

氏名(本籍)	にしむらぶんご 西村文吾(茨城県)			
学位の種類	博 士(医 学)			
学位記番号	博 乙 第 2543 号			
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 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	The influence of sphingolipoid metabolites on gentamicin-induced hair cell loss of the rat cochlea (ラットの蝸牛におけるゲンタマイシンによる有毛細胞障害に対するスフィンゴ脂質代謝産物の影響)			
主査	筑波大学教授	医学博士	玉岡	晃
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	加治	優一
副査	筑波大学講師	博士(医学)	中馬越	清隆
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	人見	重義

論文の内容の要旨

(目的)

セラミドやスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)などのスフィンゴ脂質代謝産物は近年さまざまな細胞系において増殖や新生、細胞死に関わる働きを持つことが知られている。一方内耳の有毛細胞はアミノグリコシド系抗生物質で不可逆的な障害を受けることが知られているが、その機序にアポトーシスが関わるということが証明されてきている。アポトーシスを制御する可能性が指摘されているスフィンゴ脂質代謝産物を用いてゲンタマイシンによる耳毒性に対する影響を調べることで、内耳毒性の病態を解明し、その予防、治療の可能性を探ることが本実験の目的である。

(対象と方法)

Sprague-Dawley ラット(生後3~5日)を用いた。蝸牛を摘出しコルチ器の基底回転を取り出し器官培養を行った。10%FBS、25mM HEPES、30U/ml ペニシリンを加えた Dulbecco's modified eagles medium 中、37℃、5%CO₂ 下で培養した。ゲンタマイシンは20μMと35μMの濃度で培養液中に負荷した。スフィンゴ脂質代謝産物はセラミド、SIP、ガングリオシド GM1、GM3 を各々単独、あるいはゲンタマイシンと同時に負荷しその効果を検討した。48時間の負荷の後、コルチ器を4%ホルムアルデヒドで固定し、不動毛をファロイジンで染色し、外有毛細胞数を計測し、外有毛細胞消失率を計算、比較した。また外有毛細胞障害におけるアポトーシスの影響を評価するため TUNEL 法による染色も行った。

(結果)

セラミド単独投与は10~100μMの低濃度では特に外有毛細胞を有意に障害しなかったが、150、200μMでは外有毛細胞を有意に消失させた。ゲンタマイシンと同時投与では50、100μMでゲンタマイシン単独に比べ有意に外有毛細胞消失率を増加させた。TUNEL染色を行った結果、セラミド50μMを投与した群がゲンタマイシン35μM単独群よりTUNEL陽性細胞が有意に増加していた。S1Pは50、100μMでゲンタマイシン35μMによる外有毛細胞消失率を減少させる効果をもとめた。またガングリオシド GM1、GM3ともにゲ

ンタマイシンによる外有毛細胞障害を軽減する結果が得られた。しかし GM1、GM3 ともに 700、1000 μ M の高濃度の投与を行うと逆に外有毛細胞消失率が増加した。

(考察)

スフィンゴ脂質代謝産物のうちセラミドはアポトーシス促進に働くことが知られているがさらにその代謝産物である SIP はアポトーシスを抑制する働きを持つことが報告されている。またセラミドから生成される ganglioside GM1 もアポトーシスを抑制することが報告されている。今回の実験ではセラミドが蝸牛外有毛細胞において細胞死を誘導すること、またゲンタマイシンと同時投与により外有毛細胞障害を促進する相乗効果を持つことが示された。また、TUNEL 染色によりその効果発現にアポトーシスが関与していることも示唆された。一方 SIP はゲンタマイシン耳毒性を抑制し、セラミドと対照的な働きを持つことが示された。近年セラミドと SIP のバランスが細胞死を制御していることが様々な実験系で示されている。今回の結果は蝸牛におけるゲンタマイシンによる外有毛細胞障害においてもセラミドと SIP が逆の効果を持つことが示され、これらの制御がゲンタマイシン耳毒性に影響を及ぼす可能性があることが推測された。またセラミドから生成されるスフィンゴ糖脂質である ganglioside も主に神経系において細胞保護効果を持つことが知られているが、今回蝸牛においてもゲンタマイシン耳毒性に対する保護効果を確認できた。ganglioside GM1 がアポトーシスを抑制する機序としては、GM1 がスフィンゴシンキナーゼを活性化することで SIP 生成を促し、SIP によりアポトーシスが抑制されるとの報告がある。これらのスフィンゴ脂質代謝産物のアポトーシスに対する影響の発現機序についてはまだ完全には解明されていないが JNK や PKC などの protein kinase や各種 protein phosphatase の活性化に関わるとの報告もある。今後さらなる検討を行い、その機序の解明に取り組み、ゲンタマイシン耳毒性の病態を解明し治療に結びつく新たな知見を求めていきたい。

(結論)

蝸牛におけるゲンタマイシンによる外有毛細胞障害にセラミドが促進効果を、SIP、ganglioside GM1、GM3 が抑制効果を持つことが示された。スフィンゴ脂質代謝産物はゲンタマイシン耳毒性に影響を持つことが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、蝸牛におけるゲンタマイシンによる外有毛細胞障害にセラミドが促進効果を、SIP、ganglioside GM1、GM3 が抑制効果を持つことを示したものであり、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。