

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592541

研究課題名(和文) 蝸牛発生、機能維持、蝸牛障害におけるセラミド、スフィンゴ脂質の影響の検討

研究課題名(英文) Effects of ceramide and sphingolipids on cochlear injury

研究代表者

田淵 経司 (Tabuchi, Keiji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80361335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛においてセラミド、スフィンゴシンがシスプラチンによる蝸牛毒性に対し、細胞障害を増悪させることが分かった。また、セラミド、スフィンゴシンはシスプラチンとの併用でなく、単独で投与しても、高用量では蝸牛に対して細胞毒性を呈した。一方でセラミド 1-リン酸(C1P)はシスプラチンによる蝸牛毒性を軽減する作用を呈した。セラミドをC1Pへと代謝するセラミドキナーゼ阻害により、セラミドの蝸牛毒性は著明に増悪することから、蝸牛における内因性のセラミドキナーゼはセラミドをC1Pへと蝸牛内で代謝することで、蝸牛を耳毒性から保護していると推察された。

研究成果の概要(英文)：Ceramide and sphingosine increased cochlear injury induced by cisplatin. Ceramide and sphingosine themselves induced cochlear injury without cisplatin at high doses. On the other hand, ceramide-1-phosphate (C1P) decreased cochlear injury induced by cisplatin. Inhibition of ceramide kinase which converted ceramide to C1P significantly worsened cochlear injury induced by ceramide. Intrinsic cochlear ceramide kinase protected the cochlea against ototoxicity.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：内耳 蝸牛 シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤であるシスプラチンは頭頸部癌や婦人科系癌等幅広い悪性腫瘍疾患に対し使用されている。また、アミノグリコシド系抗菌薬も感染性疾患に対し、世界的に現在広く臨床使用されている。しかしながら、蝸牛の感覚受容細胞である有毛細胞はこれらシスプラチンやアミノグリコシド系抗菌薬等の薬物に対して易受傷性を示し、本薬剤の使用により、内耳性難聴が惹起されることがある。このために、これらの薬剤の臨床使用が制限されることも多い。本障害については内耳蝸牛では有毛細胞が薬剤により障害され、カスパーゼ3等一連のカスパーゼ活性化から最終的に有毛細胞のアポトーシス死が惹起されていることが報告されてきている。耳毒性物質により引き起こされた有毛細胞のアポトーシス死による感音難聴は現在非可逆的障害であり、恒久的な感音難聴をきたし、障害を受けた方々に重大な音声会話によるコミュニケーション障害を残す。

セラミド、スフィンゴシン、セラミド 1 - リン酸、スフィンゴシン-1 - リン酸をはじめとする一連のスフィンゴ脂質は、近年様々な臓器で生理活性物質として働くことが報告されている。感染症やリウマチ・膠原病などの炎症性疾患や悪性腫瘍をはじめとする多くの疾患群でこれらのスフィンゴ脂質が様々な作用を呈し、疾患に影響を与えていることも報告されてきている。一連の報告からはスフィンゴ脂質群を調整することで疾患の経過を変えることができることが示唆されており、創薬ターゲットの一つと目されている。一連のスフィンゴ脂質はセラミドから代謝されて産生されるため、セラミドの産生経路については注目されている。

その一方で、内耳蝸牛におけるスフィンゴ脂質の役割についての報告は非常に少なく、内耳性疾患においてセラミドをはじめとする一連のおスフィンゴ脂質がどのような経路で産生され、また産生されたスフィンゴ脂質の蝸牛障害における役割については不明な点が多い。

2. 研究の目的

上述のように耳毒性物質による有毛細胞障害は多くの場合不可逆的であり、障害患者に恒久的な内耳性難聴をきたし、会話コミュニケーションを著明に障害する。そのため、シスプラチンやアミノグリコシド系抗菌薬などの耳毒性物質による蝸牛有毛細胞障害について、スフィンゴ脂質の関与について検討した。まず、内耳蝸牛が障害を受けた際のスフィンゴ脂質の生成、代謝経路について検討した。さらにセラミドやセラミドから代謝される一連のスフィンゴ脂質の蝸牛障害に対する効果、影響について検討した。

3. 研究の方法

研究には生後 3~5 日の幼若マウスもしくは生後 3~5 日の幼若ラットを使用した。まず深麻酔下に蝸牛を摘出し、蝸牛コルチ器を採取した。

採取したコルチ器について蝸牛有毛細胞の器官培養を CO2 インキュベータで 5%CO2 下で行った。シスプラチンやアミノグリコシド抗菌薬の耳毒性物質を培養液に各種濃度で負荷することで、内耳有毛細胞障害を惹起した。同じく培養液中に各種スフィンゴ脂質を投与し、その効果を観察した。スフィンゴ脂質の代謝酵素の促進・阻害薬についても併せてその効果を観察した。

