

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10772

研究課題名(和文)内耳侵害受容体仮説に基づいた片頭痛関連めまいの病態解明のための基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research to investigate the mechanism of vestibular migraine

研究代表者

五島 史行 (Goto, Fumiyuki)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・その他部局等・医師

研究者番号：80286567

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文): miRNA let-7b処理細胞では、control細胞と比較して有意にエンドソームの数は増加した。miRNA let-7b導入細胞とmiRNA let-7b処理細胞におけるエンドソームの超微細構造観察において、miRNA let-7b導入細胞では、細胞質内に初期エンドソームと後期エンドソームを確認した。これらよりエクソソーム内miRNA let-7bは、エンドソームのTLR7とTRPA1に認識され、内耳感覚細胞における過興奮性細胞死を誘導すること、miRNA let-7b inhibitorには内耳保護効果があることを確認した。

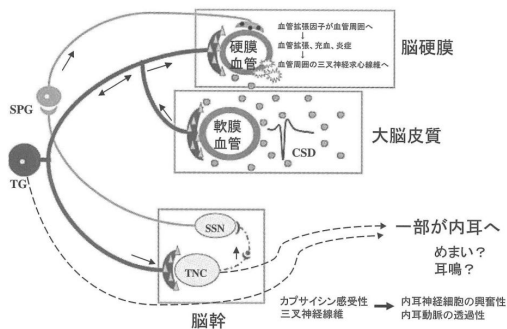
研究成果の概要(英文): MiRNA let-7b play a major role to regulate cell death through the interaction with Toll-like Receptor 7 (TLR7). The number of apoptotic cells were significantly increased in let-7b-exposed cells. The expression of TLR7 was increased in let-7b-exposed cells. However, the number of apoptotic cells remained unchanged in let-7b-exposed TLR7 knock down cells. The number of apoptotic cells remained unchanged in let-7b inhibitor-treated cells after exposed to TLR7 agonist. The expression of cleaved-caspase-3 and LC3-II was significantly increased in TLR7 agonist -exposed cells, while let-7b inhibitor regulated apoptosis mediated by TLR7 agonist. Our results indicated that miRNA let-7b/TLR7 signaling interaction could be a new therapeutic target for auditory cell death.

研究分野：医学

キーワード：片頭痛 細胞死 疼痛刺激 TRPA1 エクソソーム TLR7 microRNA let-7b

1. 研究開始当初の背景

片頭痛関連めまいは、片頭痛患者あるいは片頭痛の既往のある患者に見られる疾患で、反復するめまい発作を特徴とする。難治性めまいである本疾患は片頭痛とめまいという両面を持っており、その病態の解明のためには両面からの機序の解明が必要である。片頭痛の発症機序である「三叉神経血管説」では何らかの原因で大脳皮質に大脳皮質拡張性抑制；Coercortical Spreading Depression (CSD) が生じ、三叉神経節ニューロンの Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) のリン酸化を引起し、侵害刺激として受容される。片頭痛患者では、これが三叉神経系の神経原性炎症や感作を引き起こし、脳硬膜血管や脳表血管周囲の知覚過敏が惹起されて病態を形成していると考えられている。研究分担者（北原）は前庭および蝸牛の神経細胞には侵害受容体 transient receptor potential cation channel subfamily V (TRPV) が存在していることを示した (Kitahara T, 2005)。そのことから我々は、三叉神経系由来の侵害情報はカプサイシン感受性知覚神経を介して、内耳末梢の神経細胞に受容される。または、三叉神経節あるいは三叉神経核由来のカプサイシン感受性知覚神経は内耳に投射しており、三叉神経系からの刺激により内耳栄養血管の浸透性が変化する、と考えた。すなわち、片頭痛関連めまいの病態として、片頭痛発症時の大脳皮質に発生した CSD が、血管炎症反応として三叉神経終末から取り込まれ、カプサイシン感受性知覚神経を経由し、内耳末梢（前庭・蝸牛）の TRPV 受容体を活性化し、神経細胞興奮、知覚過敏を誘起すると考えている（図仮説）。



