

【別紙 1】

論文の内容の要旨

論文題目 耳毒性物質による前庭神経節細胞障害に対する神経栄養因子の神経保護効果についての研究

氏 名 井上 亜希

アミノ配糖体系抗生剤や抗腫瘍薬など様々な薬剤が耳毒性を持つことが知られており、聴覚系や前庭系に両側性の不可逆性の障害を起こし、難聴やめまいを呈しうるが、いまだ耳毒性物質から前庭系を保護する治療については確立されていない。これらの薬剤は活性酸素 (ROS) の産生を介して、内耳の感覚細胞である有毛細胞だけでなく一次ニューロンも傷害することが知られており、ゲンタマイシン (GM) やシスプラチン (Cis) の投与で前庭神経節細胞 (VGN) の細胞数の著明な減少が報告されている。神経栄養因子は末梢神経系と中枢神経系の両方で神経細胞の生存や分化に重要な役割を果たしており、神経保護効果を持つことが明らかとなって以降、様々な神経疾患への治療への応用の研究が進められている。神経栄養因子のうち特に brain-derived neurotrophic factor (BDNF) と neurtorphin-3 (NT-3) が VGN の細胞生存や分化に重要であり、耳毒性物質投与時の前庭神経節細胞障害に対しても神経保護効果を持つことが様々な実験で明らかとなっており、耳毒性からの前庭神経節細胞保護に対する神経栄養因子の臨床応用の可能性が示唆されている。しかし神経栄養因子の神経細胞に対する作用は発達段階に依存して変化していることが示されており、耳毒性物質による前庭障害からの神経保護効果も発達に伴い変化している可能性が示唆される。そのため耳毒性物質投与による前庭神経節障害からの外因性神経栄養因子による神経保護

効果の臨床応用を検討するにあたっては、神経保護効果の発達時期による変化とそのメカニズムについて明らかにする必要性があると考えられた。

今回我々は異なる発達時期のラットの VGN を用い、神経栄養因子の VGN に対する作用の発達段階による変化について実験 1 で検討し、ついで神経栄養因子の耳毒性物質による前庭神経節細胞障害に対する保護効果の発達段階による変化について実験 2 で検討した。さらに外因性神経栄養因子の作用の発達時期による変化のメカニズムを明らかにするため、実験 3 で神経栄養因子の各受容体の蛋白と mRNA の発現量の発達時期による変化について検討した。

実験 1 では、発達時期の異なるラット（生後 1 日 (P1)、3 日 (P3)、7 日 (P7) 及び 14 日 (P14)）の培養前庭神経節細胞を用い、BDNF と NT-3 が VGN に及ぼす作用の生後発達時期における変化を、生存細胞数と樹状突起の形成、樹状突起の長さの 3 項目について *in vitro* で検討した。BDNF と NT-3 の VGN に対する神経節細胞の生存と樹状突起の形成促進作用は発達時期に依存して変化し、P1 と P3 ラットでは促進作用を示したが、やや発達がすすんだ P7 と 14 ラットではこの促進作用は認めなかった。また BDNF はすべての発達時期において樹状突起の伸長を促進する作用を有しており、その作用は NT-3 より有意に強かった ($p < 0.05$)。過去の研究報告から、ラットでは生後 4-6 日の間に前庭神経節細胞と前庭とのシナプス形成が完成するものと考えられる。本研究において、P1 と P3 ラットで認められた BDNF と NT-3 の VGN の細胞生存や BDNF の樹状突起の形成に対する促進効果が P7 以降認められなくなったことは、生後 4-6 日の間に前庭神経節細胞が成熟したことと関連して BDNF と NT-3 の作用が変化していることを示唆する結果であると推察される。また Control 群では P3 ラットで最長の樹状突起の長さが最も長くなっており、特にこの時期に軸索が伸長しシナプス形成がおこなわれやすくなっているものと考えられた。この結果より BDNF と NT-3 のラットの VGN に対する作用は神経節細胞の成熟に伴い生後発達段階に依存し変化し、細胞生存と樹状突起の形成に対する神経保護効果は主に生後早期に限定されていることと、発達時期による変化が細胞生存と樹状突起の形成、樹状突起の伸長の各作用により異なっていることが明らかとなった。実験 1 の結果より耳毒性物質に対する神経保護効果も発達時期により変化することが考えられた。

実験 2 では、神経栄養因子と耳毒性物質を培養液に同時に投与し、培養前庭神経節細胞に対する神経栄養因子の耳毒性からの神経保護効果の発達段階による変化について検討した。耳毒性物質には感染症治療に現在も使用されており前庭障害が強いとされるアミノ配

