

論文の内容の要旨

論文題目 Roles of Programmed Cell Death in Ototoxicity (中毒性難聴におけるプログラム細胞死の役割)

氏名 Dalian Ding

耳毒性の薬剤あるいは化学薬品によって引き起こされる蝸牛細胞死は、主にネクローシスとアポトーシスという2つの異なる細胞死メカニズムを経て発生すると考えられている。ネクローシスとは、外傷・感染・血流減少等により、細胞内タンパク質の変性や傷ついた細胞内での酵素消化を伴って細胞が機能不全に陥り、壊死する現象である。この過程は非プログラムの起こる。一方、アポトーシスは予め定められた細胞内の自死プログラムによっておこる細胞死プロセスのことで、老化、局所貧血、有害化学物質、激しい音、放射線治療、衝撃波、重金属など様々な原因によるストレスや細胞死シグナルに応答して起きる。本博士論文研究の最終的な目的は、中毒性難聴におけるプログラム細胞死に対して、分子生物学の立場から新しい基礎的知見を得ることである。

第1章では、モルモットの蝸牛細胞においてカナマイシン投薬がおよぼす障害について述べる。カナマイシンはアミノ酸配糖体系抗生物質であり、内耳だけでなく腎臓にも大きな障害を与える。モルモットに体重1 kgあたり400 mgのカナマイシン硫酸塩を10日間にわたって筋肉内注射で投与すると、蝸牛においてネクローシスとアポトーシスの両方による細胞死が観察された。カナマイシンの長期投与もミトコンドリアの過度の膨張やリソソームの膨張と破裂を引き起こした。このリソソームの破裂が原因となって、細胞質への加水分解酵素の放出とその他の細胞小器官の消化が起き、ネクローシスが誘導された。一方、他のアミノ酸配糖体系抗生物質であるゲンタマイシン40 mg/mlのマウスへの短期投与では、急性のアポトーシスがみられた。生体外では、培養蝸牛組織を0.1 mM~3 mMのゲンタマイシンで24時間処理したときにも急性のアポトーシスが起きた。

第2章では、血液内耳関門を開く薬剤と同時投与した際の耳毒性薬剤の障害作用について研究した。たいていの体外性の化学薬品は血液内耳関門に阻まれるため、蝸牛に到達することができない。利尿剤や、高血圧・緑内障・浮腫の薬剤は、血液内耳関門への血液供給を減らしたり、蝸牛外側壁に局所貧血を起こしたりすることで選択的に血液内耳関門を通過することができる。それ故に、エタクリン酸やフロセミドなどの広く利用されている利尿剤は血液内耳関門を開き、耳毒性薬剤を蝸牛に到達させる。チンチラにゲンタマイシンとエタクリン酸を同時に投与すると、血液内耳関門が崩壊するに従って内耳リンパ液におけるゲンタマイシンの濃度と蓄積量が増加した。ゲンタマイシンとエタクリン酸の同時投与から12時間後の中央階と基底膜では、不動繊毛とクチクラ板の破壊を含む大規模な有毛細胞の減少がみられた(イラスト1)。アポトーシスの形態的な特徴であるDNAの凝集と

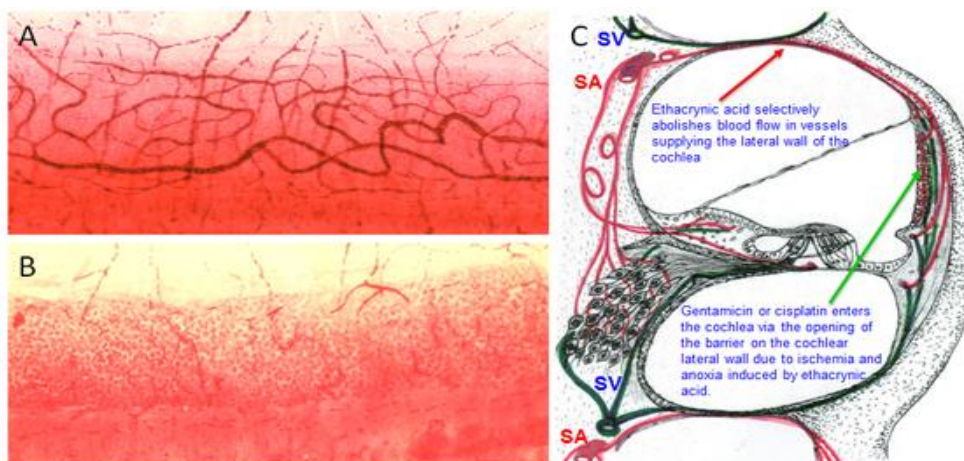


Illustration 1. Cochlear barrier on the cochlear lateral wall can be temporarily eliminated by ethacrynic acid (EA) intravenous injection. (A) Appearance of blood flow in vessels of stria vascularis in normal guinea pig. (B) Appearance of ischemia in lateral wall vessels 30 min after EA injection. (C) The arterioles and capillaries supplying the cochlear lateral wall can be selectively blocked by EA (red arrow) that leading to ischemia and anoxia in epithelium of stria vascularis (green arrow), which the permeation of ototoxic chemicals into the cochlea cavity is enhanced (SV indicates spiral vein; SA indicates spiral arteries).

分裂も、同時投与後 5-6 時間でみられた。さらに同時投与から 4 時間後の基底膜ではコハク酸脱水素酵素レベルが著しく低下したが、これらの初期の変化はミトコンドリアから細胞質へのシトクロム c の放出とカスパーゼ 9 とカスパーゼ 3 レベルの上昇に伴うものである。これらの結果をまとめると、ゲンタマイシンによる激しい蝸牛損傷において、ミトコンドリアのアポトーシスが主だった役割を果たしていると推測される(イラスト 2)。

第 3 章では、ガンの化学療法で広く使われるシスプラチンが蝸牛において細胞死を引き起こすことを示す。先行研究ではシスプラチン単体は血液内耳関門に阻まれ、動物実験モデルで著しい蝸牛損傷を引き起こすことはなかった。しかしながら、シスプラチンとエタクリン酸を同時に投与すると、エタクリン酸が血液内耳関門を破壊するに従ってシスプラチンの耳毒作用が著しく高まった。この研究結果と合致する結果として、0.8 mg/kg のシスプラチンと 40 mg/kg のエタクリン酸のチンチラへの同時投与は、外有毛細胞と内有毛細胞の広範囲にわたる障害を引き起こした。同時投与から 6 時間後の有毛細胞の核は比較的变化がなかった。同時投与から 12 時間後には核の凝集と分裂がみられ、48 時間後には大多数の細胞核が消滅した。アポトーシスの誘導因子であるカスパーゼ 8 と、膜細胞死の受容体である TRADD は、同時投与から 6 時間後以降の有毛細胞でみられた。カスパーゼ 8 の発現レベルは同時投与から 24 時間後に上昇したが、投与 48 時間後には劇的に低下した。アポトーシスを実際に行うカスパーゼ 3 とカスパーゼ 6 は、カスパーゼ 8 の下流で働くが、同時投与から 12-24 時間後の有毛細胞でみられた。これらにより、シスプラチンとエタクリン酸の同時投与は、TRADD とカスパーゼ 8 によって発動されるアポトーシス経路を誘導し、カスパーゼ 3 とカスパーゼ 6 が働き、有毛細胞の消失がおけると推測される(イラスト 2)。

第 4 章では、抗マラリア薬メフロキンがアポトーシスによって蝸牛細胞死を引き起こすことを示す。メフロキンは広く使われている抗マラリア薬である。しかし、臨床報告はメフロキンに耳毒性や神経毒性があることを示唆している。本研究では、ラットにおいてメフロキンの投与量に従って蝸牛有毛細胞の消失がひきおこされることを見出した。メフロキ

ン濃度が上昇するにつれ、有毛細胞の消失は基底から蝸牛頂、外有毛細胞から内有毛細胞へと進行した。メフロキンはまた、蝸牛神経節と聴神経線維にも投与量依存的に急激に障害を与えた。凝集か分裂あるいはその両方が起こった核とアポトーシス下でみられる形態学的特徴を備えた細胞が、有毛細胞、蝸牛神経節、支持細胞で観察された。さらに、カスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 3 が、メフロキンは投与 24 時間後の有毛細胞と蝸牛神経節で非常に多く発現していた。これらの結果は、メフロキンはカスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 3 を活性化することで、出生直後のラットの知覚細胞と神経細胞双方に障害を与えることを示すものである(イラスト 2)。

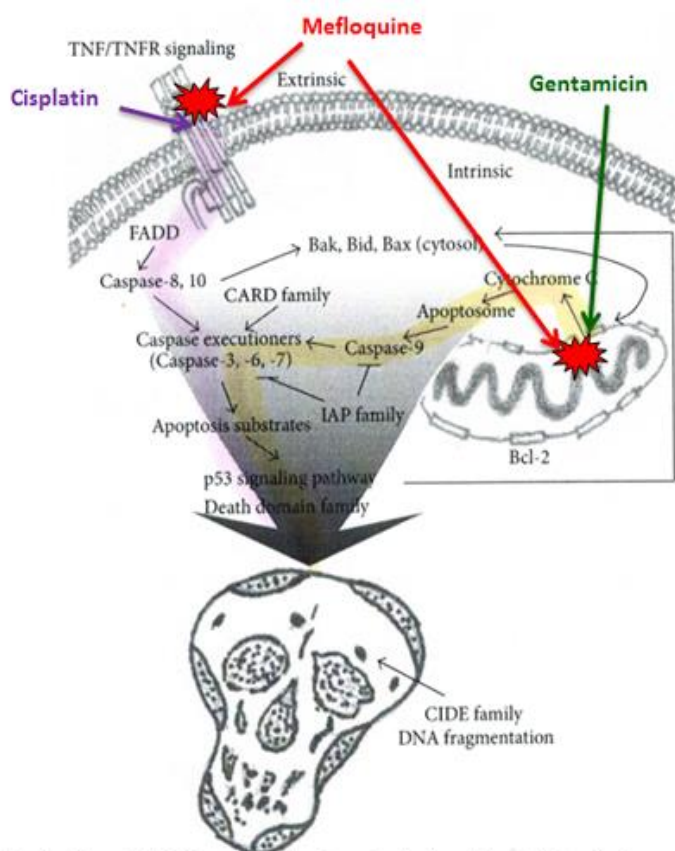


Illustration 2. Different toxic chemicals lead to cell death to different apoptotic pathways. For example, gentamicin aimed at the mitochondria and caused cytochrome c release and lead to the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway via initiator caspase-9. In contrast, cisplatin aggravated the cell death receptors on the cell membrane, which lead to the extrinsic apoptotic pathway via initiator caspase-8. Whereas, both extrinsic pathway and intrinsic pathway can be triggered by mefloquine. The activity of initiator caspase-8 or caspase-9 activate downstream executioner caspases such as caspase-3 and caspase-6 as a chain reaction of caspases cascade. Eventually, a wide network of apoptotic signals released that act through numerous apoptotic pathways at the confluence of p53 apoptotic pathway.

神経に作用する薬剤や化学物質には耳毒性があることが古くから知られてきた。しかし、その価格の低さから、発展途上国を中心に世界中で未だに広く使われている。不幸なことに、現時点では薬剤や化学物質を原因とする難聴に治療法はない。さらに、これらの薬剤や化学物質がどのように蝸牛に障害を引き起こすかのメカニズムは詳しくわかっていない。本研究の結果は、カナマイシン、ゲンタマイシン、シスプラチン、メフロキンという、広く使われている薬剤の全てが、特異的なプログラム細胞死経路を通じて蝸牛有毛細胞または神経、あるいはその両方に障害を与えうることを示した。カナマイシン、ゲンタマイシン、シスプラチン、メフロキンが抗生物質や抗ガン剤、抗マラリア剤として使われ続けているからこそ、中毒性難聴の細胞レベル、分子レベルのメカニズムを理解し、薬害性難聴の治療法を確立することが早急に求められる。本研究で示したデータは、耳毒性薬剤による蝸牛障害と難聴に対して基礎的なメカニズムへの理解を深めるものであり、この恐ろしい副作用の根絶に繋がることが期待される。