一方で、研究分担者（鳥海）は臨床的に、片頭痛患者の頭頸部に形成された有痛の筋硬結（トリガーポイント）を刺鍼で消失させると、片頭痛発作の頻度と重症度の低下が見られることを報告した (Toriumi et al, 2012)。さらに、Capsaicin 投与による慢性的疼痛付与動物では、control マウスに比較して CSD の発生回数・持続時間ともに増加し、発生閾値も低下することを確認した（図 2） (Toriumi et al. 2011)。

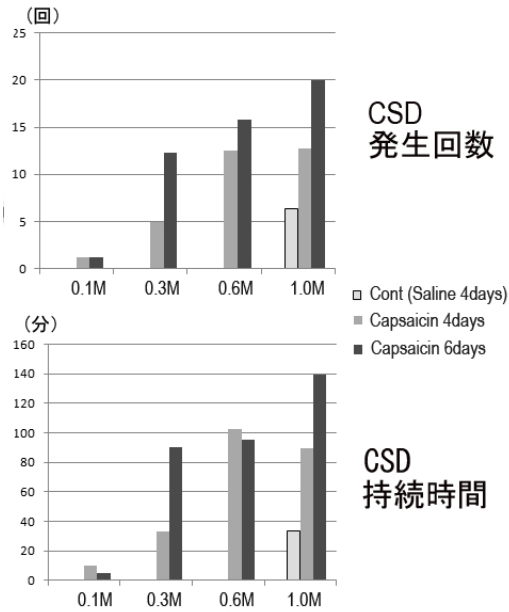


図 2

両グラフは、CSD発生回数、発生頻度の両者が、刺激強度 (= K⁺イオン濃度) 依存的に、増加する様子を示したものの。Control 群 (Saline 前投与) に比べ、Capsaicin 前投与群 (4日、6日両群) は、CSD発生閾値が顕著に下がっている。

この結果から、我々はこの慢性的疼痛付与マウスを片頭痛発症モデルマウスとした。

2. 研究の目的

これらの先行研究に基づき、頭頸部の慢性疼痛刺激が、末梢前庭、聴覚神経系に及ぼす影響を検討するため、in vitro, in vivo の片頭痛関連めまいモデルの作成を行い、新規治療開発を目的としたトランスレーショナルリサーチを行うことを目的とする。内耳感覚細胞における miRNA let-7b、TLR7、TRPA1 の新規分子標的としての有用性を明確にすることである。

3. 研究の方法

独自の片頭痛発症モデルマウスを用い 1) 頭頸部に異なる疼痛刺激を様々な部位に加え、刺激部位と、CSD 閾値低下作用および前庭神経、神経核の変性強度の相関を明らかにする。2) 疼痛刺激による前庭神経および前庭神経核の変性 time course を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて明らかにする。3) TRPV1 発現ベクターを内耳培養細胞 HEI-001 に遺伝子導入し、カプサイシン投与による細胞死誘導と内耳での MAPK を中心とする分子ネットワークとの関係について検討を行う。

4. 研究成果

miRNA let-7b 処理細胞の細胞生存率は、時間依存性に低下し (24h 86%, 48h 79%) Annexin V 染色においてアポトーシス細胞の有意な増加を確認した。これは、miRNA let-7b が細胞

死シグナルを刺激したことを示す結果である。miRNA let-7b 処理細胞の細胞膜はエンドサイトーシスを示し、miRNA let-7b 処理細胞の培養液には直径 200nm 程度のエクソソームを確認した。miRNA let-7b 導入細胞と miRNA let-7b 処理細胞におけるエンドソームの超微細構造観察において、miRNA let-7b 導入細胞では、細胞質内に初期エンドソームと後期エンドソームを確認した。miRNA let-7b 処理細胞では細胞質内に初期エンドソームと後期エンドソーム、オートファゴソームも確認した。この結果は、miRNA let-7b 処理によってエンドソーム経路のみならずオートファジー経路も刺激されたことを示している。また、control 細胞と比較して有意にエンドソームの数は増加した。逆に、miRNA let-7b inhibitor 導入細胞ではエンドソームの数は有意に低下した。miRNA let-7b が TLR7 を介してシグナル伝達をするかどうかを確認するため western blot 法を用い TLR7 の発現を確認し、時間依存性に発現増加することを確認した (図 1 TLR7 の発現)。

