

審査の結果の要旨

氏名 丁 大連

本論文の目的は、アミノグリコシド系抗生物質（カナマイシン、ゲンタマイシン）、抗がん剤（シスプラチン）、抗マラリア薬（メフロキン）により引き起こされる薬剤性内耳障害におけるプログラム細胞死のメカニズムを組織化学、細胞生物学、分子生物学の手法により解明することである。本論文は4章構成であり、第1章の緒言において耳毒性薬剤によって引き起こされる蝸牛細胞死に関する背景が述べられ、続く第2～4章において申請者が行った薬剤性内耳障害におけるプログラム細胞死のメカニズムの解析に関する実験方法、結果、考察が述べられている。

第3章の第1～6節にて、アミノグリコシド系抗生物質（カナマイシン、ゲンタマイシン）投与による細胞死について解析が行われ、カナマイシンまたはゲンタマイシンの長期投与によりモルモットの内耳にてネクロシスとアポトーシスの両方の細胞死が生じることが示された。ネクロシスを起こした細胞の細胞小器官の形態観察や抗生物質の細胞内局在から、アミノグリコシド系抗生物質はミトコンドリアやリソソームの膨張や破裂を誘発しリソソーム中の加水分解酵素群が細胞質に放出されることによりネクロシスが誘導されるというモデルが提唱された。一方、カナマイシンやゲンタマイシンの短期投与ではアポトーシスが観察された。次に、ゲンタマイシンを血液-内耳関門を開く作用のある利尿剤（エタクリン酸）と同時投与する場合に起きるアポトーシスについての解析が行われ、同時投与により内耳リンパ液におけるゲンタマイシン濃度が顕著に上昇し、同時投与後6時間からアポトーシスの形態的な特徴であるDNAの凝集と分裂が観察され、12時間後に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。ゲンタマイシンはミトコンドリアを標的としてシトクロムcを漏出させ、カスパーゼ9を経てカスパーゼ3を活性化することにより、アポトーシスを誘導するというモデルが提唱された。

第3章の第7～8節では、抗がん剤シスプラチン投与による細胞死について解析が行われ、シスプラチンとエタクリン酸の同時投与によりシスプラチンの耳毒性が高まり、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す

ことが示された。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。このアポトーシスの初期には TRADD (Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein) とカスパーゼ 8 を経由してカスパーゼ 3 を活性化する経路が、後期にはカスパーゼ 9 を経由してカスパーゼ 3 を活性化する経路が主に働くことが示された。

第 3 章の第 9～10 節では、抗マラリア薬メフロキン投与による細胞死について解析が行われた。メフロキンは広く使用されている抗マラリア薬であるが耳毒性や神経毒性があることが知られている。本研究にて、メフロキン投与によりラットの蝸牛有毛細胞が消失することが示され、メフロキン濃度の上昇により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アポトーシスを誘導した。メフロキン投与 24 時間後の有毛細胞と蝸牛神経節ではカスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 3 が非常に多く発現しており、これらの結果から、メフロキンによりカスパーゼ 8 とカスパーゼ 9 の両方の経路が活性化され、両経路からカスパーゼ 3 を活性化することにより、アポトーシスを引き起こすことが示された。

第 4 章では、第 3 章の実験結果に基づいて、アミノグリコシド系抗生物質 (カナマイシン、ゲンタマイシン)、シスプラチン、メフロキンにより誘導される内耳の細胞死のメカニズムについての考察が述べられている。

本研究の結果から、抗生物質、抗がん剤、抗マラリア薬として広く使われている上記の薬剤が、それぞれ特定の細胞死メカニズムおよび細胞死経路により内耳細胞に障害を与えることが示された。

本研究により得られた知見は、薬剤性内耳障害における細胞死のメカニズムについて、組織、細胞、分子レベルにおける理解を深め、薬害性難聴の治療法の確立に貢献するものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。