の選択的培養方法のひとつ。無血清培地において浮遊培養すると、幹細胞のみを球状の細胞塊（neurosphere）として選択的に増殖させられる。

注11：Generating mouse models of degenerative diseases using Cre/lox-mediated in vivo mosaic cell ablation. *Fujioka M, et al. J Clin Invest. 2011 Jun;121(6)*

注12：正円窓（せいえんそう）

感覚上皮を含む蝸牛内のコンパートメントと中耳を隔てる膜様構造物。脂溶性で小さなサイズの物質を比較的良好に通す性質がある。

ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

本リリースは文部科学記者会、文部科学省科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信させていただいております。

-----  
<本発表資料のお問い合わせ先>

岡野 栄之（オカノ ヒデユキ）教授  
慶應義塾大学医学部 生理学教室  
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 3 5  
TEL 03-5363-3747 FAX 03-3357-5445

藤岡 正人（フジオカ マサト）共同研究員  
慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科学教室  
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 3 5  
TEL 03-5363-3827 FAX 03-3353-1261

水足 邦雄（ミズタリ クニオ）  
国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 耳鼻咽喉科  
〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1  
Tel 03-3416-0181 Fax 03-3416-2222

<本リリースの発信元>

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課（担当：富田・吉野）  
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 3 5  
TEL 03-5363-3611 FAX 03-5363-3612  
E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp