

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	山 原 康 平
論文題目	Netrin 1 mediates protective effects exerted by insulin-like growth factor 1 on cochlear hair cells (Netrin 1 はインスリン様細胞成長因子 1 による蝸牛有毛細胞保護効果を仲介する)		
(論文内容の要旨) 音刺激は内耳の蝸牛有毛細胞で機械電気変換により受容器電位に変換され、これが蝸牛神経を興奮させ、いくつかの神経核を経て大脳の聴覚野に伝わる。感音難聴の主たる原因は有毛細胞傷害であるが、有毛細胞や支持細胞は哺乳類では生後に傷害されると再生することはない。そのため、感音難聴に対する有効な薬物療法はなく、聴力を回復させることは困難であり、内耳傷害の際に有毛細胞の数を保つ薬物の開発が必要とされてきた。一方、インスリン様細胞成長因子(IGF1)はインスリンファミリーに属するペプチドであり、様々な臓器や組織において細胞分化や細胞増殖、細胞死の制御に関わっている因子として知られていた。また、IGF1 は胎生期および生後の蝸牛の正常な発生にも重要な働きを行うことも知られていた。ところが、近年、IGF1 は動物実験で傷害された有毛細胞を保護し、聴力を改善させる働きがあることが示され、臨床試験でも突発性難聴に効果があることが分かり、感音難聴の治療薬として臨床応用しうる薬物として注目されるようになった。しかし、IGF1 が有毛細胞をどのような機序で傷害から保護するのか不明であった。その機序を探るために、幼齢マウス感覚上皮の器官培養系を用いた実験が先行研究でなされ、その結果、IGF1 は有毛細胞のアポトーシスを防ぎ、支持細胞の増殖を促進させることで、アミノグリコシドによる傷害から有毛細胞を保護することが分かったが、IGF1 自体は有毛細胞でなく、支持細胞に作用することが示され、有毛細胞に直接作用する因子は不明であった。一方、網羅的遺伝子解析で、IGF1 投与後、感覚上皮から <i>Netrin1(Ntn1)</i> 遺伝子の発現が上昇していることが示された。NTN1 はラミニン鎖の一部と相同性を有する分泌タンパクで、かつては軸索の伸長を誘導する因子として知られていたが、近年、特に腎臓で細胞増殖や抗アポトーシス効果を持つことが分かってきた。そこで、本研究では、IGF1 の有毛細胞保護の際における、NTN1 の働きを調べた。 まず、先行研究と同様に幼齢マウス感覚上皮の器官培養系を用いて、NTN1 が IGF1 と同様、アミノグリコシド傷害から有毛細胞を保護する効果を持つことを示した。次にウエスタンブロット法を用いて、IGF1 投与後、感覚上皮から培養液中に NTN1 がタンパク質レベルでも分泌されていることを確認し、さらに IGF1 投与後の培養液中に NTN1 中和抗体を投与することによって NTN1 の働きを抑えると、アミノグリコシド傷害に対する IGF1 の有毛細胞保護効果が減弱することを示した。そして、whole mount in situ hybridization を用いて、IGF1 投与後に支持細胞が <i>Ntn1</i> を発現することを示した。これらの結果から、IGF1 によって刺激された支持細胞が NTN1 を分泌し、有毛細胞保護を行っていることが推察された。次に、NTN1 が有毛細胞に作用しているのかどうかを確認するため、6 種類ある NTN1 受容体 (UNC5A、UNC5B、UNC5C、UNC5D、DCC、NEOGENIN) すべての種類の NTN1 受容体の蝸牛内における発現を in situ hybridization を用いて調べた。その結果、 <i>Unc5b</i> 受容体のみが内外有毛細胞に発現していることを示			

した。さらに、UNC5B 阻害抗体を投与し、UNC5B 受容体の働きを阻害すると、アミノグリコシド傷害に対する IGF1 の有毛細胞保護効果が減弱することを示した。このことから、IGF1 投与後、支持細胞から分泌された NTN1 は、有毛細胞に発現した UNC5B 受容体に作用して有毛細胞保護を行っているものと考えられた。
 本研究では、IGF1 の有毛細胞保護の機序を解明し、そこでは NTN1 がきわめて重要な働きを行っていることを示した。この成果は、感音難聴に対する新規の治療薬としての NTN1 の可能性を示唆するものである。

(論文審査の結果の要旨)

有毛細胞や支持細胞は哺乳類では生後に傷害されると再生することはない、そのためいったん感音難聴になると有効な薬物療法はないとされてきた。インスリン様細胞成長因子 1(IGF1)は有毛細胞を保護し、聴力を改善させる働きがあることが示され、感音難聴の治療薬として臨床応用しうる薬物として注目されているが、IGF1 自体は有毛細胞でなく、支持細胞に作用することから、IGF1 が有毛細胞をどのような機序で傷害から保護するのか不明であった。

本研究では、IGF1 の下流で発現される *Netrin1 (Ntn1)* に着目し、NTN1 が IGF1 と同様、アミノグリコシド傷害から有毛細胞を保護する効果を持つことを示した。whole mount in situ hybridization を用いて、IGF1 投与後に支持細胞が *Ntn1* を発現することを示した。また、すべての種類の NTN1 受容体の蝸牛内における発現を in situ hybridization を用いて調べ、*Unc5b* 受容体のみが内外有毛細胞に発現していることを示した。さらに UNC5B 阻害抗体を投与し、UNC5B 受容体の働きを阻害すると、アミノグリコシド傷害に対する IGF1 の有毛細胞保護効果が減弱することを示した。以上から、IGF1 による有毛細胞保護効果には、IGF1 投与後、支持細胞から分泌された NTN1 の、有毛細胞に発現した UNC5B 受容体への作用が関与していることを示した。

以上の研究は、IGF1 の有毛細胞保護の機序の解明に貢献し、さらに感音難聴に対する新規の治療薬としての NTN1 の可能性を示唆するものであり、感音難聴の治療法に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 12 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降