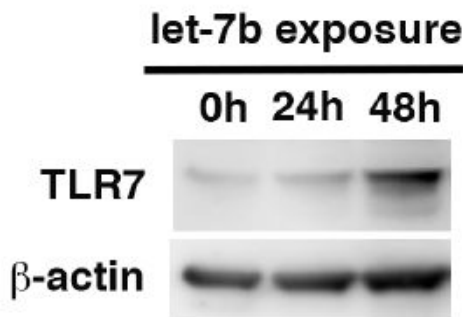


図1 TLR7 の発現

この結果は、TLR7 シグナル伝達経路が活性化されたことを示す結果である。次にオートファジーが分子レベルで誘導されているかどうかを確認するため、LC3-II, Atg-7, Beclin 1 の発現を確認した。その結果、LC3-II, Atg-7, Beclin 1 の発現は、時間依存性に増加した。一方で、アポトーシスマーカーである cleaved-caspase-3 も、時間依存性に増加した(図 2 caspase-3 の発現)。

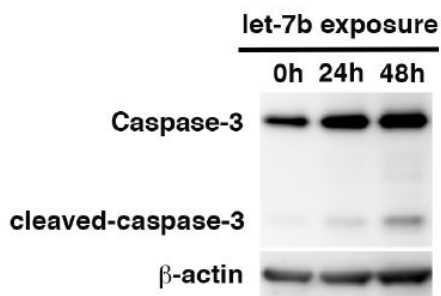


図2 caspase-3の発現

これらの結果は、miRNA let-7b 処理した場合、オートファジーとアポトーシスが同時に誘導されるが、48 時間処理段階で細胞生死の運命は、すでに細胞死へ傾いていることを示唆している。

次に、miRNA let-7b の効果を TLR7 直接刺激の効果と比較するため、TLR7 agonist である Ixoribine を HEI-OC1 細胞に投与した。その結果、TLR7 agonist 処理後、細胞生存率は時間依存性に著しく低下し (24h 62%, 48h 23%)、アポトーシス細胞が有意に増加した。Western blot 法にて、TLR7 の時間依存性の誘導を確認した。また、オートファジー関連遺伝子 LC3-II, Atg-7 は、24h をピークに誘導され、Beclin 1 は時間依存性に誘導された。一方で、アポトーシス誘導マーカーである cleaved-caspase-3 は時間依存性に誘導された。これらの結果は、TLR7 agonist 処理によるオートファジーは 24h 後をピークに誘導されるが、その後減弱するため、48h 処理時点ではアポトーシスによる細胞死が優位になることを示唆している。以上の結果より、内耳感覚細胞にて TLR7 が刺激された場合、オートファジーとアポトーシスのクロストークが存在するが、刺激の程度によって細胞死シグナルに移行することが示唆された。

これまでの結果を基盤にして、TLR7 をノックダウン (KD) した場合、あるいは miRNA let-7b inhibitor を使用した場合、細胞死が抑制されるか否かを検討した。TLR7 agonist と miRNA let-7b inhibitor 同時投与した場合、細胞生存率の有意な低下は認めなかった。TLR7 KD 細胞を miRNA let-7b 処理した場合、細胞生存率の低下、アポトーシス細胞の有意な増加は認めなかった。さらに、miRNA let-7b inhibitor 処理細胞では、TLR7 の発現と cleaved-caspase-3 の発現は有意に低下した。これらの結果は、内耳感覚細胞において miRNA let-7b は TLR7 を介してアポトーシスを誘導することを逆説的に示唆している。さらに、miRNA let-7b inhibitor には内耳保護効果があることを示している。

