

氏名	谷 紘輔		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 7862 号		
学位授与年月	平成 28 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Hair Cell Loss Induced by Sphingosine and a Sphingosine Kinase Inhibitor in the Rat Cochlea (ラット蝸牛におけるスフィンゴシン及びスフィンゴシンキナーゼ阻害薬による内耳有毛細胞障害)		
主査	筑波大学教授	医学博士	玉岡 晃
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	梶 正幸
副査	筑波大学教授	医学博士	大鹿 哲郎
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	河合 弘二

論文の内容の要旨

(目的)

セラミダーゼによってセラミド (Cer) はスフィンゴシン (Sph) へと変換し、Sph はスフィンゴシンキナーゼ (Sk) のリン酸化によりスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) へと変換される。S1P は細胞の保護・増殖効果、Cer・Sph は細胞死に関与すると報告されている。耳毒性を有する薬剤との併用において、Cer は内耳有毛細胞に障害を、S1P は内耳有毛細胞の保護に関与すると報告されている。S1P を減少させる可能性のある Sk 阻害剤の使用は、S1P の有する内耳保護効果に影響を与える可能性がある。しかし Sk 阻害剤による内耳への影響に関する報告はない。本研究では、Sk 阻害薬、Sph の内耳有毛細胞への影響について検討した。また耳毒性を有するものの、その抗腫瘍効果から多くの悪性腫瘍において使用されている cisplatin (CDDP) による内耳毒性において Sk 阻害剤、Sph、S1P の併用投与が内耳外有毛細胞へ及ぼす影響について検討した。

(対象と方法)

Sk の内耳における発現を確認するため免疫蛍光染色、RT-PCR、Western blotting を 3-5 日齢 Sprague-Dawley ラットから摘出したコルチ器に行った。免疫組織化学染色は成獣 Sprague-Dawley ラットにおいて行った。CDDP による Sk への影響を評価するため、3-5 日齢 Sprague-Dawley ラットのコルチ器を含む基底回転部分を摘出し CDDP (5 μ M) を 48 時間、器官培養を行った後、Sphingosine Kinase Activity Assay

(K-3500; Echelon)にて Sk の活性を評価した。Sk 阻害薬、Sph 単独投与の内耳外有毛細胞への影響、CDDP と Sk 阻害薬、Sph もしくは S1P 併用投与の内耳外有毛細胞への影響を評価するため 3-5 日齢 Sprague-Dawley ラットのコルチ器を含む基底回転部分を摘出し各種薬剤にて 48 時間、器官培養を行った。培養終了後 4%パラホルムアルデヒドで固定し、rhodamin-phalloidin で染色した。内耳外有毛細胞数を計測し、消失率を検討した。細胞障害の機序を確認するため cleaved caspase 3 の発現を Western blotting にて評価した。

(結果)

幼獣、成獣ともに Sk1、Sk2 両アイソザイムがコルチ器、蝸牛外側壁に存在した。CDDP は投与後 48 時間で Sk の活性を上昇させた。Sk 阻害剤 10、20 μ M 単独投与群では内耳外有毛細胞障害の有意な消失は認めなかったが、50 μ M 単独投与群では内耳外有毛細胞数の消失率は約 100%となり、高度な障害を認めた。同様に Sph50 μ M 単独投与群でも高度な内耳外有毛細胞数の消失率を認めた。CDDP と Sk 阻害薬もしくは Sph の併用は、それぞれが単独で障害を認めない濃度においても CDDP 単独投与よりも内耳外有毛細胞消失率の有意な増加を認めた。一方 S1P50 μ M は CDDP 投与による細胞消失を減弱した。Sk 阻害剤単独投与群と比較して CDDP 併用群では濃度・時間依存性に cleaved caspase3 の発現が増強した。また Sph 単独投与群でも濃度依存性に cleaved caspase3 の発現が増強した。

(考察)

cleaved caspase3 の発現から Sk 阻害薬、Sph の細胞障害性は apoptosis によると考えられる。外投与された Sph は細胞膜を透過もしくは破壊する事が報告されており、Sph の内耳外有毛細胞への流入が apoptosis を起こしたと推定される。CDDP の投与は Sk の活性を上昇させたが、Sk が細胞内の Sph を減らし S1P を増加させる事から、CDDP に対して Sk が細胞保護に働いたと考えられる。この Sk の活性上昇は hypoxia でも認められており、これは reactive oxygen species (ROS)によると報告がある。CDDP も内耳有毛細胞内の ROS を増加させるので、CDDP の投与による Sk の活性上昇は ROS によると推定される。Sk 阻害剤も細胞内の ROS を増加させる報告があり、CDDP と Sk 阻害剤の併用は CDDP 単独よりも細胞内の ROS を増加させ内耳有毛細胞に内在する細胞保護機序を上回る事で CDDP の細胞障害性を相乗的に増加させたと考えられる。以上より、Sk 阻害薬と抗悪性腫瘍薬との併用は耳毒性を起こす可能性があり使用に注意を要すると考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究において、著者は Sk 阻害薬、Sph の内耳有毛細胞障害が apoptosis によるものであることを示すとともに、cisplatin (CDDP) による内耳毒性において Sk 阻害剤、Sph、S1P の併用投与の相乗効果を証明した。ROS の関与等の詳細な分子病態は更なる解明を待たねばならないが、本研究により Sk 阻害薬と抗悪性腫瘍薬との併用が耳毒性という面から注意を要することが明らかにされた点は高く評価できる。

平成 28 年 1 月 8 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、最終試験を行った。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。