

氏名（本籍）	中山 雅博（茨城県）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博乙第 2705 号
学位授与年月	平成26年 8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	The influence of sphingosine-1-phosphate receptor antagonists on gentamicin-induced hair cell loss of the rat cochlea (ゲンタマイシン耳毒性における蝸牛有毛細胞障害に対するスフィンゴシン1リン酸受容体アンタゴニストの効果)
主査	筑波大学教授 医学博士 大鹿 哲郎
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） 関堂 充
副査	筑波大学准教授 博士（医学） 石井 一弘

論文の内容の要旨

(目的)

スフィンゴシン1リン酸(S1P)はスフィンゴ脂質由来の脂質メディエーターであり、スフィンゴ脂質の共通骨格であるセラミドの分解により生じたスフィンゴシンが、スフィンゴシンキナーゼによりリン酸化されることによって生じる。S1Pは5つのサブタイプをもつ受容体(S1PR₁₋₅)を介して生体内でアポトーシスなどの生命の基本的な活動に関わっていることが明らかにされている。これらの受容体のうち、S1PR₁₋₃は広範な組織での発現がみられるのに対して、S1PR₄は胸腺・脾臓・肺など、S1PR₅は脳といった組織のみに発現している。内耳ではS1Pはアミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンによる蝸牛有毛細胞障害に対して、アポトーシスを抑制することが知られている。本研究では内耳でのS1P受容体の発現およびゲンタマイシンによる外有毛細胞死におけるS1P受容体アンタゴニストの影響について検討を行った。

(対象と方法)

動物は3-5日齢 Splague-Dawley ラットを用いた。

① S1PR₁₋₅の発現について

蝸牛を摘出し、コルチ器とらせん神経節に分離し、各々から RNA を抽出した後、逆転写酵素により cDNA を合成した。cDNA をテンプレートとし、S1PR₁₋₅のプライマーを用い、PCR を行った。

② S1P 受容体アンタゴニストの効果について

コルチ器を含む、基底回転部分を摘出し、器官培養を行い、ゲンタマイシンを 35 μ M で 48 時間負荷した。4%パラホルムアルデヒドで固定した後、Phalloidin 染色を施行し、外有毛細胞数を計測した。また、ゲンタマイシンと S1P 受容体アンタゴニスト (各々濃度 ; 1~100 μ M) を同時投与し、48 時間負荷した後の外有毛細胞消失率を比較した。

③ ゲンタマイシンと S1P 受容体アンタゴニスト同時投与群における caspase 3, 9 の発現について
コントロール群 (薬剤負荷なし、48 時間)、ゲンタマイシン単独投与群 (ゲンタマイシン 35 μ M 負荷、48 時間)、ゲンタマイシンと S1P 受容体アンタゴニスト同時投与群 (ゲンタマイシン 35 μ M および S1PR₂アンタゴニスト 100 μ M 負荷、48 時間) を作製し、cleaved caspase 3 および cleaved caspase 9 の蛋白発現について western blot 法を用いて比較した。各群より蛋白を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (蛋白量 10 μ g、90 分間) を行い、PVDF メンブレンに転写した。ブロッキング (1 時間) の後、1 次抗体 (over night)、2 次抗体 (1 時間) を使用し、化学発光基質を用い、バンドを検出した。得られたバンドは Multigage system を用い、定量的に解析した。

(結果)

- ① 有毛細胞、らせん神経節細胞に S1PR₁₋₃の mRNA の発現を認めた。
- ② ゲンタマイシン単独投与群は約 44%の外有毛細胞消失を認めた。アンタゴニストの投与は受容体の存在が推測された S1PR₁₋₃において検討を行った結果、ゲンタマイシン単独投与群に比べて、S1PR₂アンタゴニスト投与群は容量依存性に外有毛細胞消失率の有意な上昇を認めたが、S1PR_{1,3}アンタゴニスト投与群は有意差を認めなかった。
- ③ ゲンタマイシンおよび S1PR₂アンタゴニスト同時投与群はゲンタマイシン投与群、薬剤なし投与群と比較して cleaved caspase 3 および cleaved caspase 9 の蛋白発現が増加していた。

(考察)

今回の実験により、蝸牛有毛細胞に S1PR₁₋₃の存在が推測された。また、ゲンタマイシンによる蝸牛外有毛細胞障害が S1PR₂アンタゴニストの投与により増強され、S1PR_{1,3}アンタゴニストの投与では変化がないことが判明した。S1P はゲンタマイシン耳毒性に対して保護的に働くことが知られているが、このことから S1P の内耳保護効果は S1PR₂を介して働くことが示唆された。また、ゲンタマイシン耳毒性発現の機序の一つに内因性経路によるアポトーシスの関与が報告されているが、今回の実験においてもゲンタマイシン投与により caspase 3, 9 活性化を認めた。さらにゲンタマイシンと S1PR₂アンタゴニスト同時投与群においてはゲンタマイシン単独投与群と比較して caspase 3, 9 の活性が増強されていた。以上より、S1P はゲンタマイシン耳毒性に対して、S1PR₂を介して内因性アポトーシスを抑制することが推測された。

審査の結果の要旨

(批評)

きちんとした仮説に基づいた理路整然とした実験・研究が行われている。実験も自分の手を十分に動かして行ったことが窺われ、それなりの労力と時間を掛けて遂行された研究と考えられる。

一連の実験により、ゲンタマイシンによる蝸牛外有毛細胞障害において、**S1PR₂**アンタゴニストが内因性経路によるアポトーシスを増強することが明らかにされた。耳毒性に対する蝸牛有毛細胞の生存における **S1PR₂**を介する経路の重要性を示した有意義な研究である。

平成 26 年 6 月 30 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。