

論文内容要旨

論文題目

蝸牛器官培養聴神経障害モデルにおける聴神経線維および内有毛細胞-聴神経間シナプスへの ROCK 阻害薬の効果の検討

責任講座：耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

氏名： 小泉 優

【内容要旨】(1,200字以内)

近年、内耳領域において **primary neural degeneration** という概念が提唱され、聴神経の障害が注目を集めている。内耳蝸牛内では内・外有毛細胞と、有毛細胞とシナプス形成している聴神経が存在し、中枢に音信号を伝えている。これまでの知見では、様々な要因により最初に内耳有毛細胞が障害され、これに引き続いて二次的に聴神経が障害 (**secondary neural degeneration**) されて感音難聴が生じると考えられていた。この説に対して近年提唱されているのが、最初に聴神経線維が障害されるという概念 (**primary neural degeneration**) であり、感音難聴の成因として有毛細胞-聴神経間のシナプスが重要であるという考えである。ROCKは低分子量GTP結合蛋白Rhoの標的蛋白質として同定されたセリン-スレオニン蛋白リン酸化酵素である。ROCK阻害薬は、血流改善、神経保護効果、さらに神経・シナプス再生作用などの多面的な効果が報告されている。内耳蝸牛領域での報告は非常に少ないが、ROCK阻害薬による聴神経線維の伸長効果についていくつかの重要な知見が示されており、内耳障害における聴神経および有毛細胞-聴神経間のシナプスに関する有用な効果を発現する可能性がある。本研究では内耳蝸牛の器官培養系を用いて、グルタミン酸受容体アゴニストを用いて作製した蝸牛聴神経障害モデルに対するROCK阻害薬の聴神経障害への効果について検討した。生後4-6日目のマウスより蝸牛組織を摘出し、NK処理(NMDA 0.5 mM + Kainic acid 0.5 mM)を2時間行い、聴神経および内有毛細胞-聴神経間シナプスの障害モデルを作製した。引き続きROCK阻害薬(薬品名Y-27632)を10 μMの濃度で添加した培養液に交換し72時間の培養を行った。培養後、有毛細胞マーカーMyo7a、聴神経マーカーNF200、および前シナプスマーカーCtBP2、後シナプスマーカーPSD95による免疫組織化学を行い、聴神経線維数とシナプス数の解析を行った。NK処理のみを行った蝸牛障害モデルと比較してY-27632で追加処理した蝸牛組織では、有毛細胞へ投射している聴神経線維数およびシナプス数は有意に増加していた。本研究から、これまで初めて聴神経および内有毛細胞-聴神経間シナプスの障害に対するROCK阻害薬の有効性が示唆された。ROCK阻害薬は緑内障や脳血管攣縮の治療においてすでに臨床使用されているため臨床応用へのハードルは低く、聴覚障害に対する画期的な治療薬となることが期待できる。今後、聴神経の再生過程でのRhoA/ROCK経路の発現解析および*in vivo*でのROCK阻害薬の効果について検討する予定である。

平成 30 年 01 月 15 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：小泉 優

論文題目：蝸牛器官培養聴神経障害モデルにおける聴神経線維および
内有毛細胞-聴神経間シナプスへの ROCK 阻害薬の効果の検討

審査委員：主審査委員

高木理彰

高木理彰

副審査委員

白石正

白石正

副審査委員

中村孝夫

中村孝夫

審査終了日：平成 30 年 01 月 10 日

【 論文審査結果要旨 】

内耳における聴神経障害では感音性難聴を引き起こす。はじめに聴神経線維が障害されて生じる primary neural degeneration (PND)、有毛細胞が障害された結果、二次的に聴神経障害を生じる secondary neural degeneration (SND) という 2 つの病因が提唱されている。これまで SND が難聴発生の主たる病因と考えられてきたが、近年、PND における有毛細胞-聴神経間のシナプス結合障害に関する報告がなされて以来、感音性難聴発症における PND の重要性が注目されている。申請者は、低分子量 GTP 結合蛋白 Rho の標的蛋白質として同定されたセリン・スレオニン蛋白リン酸化酵素 ROCK が神経再生を負に制御していること、ROCK 阻害薬が局所の血流改善や神経保護効果に加え、神経・シナプス再生作用があることに着目し、ROCK 阻害薬の内耳聴神経障害への有効性を明らかにすることを最終目標とし、その端緒として、同阻害薬の in-vitro での神経障害改善効果を検討した。

マウス蝸牛器官培養系を用いた申請者は、グルタミン酸アゴニスト処理によって誘発される聴神経障害モデルを作成し、さらに障害モデルに ROCK 阻害薬 (Y-27632) を添加し、障害された神経組織の回復過程を解析した。蛍光免疫組織染色、共焦点レーザー顕微鏡による組織観察と形態計測の結果、NMDA と Kainic acid 前処置により神経障害を生じた器官培養中の蝸牛組織に、ROCK 阻害薬 Y-27632 を添加すると、前処置で減じた有毛細胞に投射する聴神経線維数、内有毛細胞・聴神経細胞間のシナプス数が回復していることを明らかにした。この結果は、緑内障や脳血管攣縮の治療に用いられている ROCK 阻害薬 Y-27632 が、聴神経の再生も促し、SND に由来する聴神経障害にも臨床応用できる可能性を示した貴重な知見である。仮説にもとづいた実験方法の立案、実施、結果の解析、解釈もよくなされ、研究のあらたな展開も期待できる内容となっている。一方、当初、提出された論文課題目は、「蝸牛器官培養聴神経障害モデルにおける聴神経線維および内有毛細胞-聴神経間シナプスを標的とした新規治療薬の探索」であったが、審査委員会では、題目は研究内容をより端的に示すことが望ましく、題目を上記に変更すること、また SND における薬剤による神経再生促進のメカニズムに関連づけながら、神経障害の病理、病態に関する考察を追記することも必要であると判断した。これらの修正、追加を行うことによって、本研究論文は博士 (医学) の授与に値すると判定した。