糖体系抗生剤の一つである GM と、頭頸部領域の悪性腫瘍において高頻度で用いられている白金系抗悪性腫瘍剤である Cis の 2 つを用いた。耳毒性物質による前庭神経節細胞障害に対する BDNF と NT-3 の神経保護効果も実験 1 の結果と同様に発達段階に依存して変化し、P3 から P7 で保護効果が消失する傾向を示した。また BDNF のほうが NT-3 より強い保護効果を示し、耳毒性物質からの VGN の保護への臨床応用への検討にあたっては NT-3 より BDNF のほうが有望な因子であることも明らかとなった。実験 2 の結果より耳毒性物質投与時の VGN に対する神経保護作用の臨床応用への可能性を検討するにあたっては、発達時期による保護効果の変化についても念頭におく必要があることが示された。成熟した個体においては神経栄養因子の単なる投与では神経保護効果を認めない可能性が示唆され、神経栄養因子の神経保護作用の発達時期による変化のメカニズムを明らかにする必要があると考えられた。

実験 3 では、神経栄養因子の神経保護作用の発達時期による変化のメカニズムを明らかにするため、BDNF と NT-3 の受容体の蛋白と mRNA の発現量の発達時期による変化を Western blot 法とリアルタイム RT-PCR を用いて検討した。神経栄養因子は高親和性の tropomyosin receptor kinases (Trk) 受容体と低親和性の p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) を介したシグナル伝達経路を介して作用を発現し、BDNF と NT-3 は各々 TrkB、TrkC と強い親和性を持ち、p75^{NTR} はすべての神経栄養因子と弱い親和性を持つ。NT-3 は TrkC より親和性は低下するものの、TrkA と TrkB とともに結合し作用を発現することがわかっているが、前庭神経節では TrkA はごく短期間に低レベルでの発現しか確認されていないため、本研究においては BDNF と NT-3 の受容体として TrkB、TrkC、p75^{NTR} の 3 つの受容体の発現について検討することとした。Western blot 法による解析において TrkB と TrkC の蛋白の発現量は発達時期により変化しておらず、(p>0.05)、リアルタイム RT-PCR 法による解析において TrkB と TrkC の mRNA の発現量についても発達時期による変化を認めなかった。一方 p75^{NTR} の蛋白の発現量は P1 と比較し P14 は有意に減少し (p<0.01)、mRNA の発現量でも P1 と P3 ラットと P7 と P14 ラットの間で有意に減少していた (p<0.05)。この p75^{NTR} の蛋白と mRNA の発現量の発達時期による変化は、BDNF と NT-3 の細胞生存や樹状突起の形成に対する作用の発達時期による変化と同様の傾向を示していた。これらの結果から外因性神経栄養因子の VGN に対する神経保護効果の発達時期による変化は、高親和性受容体である Trk 受容体の発現量の変化によるものではないことが示唆された。p75^{NTR} は TrkB の神経栄養因子に対する親和性と選択性を増加させ神経栄養因子の生存促進効果を促進する co-receptor

として作用し、生後のラセン神経節と蝸牛の有毛細胞の機能維持に重要な役割を果たしているとの報告がある。発達に伴い p75^{NTR} の発現量が減少することで TrkB の神経栄養因子に対する親和性と選択性が低下し、細胞生存と樹状突起形成に対する効果が減少した可能性が示唆された。一方 BDNF の樹状突起の伸長効果は発達時期で変化しておらず、神経栄養因子の受容体を介した各細胞内シグナル伝達経路はそれぞれ異なる作用をもち、個別に制御されている可能性が示唆された。

本研究において外因性 BDNF と NT-3 の培養 VGN に対する耳毒性からの保護作用は生後発達時期により変化し、特に細胞生存や樹状突起の形成に対する保護効果は主に生後早期 (P1 と P3 ラット) に限定されていることが明らかとなった。また NT-3 より BDNF のほうが VGN に対する神経保護効果が強いことが示され、耳毒性物質による末梢前庭神経障害に対する治療への臨床応用には NT-3 より BDNF が有力な因子であること示した。しかし BDNF の投与のみでは成熟個体では細胞生存に対する保護効果がみられないことが示唆され、Trk 受容体と p75^{NTR} の細胞内シグナル伝達とその下流に連なる伝達経路の発達時期による変化も明らかにする必要があると考えられた。