蝸牛でのスフィンゴミエリナーゼの酵素活性を計測し、活性化を観察した。蝸牛における各種スフィンゴ脂質の代謝酵素について、PCR 法、免疫組織を用い、その存在部位を検討した。

4. 研究成果

内耳においてセラミドがスフィンゴ脂質生成経路のキーファクタとして働いていることが分かった。免疫組織学的に検討するとスフィンゴミエリナーゼは有毛細胞を含む蝸牛で広く存在していた。スフィンゴミエリナーゼは酸性、中性、アルカリ性の 3 種類のスフィンゴミエリナーゼの存在が知られているが、耳毒性物質の投与により、中性スフィンゴミエリナーゼが蝸牛において毒性物質投与後早期、及び遅発性の二峰性に強く活性化されていることが分かった。アミノグリコシド抗菌薬であるゲンタマイシンを器官培養液に負荷すると、コルチ器において中性スフィンゴミエリナーゼの活性化が速やかに認められ、投与開始 20 分後に活性の早期ピークをつけた。スフィンゴミエリナーゼ活性は一度低下するもののその後再びスフィンゴミエリナーゼは投与開始後 48 時間まで再び活性化することが観察された。スフィンゴミエリナーゼ阻害薬をゲンタマイシンと同時に投与すると、内耳におけるセラミド産生が阻害された。セラミドの de novo 合成経路の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について薬理的に阻害を行っても内耳にセラミド産生が起こり、蝸牛に影響を与えなかった。以上の結果から内耳ではセラミドは de novo 合成経路からでなくスフィンゴミエリナーゼにより、細胞膜に豊富に存在するスフィンゴミエリンより生成されることが分かり、耳毒性物質が内耳において二峰性に酵素活性を上昇させていることが分かった。

スフィンゴミエリナーゼにより産生されたセラミドの内耳における影響を検討した。セラミドを内耳に単独投与した場合に、高用量の投与ではセラミド自体が蝸牛有毛細胞のアポトーシスを惹起することが分かった。

セラミドをシスプラチンやゲンタマイシンと同時に投与すると、シスプラチンやゲンタマイシン単独で投与した場合に比べて、有意に有毛細胞障害を増強した。この耳毒性物質に対する毒性の増強効果はセラミド単独では蝸牛に影響を与えなかったような低用量のセラミドの投与によっても観察された。

さらにセラミドからセラミドキナーゼによって代謝されて生成されるスフィンゴシンについて内耳への影響を検討した。スフィンゴシンはシスプラチンによる蝸牛毒性に対し、細胞障害を増悪させることが分かった。この代謝を行うセラミドキナーゼについてはセラミドキナーゼ1、セラミドキナーゼ2の2タイプが存在していることが分かっている。内耳においてPCR法で検討すると、その両者の発現が認められた。また、スフィンゴシンはシスプラチンとの併用でなく、単独で投与しても、高用量では蝸牛に対して細胞毒性を呈した。

同様にセラミドから代謝生成されるセラミド1-リン酸の内耳における効果について検討した。セラミド1-リン酸は単独投与では蝸牛有毛細胞に影響を与えなかった。セラミド1-リン酸をシスプラチンと同時に投与した場合、セラミド1-リン酸はシスプラチンによる蝸牛毒性を軽減する作用を呈した。

セラミド単独では蝸牛に高容量でのみ有毛細胞障害をきたすが、セラミドからセラミド1-リン酸への代謝を阻害したうえでセラミドを投与すると、セラミドによる有毛細胞障害は低用量でも著明に観察された。このことは内耳において、セラミドは耳毒性物質により活性化させるスフィンゴミエリナーゼにより産生されるが、産生されたセラミドはセラミド1-リン酸などの内耳を保護する効果を有するスフィンゴ脂質へと速やかに代謝されていることが推察された。

スフィンゴシンより代謝産生されるスフィンゴシン1-リン酸についても、蝸牛有毛細胞障害に対する効果を検討した。スフィンゴシン1-リン酸は単独投与では蝸牛有毛細胞に影響を与えなかった。スフィンゴシン1-リン酸をシスプラチンやゲンタマイシンと同時に投与した場合には、これらの耳毒性物質に夜蝸牛有毛細胞に対して、スフィンゴシン1-リン酸は保護的に働き、耳毒性物質によって惹起される蝸牛有毛細胞のカスパーゼ3の活性化を軽減し、有毛細胞のアポトーシス死を軽減することが認められた。

