

【別紙 2】

審査の結果の要旨

氏名 檜尾 明憲

本研究では、アポトーシス抑制的にはたらく Bcl-x_L タンパクの活性を強化したタンパク FNK に細胞取り込みを促進させる Protein Transduction Domain (PTD) を付加し作成した、PTD-FNK タンパクを内耳へ導入することを試み、内耳アポトーシス抑制による急性聴覚障害予防を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *in vitro* において硫酸カナマイシン (KM) による蝸牛有毛細胞障害モデルを作成し PTD-FNK がアポトーシスの抑制・有毛細胞の障害を予防できるかを検討した。培養細胞を KM, KM+FNK, KM+PTD-FNK および溶媒のみを加えた培養液で培養し 10 時間後に caspase-9 の発現・12 時間後に有毛細胞の障害率を検討したところ、KM 単独、FNK (PTD の付加していないもの) に KM を加えた場合では caspase-9 の発現が多数認められたのに対して、PTD-FNK を加えた群では有意に caspase-9 の発現が抑制されていた。細胞数の比較でも外有毛細胞で PTD-FNK 投与群は有意に障害を抑制することが示された。
2. *in vivo* 全身投与 (腹腔内) における PTD-FNK の取り込みを PTD-FNK に myc Tag を挿入した PTD-myc-FNK を作製し、myc 抗体を用いて免疫染色を行い検討したところ、コルチ器・らせん神経節細胞をはじめとして蝸牛内への取り込みが確認された。染色性は投与 1 時間後から認められ、3 時間後をピークとして 6 時間後には消失した。PTD を付加しない FNK 単独での染色性は確認できなかった。PTD-FNK は PTD を付加することで全身投与により内耳血液関門を通過し蝸牛内へ到達することができることが示された。
3. PTD-FNK 全身腹腔内投与による急性感音難聴に対する効果を検討した。白色モルモットに対して KM とエタクリン酸 (EA) を投与して作成した急性感音難聴モデルで PTD-FNK を KM 投与 1 時間前から 7 時間後にわたって複数回投与し、2 週間後における ABR 閾値変化、蝸牛有毛細胞の障害率を検討したところ、PTD-FNK 投与群で有意に聴力閾値上昇が抑制された。細胞の障害率も PTD-FNK 投与群で有意に抑制され、全身投与により PTD-FNK は KM, EA による有毛細胞障害・聴覚障害を抑制することが示された。
4. アポトーシス進行の指標である Cleaved PARP の発現を同様の白色モルモット急性感音難聴モデルで確認したところ、PTD-FNK 投与群は外有毛細胞において有意に Cleaved PARP の発現が減少しており、*in vivo* においても PTD-FNK のアポトーシス抑制効果が示された
5. *in vivo* 鼓室内投与により PTD-FNK の蝸牛内への取り込みを検討した。

PTD-myc-FNK をゼラチンスポンジに浸して蝸牛正円窓膜上に留置、蝸牛内の分布を免疫組織学的に検討したところ、コルチ器をはじめとして、らせん神経節細胞、血管条、らせん靭帯、蝸牛外側壁に取り込まれていることが示された。染色性は1時間後から認められ24時間後まで有意に認めた。薬剤を投与した正円窓近傍である基底回転部分と比較的距離のある第二回転、第三回転での染色性には投与1時間後・6時間後いずれも有意差はなかった。一方で、PTDを付加しないmyc-FNKでは染色性は認めなかった。PTD-FNKタンパクはPTDを付加することで正円窓膜を透過することが可能であることが示され、鼓室内・正円窓経由の投与方法でもPTD-FNKは比較的早期に蝸牛全体に広がり、かつ全身投与に比べてより長時間蝸牛内に分布することが示された。また、PTD-myc-FNKを投与した反対側の耳では染色性は認めず、蝸牛正円窓膜上に投与したPTD-myc-FNKは一側の耳に限局することが示された。

6. PTD-FNK 鼓室投与による急性難聴予防効果を検討した。白色モルモット KM, EA 投与急性感音難聴モデルで KM 投与1時間前に正円窓膜上にゼラチンスポンジに浸透させた PTD-FNK を置き、2週間後の ABR 聴力変化と蝸牛有毛細胞の障害率を検討した。PTD-FNK 投与側の耳では聴力閾値上昇が抑えられており、有毛細胞の障害率についても PTD-FNK 投与側で障害率が有意に軽減した。以上のことから PTD-FNK は鼓室内投与という局所的な投与方法においても KM, EA による有毛細胞障害・聴覚障害の抑制が可能であることが示された。

以上、本論文では PTD 付加技術を用いたタンパク治療の可能性について検討し、抗アポトーシスタンパク PTD-FNK がアミノ配糖体による内耳有毛細胞アポトーシス・難聴を予防することを明らかにした。本研究はこれまで未開拓であった内耳タンパク治療の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。