

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09358

研究課題名(和文) 蝸牛・前庭症状を伴う線維筋痛症におけるエクソソームの作用機序の解明

研究課題名(英文) Research of the mechanism of exosome propagation for fibromyalgia accompanied with the cochlea and vestibular symptoms

研究代表者

野村 泰之(NOMURA, Yasuyuki)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：20297815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は本研究において線維筋痛症における蝸牛・前庭症状の機序の解明を目指した。線維筋痛症は多岐にわたる症状を呈し、全身の筋痛のみならず耳鳴、難聴、めまいといった蝸牛・前庭症状も呈する疾患である。しかしながらその病態メカニズムには未解明な部分が多い。これまで我々は耳鳴、難聴、めまい症状等の患者群の臨床的検討をおこなってきた。

今回、本研究においてさらに分子生物学的な機序の解明を目指し、内耳培養細胞にツニカマイシン曝露による小胞体ストレスを負荷しapoptosis、necroptosisの動態を検証するとともにエクソソームを介した病態情報の遠隔伝搬のメカニズムを探求し、その可能性を示唆するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維筋痛症は近年着目されてきた疾患で全身の筋痛のみならず多様な症状を呈する。しかしその病態メカニズムには未解明な部分も多く、それゆえに確実な治療法もいまだ模索されている状況である。本研究で我々は線維筋痛症における蝸牛・前庭症状に対して分子生物学的に病態へのアプローチをおこない、小胞体ストレスを受けた際の内耳培養細胞ならびにエクソソームの動向における新たな知見を得てきた。この研究成果はのちの線維筋痛症の諸症状への解明につながるとともに新たな根本的な治療薬の開発につながる可能性をもち斬新なものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this recent research is to clarify the pathological mechanism of the cochlea and vestibular symptom accompanied with fibromyalgia. We had investigated the clinical symptom like tinnitus, deafness, vertigo and dizziness those accompanied with the patient with fibromyalgia.

Then, our recent study aimed the analysis of the molecular mechanism through the experiment used cultural inner ear cells. Especially, we had cleared the parts of the mechanism of apoptosis and necroptosis among the cultural inner ear cells utilizing the endoplasmic reticulum stress induced by added tunicamycin exposure. Then we suggested the possibility of the distant miRNA propagation of the pathological information from those inner ear cells towards the distant organs using exosomes transportation.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：線維筋痛症 エクソソーム 小胞体ストレス 内耳培養細胞 めまい 耳鳴 前庭細胞 apoptosis

1. 研究開始当初の背景

我々は本研究において線維筋痛症における蝸牛・前庭症状の機序の解明を分子生物学的に目指した。線維筋痛症は多岐にわたる症状を呈し、全身の筋痛のみならず耳鳴、難聴、めまいといった内耳症状すなわち蝸牛・前庭症状も呈することが知られている疾患である。しかしながらその病態メカニズムには未解明な部分が多い。これまで我々は耳鼻咽喉科領域で遭遇する耳鳴、難聴、めまいといった患者群の臨床的検討をおこなってきた(文献1,2)。今回、本研究においてさらに分子生物学的な機序の解明を目指し、内耳培養細胞に小胞体ストレスを負荷しエクソソームの動向を解析するという斬新な実験手法で検証を重ねた。

線維筋痛症の病態は多岐にわたり、身体各所の諸症状を伴う。近年、さまざまな疾患病態のメカニズムの一つとしてエクソソームが遠隔臓器への疾患情報を運搬して症状を発現させているという知見が得られるようになってきた。そこで我々は線維筋痛症の蝸牛・前庭症状においても、このようなエクソソームによる遠隔メカニズムが関与している可能性を探索し病態解明の端緒となることを目指した。

研究代表者の野村泰之は耳鼻咽喉科医としてめまい・聴覚の専門家であり、研究分担者の村上正人は内科医として線維筋痛症学会も主催した経験のある線維筋痛症研究の第一人者である。また研究分担者の日台智明、弓削 類はともに生理学者として分子生物学研究のオーソリティであり、ともに研究チームを組むに至った。

2. 研究の目的

線維筋痛症は近年着目されてきた疾患で全身の筋痛のみならず多様な症状を呈する。しかしその病態メカニズムには未解明な部分も多く、それゆえに確実な治療法もいまだ模索されている状況である。本研究で我々は線維筋痛症における蝸牛・前庭症状に対して分子生物学的に病態へのアプローチをおこない、小胞体ストレスを受けた際の内耳培養細胞ならびにエクソソームによる病態情報の遠隔伝搬における新たな知見を得てきた。この研究成果はのちの線維筋痛症の諸症状への解明につながるとともに新たな根本的な治療薬の開発につながる可能性をもち斬新なものである。