スフィンゴシン1-リン酸は一般的に5タイプの受容体を介して作用を発現することが知られている。スフィンゴシン1-リン酸の蝸牛有毛細胞の保護効果について、どの受容体を介する作用か検討した。蝸牛における受容体の発現を検討したところ、スフィンゴシン1-リン酸受容体1~3の蝸牛における発現が認められ、受容体4、5の発現は蝸牛において観察されなかった。スフィン

ゴシン1-リン酸受容体1~3のそれぞれの阻害薬を用いて作用を検討したところ、スフィンゴシン1-リン酸の蝸牛に対する保護効果はスフィンゴシン1-リン酸受容体2を介する作用であることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

1. Le Q, Tabuchi K, Hara A. The role of peroxiredoxin I in cisplatin-induced ototoxicity. *Auris Nasus Larynx*. 2017;44:205-212. 査読有
2. Tani K, Tabuchi K, Hara A. Hair cell loss induced by sphingosine and a sphingosine kinase inhibitor in the rat cochlea. *Neurotox Res*. 2016;29:35-46. 査読有
3. Chi le NU, Tabuchi K, Nakamagoe M, Nakayama M, Nishimura B, Hara A. Ceramide/sphingomyelin cycle involvement in gentamicin-induced cochlear hair cell death. *Arch Toxicol*. 2015;89:415-421. 査読有
4. Nakayama M, Tabuchi K, Hoshino T, Nakamagoe M, Nishimura B, Hara A. The influence of sphingosine-1-phosphate receptor antagonists on gentamicin-induced hair cell loss of the rat cochlea. *Neurosci Lett*. 2014;561:91-95. 査読有

[学会発表](計 12件)

1. 田淵 経司, 谷 紘輔, 中山 雅博, 原 晃. シスプラチンによる蝸牛外有毛細胞アポトーシスに対するセラミド-1-リン酸の影響. 第60回 日本聴科学会総会学術講演会 2015年10月21日 京王プラザホテル(東京都新宿区).
2. 谷 紘輔, 田淵 経司, 原 晃. 内耳毒性による蝸牛有毛細胞障害に対するスフィンゴ脂質の効果. 第60回 日本聴科学会総会学術講演会 2015年10月21日 京王プラザホテル(東京都新宿区).
3. 田淵 経司, Quang Le, 原 晃. シスプラチンによる蝸牛有毛細胞障害に対するセラミド-1-リン酸の保護効果. 第116回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2015年5月20日 東京国際フォーラム(東京都千代田区).
4. 谷 紘輔, 田淵 経司, 原 晃. シスプラチ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キナーゼ阻害薬、及びスフィンゴシンの効果. 第59回 日本聴科学会総会学術講演会 2014年11月27日 海峡メッセ下関(山口県下関市).
5. Tani K, Tabuchi K, Hara A. The

influence of sphingosine kinase inhibitor and sphingosine on cisplatin-induced hair cell loss of the rat cochlea. Inner ear biology workshop 2014/11/02 Kyoto international conference center (Kyoto, Japan).

6. 谷 紘輔, 田淵 経司, 原 晃. シスプラチ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キナーゼ阻害剤の効果. 第3回 耳鳴り・難聴カンファレンス 2014年8月9日 ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区).
7. 谷 紘輔, 田淵 経司, 原 晃. シスプラチ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の効果. 第115回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術口演会 2014年5月14日 ヒルトン福岡シーホークホテル(福岡県福岡市).
8. 田淵 経司, Nguyen Le Uyen Chi, 西村 文吾, 中馬越 真理子, 中山 雅博, 原 晃. ゲンタマイシン耳毒性におけるセラミド合成経路. 第115回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術口演会 2014年5月14日 ヒルトン福岡シーホークホテル(福岡県福岡市).
9. Le Nguyen Uyen Chi, 田淵 経司, 中馬越 真理子, 西村 文吾, 中山 雅博, 和田 哲郎, 原 晃. ゲンタマイシン誘発性蝸牛毛細胞の細胞死に及ぼす中性スフィンゴミエリナーゼ阻害薬の効果. 第21回日本耳科学会総会学術講演会 2013年11月24日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市).
10. 谷 紘輔, 田淵 経司, 原 晃. 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キナーゼ阻害剤の効果. 第21回日本耳科学会総会学術講演会 2013年11月24日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市).
11. 谷 紘輔, 田淵 経司, 原 晃. シスプラチ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キナーゼ阻害剤の効果. 第58回 日本聴科学会総会学術講演会 2013年9月27日 ヒルトン福岡シーホークホテル(福岡県福岡市).
12. 中山 雅博, 田淵 経司, 西村 文吾, 中馬越 真理子, 原 晃. 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. 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術口演会 2013年5月15日 ロイトン札幌(北海道札幌市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田淵 経司(TABUCHI Keiji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 80361335

(2)研究分担者

原 晃(HARA Akira)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 10156474

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()