

氏 名 (本籍)	田 中 秀 峰 (茨 城 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 乙 第 2526 号		
学位授与年月日	平成 22 年 10 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Protective effects of exogenous GM-1 ganglioside on acoustic injury of the mouse cochlea (マウス蝸牛の音響性障害における GM-1 ガングリオシドの保護効果)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	玉 岡 晃
副 査	筑波大学教授	医学博士	高 橋 智
副 査	筑波大学教授	博士 (医学)	武 川 寛 樹
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	中馬越 清 隆

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

蝸牛音響性障害は、強大音負荷による蝸牛内での有毛細胞の障害が原因とされている。近年、音響性障害モデルでは蝸牛内での活性酸素およびフリーラジカルの産生が増加することが報告されている。また、グルタチオンや superoxide dismutase (SOD)、alpha-tocopherol などの内因性抗酸化物質がこれらフリーラジカルの産生を抑制し、内耳を保護しているとの報告もされている。一方、superoxide dismutase (SOD) ノックアウトマウスは、強大音負荷に対して易障害性が認められることが報告されている。GM-1 ガングリオシド (GM-1) は、糖鎖上に 1 つシアル酸 (N-アセチルノイラミン酸) を結合しているスフィンゴ糖脂質であり、特に脳や神経細胞の脂質細胞膜上に多く存在している。GM-1 は膜蛋白あるいは膜へと移行する蛋白と複合体を形成し、脂質ラフトと呼ばれる構造を形成している。この GM-1 を含む脂質ラフトは、膜を介したシグナル伝達を行い、種々の蛋白キナーゼ活性の調節、カルシウムイオンの調節、神経細胞の分化・増殖、細胞間相互作用、神経栄養因子・保護因子としての機能を持つ他に、抗酸化作用を有することで知られている。特に脂質過氧化物やフリーラジカルの産生を抑制する作用があるとされている。これらの特性を持ち合わせている GM-1 は、すでに海外では脊髄損傷やアルツハイマー病などに対し臨床応用されている薬剤で、脳神経系の障害後にはそのような内因性の神経栄養因子が増加し、神経系の破綻を緩和しているといわれている。本論文の目的は、蝸牛における音響性聴器障害に対する GM-1 の保護効果、特に抗酸化作用について検討することである。

### (対象と方法)

生後 8 ～ 9 週の ddY マウス雌、76 匹を使用した。強大音響負荷には 4 kHz 純音を用い、128 dB (sound pressure level: SPL) の音圧にて 4 時間負荷した。聴覚閾値測定は聴性脳幹反応 (auditory brainstem response: ABR) を用いて行い、音響負荷前と負荷後 2 週での ABR 閾値を求めた。組織学的検討では音響負荷後 2 週の時点で断頭し、4%パラホルムアルデヒドにて蝸牛を固定後、脱灰した。propidium iodide を用いて核を染

色し、有毛細胞の消失率を測定した。また、GM-1の抗酸化作用を検討するため、音響負荷前から負荷直後、負荷後4時間、12時間、1日目、3日目、7日目までの蝸牛を経時的に凍結標本にし、脂質過酸化の指標である4-hydroxynonenal (4-HNE)で免疫染色し、その蛍光度を測定した。コントロール群には生理食塩水を、GM-1 (30、10、1 mg/kg) 投与群は、音響負荷直前にそれぞれを腹腔内投与した。音響負荷後2週でのABR閾値変化と有毛細胞消失率をコントロール群と比較検討し、さらに音響性聴器障害における有毛細胞の脂質過酸化についても比較検討を加えた。

#### (結果)

GM-1 投与群では30 mg/kg 投与群において、ABR 閾値上昇の有意な抑制効果を認めた。一方、10 mg/kg 及び1 mg/kg 投与群では有意な抑制効果は認めなかった。30 mg/kg 投与群における組織学的検討では、外有毛細胞第1列目において、GM-1は有意に細胞消失を抑制した。脂質過酸化の検討では、コントロール群では強大音響負荷直後から12時間目まで徐々に4-HNEの染色が強くなり、その後3日目までは強く染色され、負荷後7日目には負荷前と同レベルに戻っていた。GM-1 (30 mg/kg) 投与群においても、経時変化は同様であったが、それぞれの時間でコントロール群と比較すると、音響負荷後4時間目から3日目まではGM-1 (30 mg/kg) 投与群で有意に4-HNEの染色が抑制されていた。

#### (考察)

GM-1などのスフィンゴ糖脂質は親水基と疎水基の両方を持ち両親媒性を有し、その特異な化学的性質から他の細胞膜脂質成分と区別され、細胞膜上で脂質ラフトを形成しシグナル伝達などを行い、脂質メッセンジャーとしての機能を持つ。GM-1を含む脂質ラフトはMAPキナーゼやNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、NADPHオキシダーゼなどのさまざまな膜蛋白が結合し、外界の変化やストレスに応じて、フリーラジカルの消去や抗酸化作用を発揮する。以上より、GM-1が蝸牛音響性障害により発生するフリーラジカルや過酸化物質の増加を受け、細胞内にシグナル伝達をして、脂質過酸化反応を抑制し、細胞障害が軽減したと考えられる。今回新たに、強大音響障害後の4-HNE染色の経時変化を検討することで、音響障害後の蝸牛での脂質過酸化反応の変化を新たに見出した。音響負荷後比較的早期から脂質の過酸化が起こり始め、数日間脂質過酸化状態が続くことが明らかとなった。GM-1の投与でこれら脂質過酸化が抑制されていたことも分かり、GM-1の音響性聴器障害に対する保護効果がGM-1を介する抗酸化作用によるものと考えられた。

#### (結論)

今回我々は、GM-1が蝸牛における音響性傷害において有意な保護効果を示すことを報告した。また4-HNEの免疫組織学的検討で、音響性傷害において活性酸素が重要な役割を担うという仮説をより支持するものとし、GM-1が脂質過酸化を抑制し抗酸化作用を持つことも示した。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、蝸牛における音響性聴器障害のモデルをマウスにて作成し、その酸化ストレスによる病態を明らかにするとともに、GM-1による保護効果、特に抗酸化作用について検討したものであり、その知見が実際の臨床応用に結びつく可能性があり、価値ある内容であると高く評価された。

論文審査ならびに審議の結果、審査委員全員一致で合格と判定された。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。