

氏名	LE NGUYEN UYEN CHI		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 7872 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	Ceramide/sphingomyelin cycle involvement in gentamicin-induced cochlear hair cell death (ゲンタマイシン内耳有毛細胞障害におけるセラミド/ スフィンゴミエリン・サイクルの関与)		
主査	筑波大学教授	医学博士	大鹿 哲郎
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	榊 正幸
副査	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)	工藤 崇

論文の内容の要旨

(目的)

スフィンゴ脂質代謝物質であるセラミドは、アポトーシス、細胞老化、細胞周期や細胞分化など、細胞の様々な過程を調節する。これまでの報告では、外部から投与したセラミドにより、ゲンタマイシンによって誘発される内耳の蝸牛有毛細胞死が増加することが明らかになっている。セラミド合成には主に2つの経路、スフィンゴミエリンからの合成経路と、*de novo* の合成経路が知られている。スフィンゴミエリンからの合成経路では、スフィンゴミエリンは酸性、中性及びアルカリ性の3種類のスフィンゴミエリナーゼにより加水分解されセラミドを生成する。またセラミドはスフィンゴミエリン・シタターゼ (SMS) によってスフィンゴミエリンとなり、これらのサイクルのバランスによってセラミドレベルが調節されている。*de novo* の合成経路では、律速酵素であるセリン・パルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) とセラミド産生のエンドポイントを促進するセラミド・シタターゼ両者の活性がセラミドレベル調整に関与する。今回の研究ではゲンタマイシン負荷による有毛細胞死に関連して、主にどちらの合成経路によるセラミドが影響しているか調べる為、スフィンゴミエリン経路の重要酵素として中性スフィンゴミエリナーゼ (nSMase) と SMS を、また *de novo* の合成経路の酵素として SPT を取り上げ検討した。

(対象と方法)

実験には 3~5 日齢の Sprague-Dawley ラットを用い、コルチ器の基底回転を採取した。ゲンタマイシンによる蝸牛有毛細胞障害に対する nSMase, SMS, de novo 合成経路の関わりを調べるため、35 μ M ゲンタマイシンを含んだ培地に nSMase 阻害剤である GW4869 あるいは SMS の活性化剤である 2-ヒドロキシオレイン酸、また SPT 阻害剤である myriocin を加え、それぞれコルチ器を 48 時間器官培養した。培養後、有毛細胞をパラホルムアルデヒドで固定し phalloidin 染色した後、有毛細胞数を計測した。また蝸牛有毛細胞中に nSMase2 が存在することを確認する為、抗 nSMase2 抗体と phalloidin による有毛細胞の二重染色を行いコルチ器内での nSMase2 の局在を調べた。ゲンタマイシン負荷中のコルチ器基底回転の有毛細胞における nSMase 活性を、nSMase assay kit を用い測定した。

(結果)

蝸牛コルチ器を nSMase 抗体で染色すると、コルチ器の内・外有毛細胞の両者で nSMase2 抗体による染色性が確認され、内外有毛細胞における nSMase の存在が明らかとなった。コルチ器にゲンタマイシンを負荷すると、負荷前値に対し、負荷開始後 20 分で nSMase 活性は上昇し、その後一度活性は低下した後、負荷開始後 48 時間の時点で再び nSMase 活性は上昇した。35 μ M のゲンタマイシンの投与により外有毛細胞の細胞死が認められた。この外有毛細胞死は GW4869 あるいは 2-ヒドロキシオレイン酸投与によって有意に減少した。一方、myriocin 投与では有意な有毛細胞保護効果を認めなかった。

(考察)

セラミドは蝸牛有毛細胞のアポトーシスに重要な役割を果たすことから注目されている。細胞膜に豊富に存在するスフィンゴミエリンは nSMase によって加水分解され、セラミドに変換される。逆にセラミドは SMS によってスフィンゴミエリンへと合成されるという、セラミド/スフィンゴミエリン・サイクルが存在する。セラミドレベルはこれらの 2 つの酵素活性によって調節され、平衡を維持している。我々は nSMase の蝸牛における局在と酵素活性を世界で初めて報告した。ゲンタマイシン負荷により蝸牛有毛細胞における nSMase の酵素活性は負荷開始後、20 分後及び 48 時内後をピークとする二峰性に上昇し、ゲンタマイシン投与により nSMase 活性が変化することが判った。この nSMase の特異的な阻害剤の投与、あるいは SMS 活性化剤の投与によって、ゲンタマイシンにより誘導される有毛細胞死は減少した。今回の結果から、セラミド/スフィンゴミエリン・サイクルがコルチ器官の中に存在し、このサイクルのバランスがゲンタマイシン内耳毒性の有毛細胞死に重要であることが示唆された。一方、de novo 合成経路についてはその律速酵素である SPT 阻害剤が有毛細胞死に影響を与えなかったことから、セラミドの de novo 経路はゲンタマイシン内耳毒性に関連しないことが示された。すなわち、ゲンタマイシン負荷時、セラミド/スフィンゴミエリン・サイクルは nSMase 等の酵素活性により動的に調節されており、本サイクルの調節はゲンタマイシンによる蝸牛有毛細胞の生死の決定に重要な役割を果たしていることが判った。また、本サイクルの調整により、蝸牛有毛細胞死を少なくとも部分的に防ぐことができることから、このセラミド合成経路は新たな治療のターゲットとなり得る可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

ゲンタマイシン負荷によって生じる内耳有毛細胞障害における、セラミド/スフィンゴミエリン・サイクルの関与に関する研究である。ラットにおけるコルチ器の培養実験の結果、ゲンタマイシン

審査様式 2-1

負荷時，セラミド/スフィンゴリエリン・サイクルは中性スフィンゴリエリナーゼ等の酵素活性により動的に調節されており，本サイクルの調節はゲンタマイシンによる蝸牛有毛細胞の生死の決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった．将来の新たな治療法の可能性を示唆する有意義な研究である．

平成 27 年 12 月 28 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．

7 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．