

氏名(本籍)	<small>うえままとまり</small> 上前泊	<small>いさお</small> 功(東京都)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	博乙第2379号	
学位授与年月日	平成20年4月30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 effect of calcineurin inhibitors on acoustic injury of the cochlea (マウス蝸牛の音響性障害における calcineurin 阻害薬の保護効果)	
主査	筑波大学教授	博士(医学) 水谷太郎
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) 大鹿哲郎
副査	筑波大学講師	医学博士 遠藤隆志

論文の内容の要旨

(目的)

蝸牛音響性障害は、一過性の時間経過とともに回復する聴力低下 (Temporary Threshold Shift; TTS) と永続的な聴力低下 (Permanent Threshold Shift; PTS) の2つの成分に分けられる。臨床上特に重要な PTS をいかに予防し、また治療するかは大きな課題である。

Cyclosporin A (CsA), FK506 及び Rapamycin は臨床では免疫抑制剤として広く使用されている。特に CsA, FK506 は calcineurin (CaN) を抑制し薬理学的効果を示すため、CaN 阻害薬と分類されている。

CaN は哺乳動物の様々な組織で発現があり、CaN を介した細胞死の関与が報告されている。また CaN 阻害薬である CsA, FK506 の脳虚血、神経疾患モデル動物での保護効果が報告されている。神経、心筋細胞などで報告されている CaN を介した細胞障害の機序としては NMDA 受容体の脱感作、Bcl-2 family protein である BAD の脱リン酸化、Bcl-2 の非活性化、NOS の脱リン酸化による NO 産生などによる様々な apoptosis や necrosis の機序が報告されている。

一方、蝸牛音響性障害は様々な機序が報告されてきた。興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による神経の過剰興奮が神経細胞内へのカルシウムイオンの過剰流入を導き、様々な酵素が活性化される。特に活性酸素の上昇が重要な役割を示すことや強大音負荷により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。

本研究の目的は、蝸牛音響性障害に対する CaN 阻害薬 CsA, FK506 の保護効果を検討することである。また FK506 のアンタゴニストとされる Rapamycin の投与による保護効果の変化を電気生理学的に検討しその機序につき推測した。

(対象と方法)

実験1: 250-300g のハートレー系モルモット雌, 30匹を使用した。強大音負荷には 2kHz 純音を用い、120dB (sound pressure level: SPL) の音圧にて 10 分間負荷した。聴覚閾値測定は蝸牛神経複合電位 (compound action potential; CAP) を用いて行い、音響負荷前から負荷後 1 週までの CAP 閾値を求めた。(1) FK506 (0.1,

1, 5 mg/kg) 投与群, (2) CsA (10, 50 mg/kg) 投与群, (3) コントロール群 (生理食塩水投与) を作成した。薬剤は音響負荷直前にそれぞれ腹腔内投与した。音響負荷直後, 1, 2 週後での CAP 閾値変化をコントロール群と比較検討した。

実験 2: 生後 8 ~ 9 週の ddY マウス雌, 25 匹を使用した。強大音響負荷には 4kHz 純音を用い, 128dB 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, 音響負荷前から負荷後 2 週までの ABR 閾値を求めた。(1) FK506 (5 mg/kg) 投与群, (2) CsA (50 mg/kg) 投与群, (3) Rapamycin (101 mg/kg) 投与群, (4) FK506 (5 mg/kg) 及び Rapamycin (10 mg/kg) 同時投与群, (5) コントロール群 (生理食塩水投与) を作成した。薬剤は音響負荷直前にそれぞれ腹腔内投与した。音響負荷直後, 1, 2 週後での ABR 閾値変化をコントロール群と比較検討した。組織学的検討は音響負荷後 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, propidium iodide を用いて核を染色し, 有毛細胞の消失率を測定した。

(結果)

実験 1: 音響負荷直後での CAP 閾値変化ではいずれの薬剤投与後とコントロール群間で有意な差は見られなかった。1 週後での FK506 (5 mg/kg) 投与群と CsA (10, 50 mg/kg) 投与群ではコントロール群間と比較し有意に閾値上昇を抑えた。

実験 2: 音響負荷直後での ABR 閾値変化ではいずれの薬剤投与後とコントロール群間で有意な差は見られなかった。1, 2 週後での FK506 (5 mg/kg) 投与群と CsA (50 mg/kg) 投与群ではコントロール群間と比較し有意に閾値上昇を抑えた。しかし FK506 (5 mg/kg) と Rapamycin (10 mg/kg) 同時投与群では閾値上昇を抑える効果は消失した。また組織学的検討ではコントロール群では外有毛細胞消失は蝸牛頂からおよそ 66% と著明であった。外有毛細胞第 1 列において, FK506, CsA は有意に細胞消失を抑制した。

(考察)

コントロール群では, 128dB SPL の音圧負荷により, 有意な ABR 閾値上昇を認めた。更に有毛細胞消失率の検討において有意な有毛細胞の消失を認めた。以上の結果から, 本研究では 128dB SPL の負荷音圧が急性音響外傷のモデルとして適切と考えられた。CaN 活性化は BAD の脱リン酸化を促し cytochrome c/caspase-3 依存性の apoptosis に導くとされる。過去の報告では, FK506 結合蛋白である FKBP-12 が内, 外有毛細胞を含めた蝸牛に広く分布することが示された。本論文投稿中に CsA, FK506 の外リンパ還流による局所投与での音響外傷に対する保護効果が報告された。本研究の結果も同様に CsA, FK506 の腹腔内投与により保護効果を示すものであった。

これまで CaN 阻害薬の保護効果として Apoptosis pathways の抑制のほか, 中枢神経系では CaN 阻害薬がグルタミン酸毒性に対する保護効果を示したとする報告がある。蝸牛においても NMDA antagonist である MK801 が音響外傷に対する保護効果を認めてることから今回の保護効果の機序の 1 つと考えられた。

CaN は多くの細胞機能を調節する regulator であり, 今後も CaN 阻害薬の保護効果については検討が必要と思われる。

また, 今回の結果では FK506 と Rapamycin 同時投与群では閾値上昇を抑える効果は消失した。Rapamycin は CaN を抑制せず FK506 の antagonist として作用すると報告される。今回の結果は FK506 の保護効果を Rapamycin が打ち消したことから音響外傷の保護効果は CaN 阻害によるものと推測された。

(結論)

本研究により, FK506, CsA が, 蝸牛における音響性障害に対し, 保護効果を有することが示された。また FK506 と Rapamycin 同時投与群では閾値上昇を抑える効果は消失した。これは, 音響性傷害において CaN が重要な役割を担うという仮説を支持するものであった。

審査の結果の要旨

本研究は、強大音響負荷による音響性障害動物モデルを用い、Calcineurin 阻害により蝸牛における音響性障害を抑制できる可能性を示した。音響性障害治療ないし予防に発展する可能性のある興味深い結果であり、価値ある論文である。有毛細胞の減少のみで聴力低下のメカニズムを説明できるか否かが、今後の研究のテーマとなり得る。研究の進展に期待したい。

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。