3. 研究の方法

我々はまず内耳培養細胞とくに蝸牛系細胞とされる HEI-OC1 にツニカマイシン(TM)負荷による小胞体ストレス(ER)を与えてその動向を検証した。

内耳細胞がER誘導剤であるTMに曝露された場合、necroptosisがapoptosisのバックアップのための細胞死制御機構として誘導される、necroptosis誘導因子であるRIPK1、RIPK3、MLKLの複合体の中でRIPK1がdriver geneとして機能していること、caspase8が、necroptosisとapoptosisのリンクをしていることをまず報告した(文献3)。

その方法として、ERストレス誘導下の内耳感覚細胞におけるRIPK1の機能評価を行う目的で、まず細胞形態をTEM電顕で確認するとともに(図1)、TMとRIPK1阻害剤Nec-1を同時投与した。

その際に細胞生存率は、TM 単独投与と比較すると有意に増加した。また RIPK3 の機能評価を行う目的で、si-RIPK3 を用いて、RIPK3 Knock down (KD) 細胞を作製し、TM 処理した。その際にも細胞生存率は、有意に増加した。また MLKL は、RIPK3 の下流にある necroptosis 誘導の key molecule であるが、MLKL1 の内耳細胞における機能評価を行うために、内耳培養細胞 HEI-OC1 を MLKL1 阻害剤 necrosulfonamide (NSA) と TM 同時処理した。その場合、TM 単独投与と比較すると細胞生存率は有意に増加した。さらに、RIPK1、RIPK3、MLKL の複合体形成を免疫沈降法によって確認した。これらの結果は、TM 処理により内耳細胞に RIPK1、RIPK3、MLKL の複合体形成による necroptosis が誘導されることを示唆している。

次に、我々は caspase-8 が、necroptosis と apoptosis のリンクに重要な役割を果たしているという報告に着目し、小胞体ストレス誘導下における内耳感覚細胞における caspase-8 と RIPK1 との相互作用に重点を置いた評価を行った。Caspase-8 KD 細胞において RIPK1 の発現は著しく低下したが、caspase-3 の発現には影響を及ぼさなかった。ところが、TM 処理 caspase-8 KD 細胞の細胞生存率は有意に低下した。これらの結果から、小胞体ストレス誘導下における内耳感覚細胞において caspase-8 は、RIPK1 を負に制御し、caspase-3 依存性 apoptosis には影響しない状態で、necroptosis を誘導することを確認した(図 2)。

さらに、我々は caspase-9 が caspase-3 とリンクし apoptosis を誘導することに着目し、小胞体ストレス誘導下における内耳感覚細胞における caspase-9 の機能評価を行った。TM 処理 caspase-9KD 細胞では、caspase-3/cleaved-caspase-3 共に発現を抑制し、control 細胞処理と比較すると細胞生存率も有意に低下した。しかし、RIPK1 の発現には影響を及ぼさなかった。この結果は、小胞体ストレス誘導下における内耳感覚細胞において caspase-9 は、caspase-3 とリンクし apoptosis 誘導に関与するが necroptosis には関与しないことを示唆している。

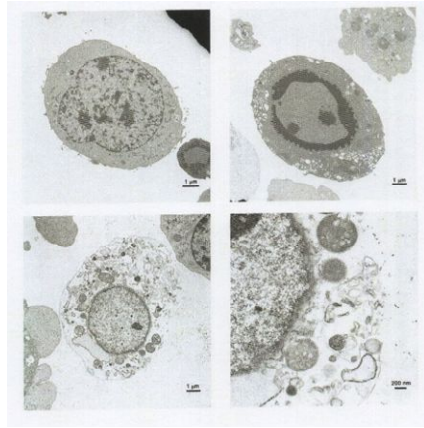
次に、前庭系細胞として卵形嚢感覚上皮培養細胞 UB/UE-1 (M Holley, Sheffield Univ, UK より譲渡)を用いた実験系をおこなった。前庭上皮細胞特異的に細胞死を起こす exo-miRNA を探索するため、UB/UE-1 をやはり小胞体ストレス処理し、小胞体ストレス誘導性前庭上皮細胞死モデルの細胞死誘導条件(時間、濃度)を確定(80m μ g/ml)した。そして処理細胞の培養液よりエクソソームを抽出し、特異的表面マーカー CD81 の発現をウエスタンブロット法によって確認し、エクソソームが単離されたことを確認した。この細胞死モデル由来エクソソームを前庭上皮細胞に暴露し、濃度・時間依存性の細胞生存率の有意な低下を確認した。この結果は、抽出したエクソソームが前庭上皮細胞自体にフィードバック細胞死を誘導することを示している。さらに、細胞死由来エクソソーム処理細胞は、アポトーシス誘導マーカー cleaved-caspase-3 と cleaved-PARP の誘導と、オートファジーモニタリングマーカー LC3-II と p62 の誘導が、小胞体ストレス処理よりも 24 時間遅れてピークを迎え、その後低下することと、オートファジーフラックスの誘導も確認した。本研究の結果は、小胞体ストレス誘導性卵形嚢上皮細胞死に伴い細胞外に分泌されるエクソソームが、卵形嚢上皮細胞の細胞間コミュニケーションによる細胞死連鎖を誘導する可能性を示唆している。

