

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	林 裕史
論文題目	Insulin-like growth factor 1 inhibits hair cell apoptosis and promotes the cell cycle of supporting cells by activating different downstream cascades after pharmacological hair cell injury in neonatal mice.		
(論文内容の要旨)			
生後の哺乳類では蝸牛有毛細胞・支持細胞が増殖能を失うために、有毛細胞の障害により生じる感音難聴の治療は困難とされてきた。これまでの研究で、音響外傷や虚血による蝸牛障害モデル動物においてインスリン様細胞成長因子 1 (IGF-1)が蝸牛有毛細胞を保護することが見出され、臨床試験において IGF-1 が突発性難聴に対し治療効果のあることが確認されている。本研究において、新生児マウス蝸牛感覚上皮の器官培養系を用いて、IGF-1 の下流シグナル伝達経路を同定し、IGF-1 が耳毒性薬物である neomycin による障害から蝸牛有毛細胞を保護するメカニズムの解析を行った。生後 2 日齢のマウス蝸牛感覚上皮を摘出、2 mM neomycin を単独で加えた群、2 mM neomycin に 100、10、1.0、0.1、0.01、0.001 ng/ml IGF-1 を加えた群にわけ、培養を行った。IGF-1 を加えた群では有意に残存有毛細胞を多く認め、本器官培養系 model の妥当性が示された。IGF-1 の下流分子として、PI3K/Akt、MEK/ERK が知られており、また PKC は PI3K と MEK/ERK をつなぐものとして報告されている。そこでこれらシグナル伝達を阻害する各 inhibitor を用いて、IGF-1 による有毛細胞保護効果が減弱するか否か調べた。PI3K の阻害薬である LY294002、ERK の阻害薬である PD98059、及び U0126、また PKC の阻害薬である calphostin C を投与するといずれも内・外有毛細胞共に統計学的に有意に保護効果の減弱が見られ、これらのシグナル分子が内・外有毛細胞保護に関与していると考えられた。また、Akt の阻害薬である Akt inhibitor VIII を投与すると内有毛細胞のみ保護効果の減弱が確認された。そこで Akt の活性型である phospho-Akt に関して免疫染色にてその局在を検討したところ、phospho-Akt は内有毛細胞の周囲に位置する支持細胞である内指節・内溝細胞において発現が認められ、内指節・内溝細胞における Akt の活性化が内有毛細胞保護に関与しているものと考えられた。IGF-1 は細胞生存、及び細胞増殖に関わるとされており、プログラム細胞死のマーカーである cleaved caspase-3 の染色を行ったところ、IGF-1 投与蝸牛において内・外有毛細胞共に統計学的に有意に cleaved caspase-3 陽性細胞が減弱し、IGF-1 が有毛細胞のプログラム細胞死を抑制していると考えられた。さらに BrdU を同時投与してその取り込みを検討したところ、IGF-1 投与蝸牛において統計学的に有意に外有毛細胞の外側に位置する支持細胞であるヘンゼン・クラウディウス細胞での BrdU の取り込みの増加が認められた。これは同じく細胞増殖マーカーである phospho-histone H3 の染色でも同様の結果であった。また、ERK の活性型である phospho-ERK に関し免疫染色にてその局在を調べると、phospho-ERK はヘンゼン・クラウディウス細胞において発現が認められ、ヘンゼン・クラウディウス細胞における ERK の活性化が細胞周期促進に関与しているものと考えられた。そこで細胞増殖を抑制する aphidicolin、mimosine をそれぞれ同時投与してヘンゼン・クラウディウス細胞における細胞増殖を抑制すると、統計学的に有意に外有毛細胞における保護効果の減弱が認められ、ヘンゼン・クラウディウス細胞の増殖が有毛細胞保護に関与しているものと考えられた。			

（論文審査の結果の要旨） 本研究において器官培養系を用いインスリン様細胞成長因子 1（IGF-1）が耳毒性薬物である neomycin による障害から蝸牛有毛細胞を保護するメカニズムの解析を行った。IGF-1 はシグナル伝達分子 PI3K/Akt、MEK/ERK、PKC を介して有毛細胞を保護すること、特に Akt は内有毛細胞保護に関与していることが分かった。phospho-Akt は支持細胞（内指節・内溝細胞）において発現が認められ、内指節・内溝細胞における Akt の活性化が内有毛細胞保護に関与していると考えられた。IGF-1 は細胞生存、細胞増殖に関わるとされているが、IGF-1 により cleaved caspase-3 陽性有毛細胞数が減弱し、IGF-1 が有毛細胞のプログラム細胞死を抑制していると考えられた。さらに BrdU の同時投与により、IGF-1 投与蝸牛において支持細胞（ヘンゼン・クラウディウス細胞）での BrdU の取り込みの増加を認めた。また、phospho-ERK はヘンゼン・クラウディウス細胞において発現が認められ、ヘンゼン・クラウディウス細胞における ERK の活性化が細胞周期促進に関与していると考えられた。そこで aphidicolin、mimosine により、ヘンゼン・クラウディウス細胞の増殖を抑制すると、外有毛細胞における保護効果の減弱を認め、ヘンゼン・クラウディウス細胞の増殖が有毛細胞保護に関与していると考えられた。 以上の研究は蝸牛有毛細胞保護のメカニズムの解明に貢献し、新たな感音難聴治療の開発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 25 年 5 月 28 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