TRPA1 は TLR7 とリンクし、miRNA let-7b をリガンドとして細胞興奮を制御していると報告され (Liu T, Nat Neurosci, 2010)、有毛細胞にも発現していると報告されている (Corey DP, Nature, 2004)。Western blot 法を用いて、miRNA let-7b 処理細胞における TRPA1 と細胞興奮マーカー p-ERK の発現検討を行った。TRPA1 の蛋白レベルでの有意な増加は認めなかったが、p-ERK は時間依存性に有意に増加することを確認した。この結果は、miRNA let-7b inhibitor 処理により内耳感覚細胞が過興奮する可能性を示唆している。

以上よりエクソソーム内 miRNA let-7b は、エンドソームの TLR7 と TRPA1 に認識され、内耳感覚細胞における過興奮性細胞死を誘導すること、miRNA let-7b inhibitor には内耳保護効果があることを確認した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Koganemaru Satoko, Goto Fumiyuki, Arai Miki, Toshikuni Keitaro, Hosoya Makoto, Wakabayashi, Takeshi, Yamamoto Nobuko, Minami Shujiro, Ikeda Satoshi, Ikoma Katsunori, Mima Tatsuya
Effects of vestibular rehabilitation combined with transcranial cerebellar direct current stimulation in patients with chronic dizziness: An exploratory study
Brain Stimulation 査読あり 4 巻 2017 pp.576 ~ 578

Sugaya Nagisa, Arai Miki, Goto Fumiyuki
Is the Headache in Patients with Vestibular Migraine Attenuated by Vestibular Rehabilitation?
Frontiers in Neurology 査読あり 8 巻 2017 年 pp.128 ~ 133
10.3389/fneur.2017.00124

五島 史行, 荒井 美希, 利國 桂太郎, 若林 毅, 細谷 誠, 山本 修子, 南 修司郎, 松永 達雄, 角田 晃一, 美馬 達哉, 小金丸 聡子

tcDCS(経頭蓋小脳直流電気刺激)を用い前庭リハビリテーションの効果増強を試みた2症例耳鼻咽喉科・頭頸部外科査読あり 89 巻 2017 年 pp.471 ~ 475

小坂橋 美香, 荒井 美希, 五島 史行
前庭性と心原性の鑑別を要したドロップアタックの3症例
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 査読あり 89 巻 2017 年 pp.843-847

小坂橋 美香, 五島 史行, 荒井 美希, 新藤 晋, 池園 哲郎
前庭型片頭痛患者の前庭動眼反射機能について video head impulse test(vHIT)を用いた検討
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 査読あり 89 巻 2017 年 pp.367-372

〔学会発表〕(計 件)

林 賢, 五島史行, 野村泰之, 岸野明洋, 神崎晶, 小川郁
TLR7 と TRPA1 を介した細胞外 microRNA let-7b の内耳感覚細胞死と細胞興奮メカニズム
第 118 回日本耳鼻咽喉科学会総会
2018 年

林 賢, 五島史行, 野村泰之, 岸野明洋, 神崎晶, 小川郁
内耳感覚細胞におけるエクソソーム内 microRNA let-7b の新規分子標的としての有用性
第 27 回日本耳科学会総会
2018 年

Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Akihiro

Kishino, Yasuyuki Nomura, Hirokazu Takahashi, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa
The new insights into cell death and cellular hyper-excitability in auditory-brain
17th Korea-Japan joint meeting (国際学会)
2018 年

〔図書〕(計 1 件)

薬に頼らずめまいを治す方法
五島史行
アチーブメント出版 2017 140

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五島史行 (GOTO Fumiyuki)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)

その他部局等 医師

研究者番号: 8 2 6 4 3

(2) 研究分担者

北原 紘 (KITAHARA Tadashi)

奈良県立医科大学 医学部 教授

研究者番号: 2 4 6 0 1

鳥海 春樹 (TORIUMI Haruki)

慶應義塾大学 医学部(信濃町)

講師(非常勤)

研究者番号: 3 0 5 2 8 2 0 3

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()