4 . 研究成果

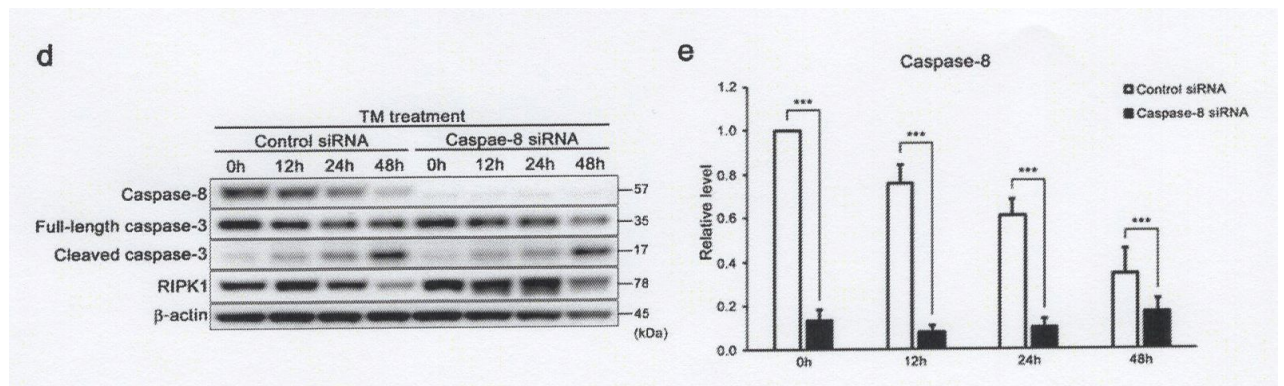
前述のように、蝸牛系ならびに前庭系の培養細胞ともにツニカマイシンを用いた小胞体ストレス曝露モデルにおいて apoptosis と necroptosis 誘導経路の差異ならびにそれらの情報がエクソソームによって遠隔伝搬される可能性が示唆された。これは当初の目的で示したごとく、蝸牛・前庭症状を引き起こす根源である蝸牛細胞、前庭細胞の機能低下や細胞死情報がエクソソ-

ムを介して遠隔伝搬されている可能性を示唆しており、線維筋痛症の病態メカニズム解明に分子生物学的に寄与し得る可能性が示された。しかしながら上述のごとく蝸牛・前庭の双方に共通する実験系の確立には期間内では至れなかった、また当初計画していたモデルラット動物実験までには至れなかったことから、今後も引き続きの研究継続をおこなうことでさらに解明を進めていきたい。

【図1】



【図2】



【文献】

- 1) Iikuni F, Nomura Y, Goto F, et al.: Why do patients with fibromyalgia complain of ear-related symptoms? Ear-related symptoms and ontological findings in patients with fibromyalgia. *Clin Rheumatol.* 32(10):1437-41, 2013. doi:10.1007/s10067-013-2287-2. Epub May. 2013.
- 2) Sawada F, Nomura Y, Goto F, et al.: Relationship of physical distress to dizziness in patients with fibromyalgia. *Acta Otolaryngol.* 136(1):56-61, 2016. Doi:10.3109/00016489.2015.1088662. Epub Oct. 2015.
- 3) Kishino A, Hayashi K, Maeda M, et al.: Caspase-8 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-induced Necroptosis Independent of the Apoptosis Pathway in Auditory Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 24;20(23):5896. doi:10.3390/ijms20235896

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kishino A, Hayashi K, Maeda M, Jike T, Hidai C, Nomura Y, Oshima T.	4. 巻 20(23)
2. 論文標題 Casper-8 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Necroptosis Independent of the Apoptosis Pathway in Auditor Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 5896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20235896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林 賢、五島史行、野村泰之、岸野明洋、小川 郁
2. 発表標題 聴覚におけるトップダウンシグナルとしてのエクソソームmiRNA let-7bが脳内ネットワークに及ぼす影響
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima
2. 発表標題 Caspase-8 regulates ER stress-induced necroptosis in auditory cells
3. 学会等名 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Yasuyuki Nomura, Akio Kishino, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa
2. 発表標題 miRNA let-7b/TLR7 signaling interaction: A novel therapeutic target for auditory cell death
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 賢、五島史行、野村泰之、岸野明洋、神崎 晶、小川 郁
2. 発表標題 miRNA let-7b/TLR7シグナル伝達による内耳感覚細胞と脳神経細胞間の過興奮性細胞死制御メカニズム
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 航、林 賢、藤本千里、野村泰之、大島猛史
2. 発表標題 卵形囊培養細胞における小胞体ストレス誘導性細胞死とエクソソームによる細胞間コミュニケーション
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	日だい 智明 (HIDAI Chiaki) (70228732)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	弓削 類 (YUGE Rui) (20263676)	広島大学・医系科学研究科(保)・教授 (15401)	
研究分担者	村上 正人 (MURAKAMI Masato) (60142501)	日本大学・医学部・兼任講師 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------