

氏名	Le Quang		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8254 号		
学位授与年月	平成 29年 3月 24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	Otoprotection in Cisplatin-Induced Ototoxicity via Ceramide-1-Phosphate and Peroxiredoxin I（セラミド-1-リン酸、 ペルオキシレドキシシン1によるシスプラチン耳毒性における内耳保護）		
主査	筑波大学教授 薬学博士	熊谷 嘉人	
副査	筑波大学教授 医学博士	大鹿 哲郎	
副査	筑波大学教授 博士（理学）	松本 正幸	
副査	筑波大学助教 博士（工学）	山田 朋子	

論文の内容の要旨

Le Quang 氏の論文は抗腫瘍薬シスプラチンの内耳毒性防御におけるセラミド-1-リン酸 (C1P) と抗酸化作用を有するペルオキシレドキシシン I (PrxI) の効果について検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

(目的)

シスプラチンは実験腫瘍系において最も活動性のある抗腫瘍薬の一つであり、広く臨床使用されている。シスプラチンを用いた腫瘍の治療は効果的であるが、副次作用も認められ、内耳毒性は恒久的な聴力障害をきたすため、シスプラチンの主要な副次作用である。シスプラチンは内耳において、有毛細胞、外側壁およびラセン神経節細胞等の主要構造物を障害し、聴力障害を惹起する。シスプラチンの耳毒性は多因子によるが、近年アポトーシスと酸化ストレスの関連性が示されている。本研究において、著者はシスプラチンによる内耳毒性に対する保護手段を検討することを目的とし、特にアポトーシス経路を調節する C1P と抗酸化作用を有する PrxI について検討した。

(対象と方法)

著者は3から5日齢の C57BL/6J マウスから蝸牛基底回転を採取している。対照実験を 100 μ M の C1P、NVP-231、さらに溶媒（1%エタノール、0.04% DMSO）自体がシスプラチンを付加しない対照蝸牛に影響を与えないことを確認するために施行している。著者は C1P、NVP-231 およびセラミドの効果を検討するため、5~10 μ M のシスプラチンで 48 時間の蝸牛の期間培養を行っている。pAkt、Akt、pERK1/2、ERK1/2 の活性化はウェスタンブロットで検討している。

Prx の作用の検討には、C57BL/6J マウスに加え、PrxI 欠損マウスも用いている。著者は各 Prx サブタイプの発現を RT-PCR 法により確認し、シスプラチン治療による各サブタイプの発現の変化

を検討している。さらに、PrxI のタンパク発現を免疫組織学的に検討し、蝸牛有毛細胞と線維芽細胞の各シスプラチン濃度における生存率を野生型と PrxI 欠損マウスで比較している。

(結果)

C1P 研究において、著者は C1P が Akt および ERK1/2 経路を活性化し、シスプラチンによる内耳有毛細胞死を有意に抑制することを明らかにしている。シスプラチンを付加しない対照蝸牛において、セラミドは蝸牛有毛細胞の生死に高濃度でのみ影響を与えることを見出している。一方、対照蝸牛では NVP-231 は有意な耳毒性を及ぼさないことを確認している。著者はセラミドをシスプラチンと同時に投与すると、蝸牛有毛細胞死を有意に増加させること、シスプラチンおよびセラミドに NVP-231 を同時に投与すると、有毛細胞のアポトーシス死が著明に増加することを明らかにしている。

一方、Prx については、6 サブタイプすべての mRNA がコルチ器に発現しており、サブタイプ中では Prx I と Prx II の 2 サブタイプの発現が最も豊富であり、48 時間のシスプラチン治療により Prx I サブタイプの発現が増加することを著者は見出している。免疫組織学的検討において、著者は Prx I サブタイプのタンパク発現を、幼若マウス、成獣において、コルチ器、線維芽細胞およびラセン神経節細胞のそれぞれで確認している。シスプラチン治療に対して線維芽細胞では、Prx I 欠損マウスにおいて野生型に対してより脆弱であったが、蝸牛有毛細胞では両者に有意な差は認められないことも明らかにしている。

(考察)

シスプラチン負荷に対して、蝸牛有毛細胞は NF- κ B、IAP、Bcl-2 および p53 経路に関連する抗アポトーシス遺伝子を誘導し、これは PI3-K/Akt 経路により活性化されることが知られている。本研究において、著者は C1P が Akt 経路を活性化し、このことが蝸牛有毛細胞保護効果の一因と推察している。また、細胞増殖や細胞保護に関与する ERK1/2 経路の活性化も認められており、著者は C1P の保護効果に寄与していると考察している。C1P とセラミドのバランスも蝸牛有毛細胞の生死の決定に重要であり、NVP-231 を同時投与することでシスプラチンやセラミドの耳毒性が増強されたことは、この考えを強く支持している。著者はセラミドキナーゼの抗腫瘍薬の使用を考えるに際して、有毛細胞に対する副次作用を考慮する必要があると考えている。

Prx の検討において、著者はシスプラチン投与により Prx I mRNA が誘導され、このことがシスプラチンによる酸化障害に対して Prx I がその回復を促すことで防御作用を有することを示唆している。さらに、Prx I 欠損マウスでは野生型に対して、有毛細胞では保護作用は確認できなかったものの、線維芽細胞がシスプラチン治療で減少したことから、Prx I の外側壁における防御作用を支持している。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は C1P と Prx I がシスプラチンによる内耳毒性保護に重要であることを明らかにしている。すなわち、C1P はアポトーシス経路を調節し、Prx I は抗酸化システムに保護作用が起因していると考えている。シスプラチン内耳毒性は様々な機序により惹起される。従って、どのようにシスプラチンが作用するかを理解することにより、効果的な保護機序をより確立していくことができると思われる。

平成 28 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。

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。