

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09877

研究課題名(和文) 前庭性片頭痛の客観的評価、新規治療のためのバイオマーカーとドライバー遺伝子の検索

研究課題名(英文) The objective evaluation of vestibular migraine

研究代表者

五島 史行 (GOTO, FUMIYUKI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80286567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：痛み刺激が、前庭上皮細胞における過興奮性細胞死を時間・濃度依存性に誘導した。TRPA1とTLR7との間にはクロスリンクがあることを示唆した。miRNA let-7bは、TLR7を介してTRPA1の発現を制御する可能性を示唆している。P62は、24hをピークに増加した。TRL7 agonist loxoribineもTLR7、TRPA1の発現を増加させた。細胞興奮マーカーp-ERKも増加した。この結果はTLR7とTRPA1がクロスリンクし、TLR7がTRPA1のドライバー遺伝子として機能していることを示唆している

研究成果の学術的意義や社会的意義

前庭上皮細胞特異的に痛み刺激により過興奮性細胞死を誘導するexosome(exo)-miRNAを探索するため、エクソソーム表面マーカーCD81の発現を確認し、また電子顕微鏡下においてエクソソームが正確に単離されたことを確認した。これらより、AITC処理細胞由来エクソソームが前庭上皮細胞自体の過興奮性細胞死連鎖を誘導する可能性を示唆している。以上の結果より前庭上皮細胞の障害により分泌されたエクソソームは、中枢の神経-血管-グリアユニットにボトムアップシグナルを送る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pain stimulation can probably induce excitatory cell death in the vestibular cells depending on the time and concentration. TLR7 expression in Si-STRPA1 cells was reduced related to the concentration of TRPA1. These results indicate the possible crosslink between TRP1 and TKW7. In addition to thatm, miRNA let-7b regulated the expression of TRPA1 via TLR7. The expression of P62 gradually increased up to 24 hours after the stimulation. TRL7 agonist loxoribine increased the expression of not only TLR7 but also TRPA1. The cell excitatory marker p-EKP also increased in the same condition. These results indicate that there is the crosslink between TLR7 and TRPA1. TLR7 is functioning as the driver gene of TRPA1 via this crosslink.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：前庭

1. 研究開始当初の背景

前庭性片頭痛は難治性めまい患者にしばしば見られる疾患であるが、客観的診断法が無いため正確に診断されていないことが問題となっている。申請者らは片頭痛の発症に脳内炎症が関与していることに着目した。本研究では、この脳内炎症に関連する神経-血管-グリア・ユニットの異種細胞間、さらに脳神経細胞-前庭細胞間における異種細胞間クロストークのトリガーとなる miRNA を同定する。さらに前庭性片頭痛患者由来血管内皮前駆細胞 (EPC) 遺伝子相互作用解析から前庭性片頭痛発症のドライバー遺伝子を発見し客観的診断に応用する。

2. 研究の目的

先行研究において、神経-血管-グリアのユニットが、脳内異種細胞間クロストークを形成し、miRNA はトリガーになることが報告されている (Cheng CY, Cephalalgia, 2018) (Gallelli L, Microna, 2017)。異種細胞である脳神経細胞-前庭細胞間において、申請者が提唱する miRNA を介したクロストークが存在することを明らかにすることは、前庭性片頭痛のバイオマーカーの発見につながる。さらに、片頭痛患者由来血管内皮前駆細胞 (EPC) 遺伝子相互作用解析から miRNA/TRPA1 とリンクするレセプターがドライバー遺伝子であることを明らかにすることは、前庭性片頭痛の新規治療ターゲットの発見につながる。申請者の研究は前庭性片頭痛研究の新たな扉を開く、独自性と創造性に富んだ研究である。

3. 研究の方法

神経培養細胞を用いて前庭神経細胞死を誘導する miRNA を同定する。

小胞体ストレス誘導剤処理初代神経培養細胞の培地から各エクソソームを単離する。単離したエクソソームが神経-血管-グリア細胞ユニットに与える影響について検討するため、エクソソーム曝露アストロサイト培養細胞 KT-5 と初代培養神経細胞あるいは血管内皮前駆細胞 (EPC) を共培養し、アストロサイト活性化の評価と、オートファジーを中心とした神経細胞死・血管内皮細胞死シグナル解析、TRPA1 との相互作用をする遺伝子の検討を行う。単離したエクソソームが前庭細胞に与える影響について、エクソソーム曝露マクロファージ培養細胞 RAW と前庭培養細胞 UB/UE-1 を各々共培養し、マクロファージ活性化シグナルの評価とオートファジーを中心とした前庭細胞死シグナル解析、TRPA1 との相互作用をする遺伝子の検討を行う。各エクソソーム内 miRNA のプロファイリングを行いアストロサイトの活性化を促す可能性、マクロファージ活性化と前庭細胞死を誘導する可能性のある miRNA を検討する。

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)。

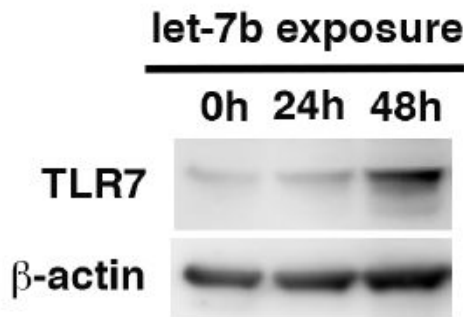


図1 TLR7 の発現

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)。

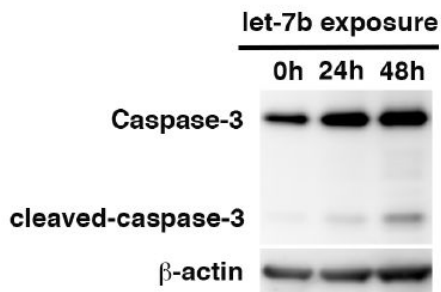


図2 caspase-3の発現

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 loxoribine 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

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 五島史行	4. 巻 80
2. 論文標題 めまいの漢方治療 心因性めまいに対する加味帰脾湯	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 120-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 上野 真史, 五島史行	4. 巻 93
2. 論文標題 前庭性片頭痛のvestibular evoked myogenic potential (VEMP)結果の検討.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 462-466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 関根 基樹, 金田将治, 斉藤弘亮, 五島史行	4. 巻 141
2. 論文標題 好酸球性副鼻腔炎術後に脳梗塞で発症した好酸球性多発血管炎性肉芽腫症例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科臨床	6. 最初と最後の頁 359-364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 84
2. 論文標題 【頭痛診療の基本から最新の知見まで】頭痛を訴える疾患 めまいと頭痛.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 1351-1355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 93
2. 論文標題 【必読!メニエール病の新分類とその周辺疾患】メニエール病の周辺疾患の診断・治療 前庭性片頭痛	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 995-999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 124
2. 論文標題 持続性知覚性姿勢誘発めまい(persistent postural perceptual dizziness;PPPD).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会会報	6. 最初と最後の頁 1467-1471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kaneda Shoji, Goto Fumiyuki, Teramura Takanobu, Okami Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 Red ear syndrome presented as vestibular migraine: A case study and review of the literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Laryngology & Otology	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S002221512100311X	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 -

1. 著者名 Yamamoto Nobuko, Mutai Hideki, Namba Kazunori, Goto Fumiyuki, Ogawa Kaoru, Matsunaga Tatsuo	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinical Profiles of DFNA11 at Diverse Stages of Development and Aging in a Large Family Identified by Linkage Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 e663~e673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002604	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 -

1. 著者名 Sugaya Nagisa, Goto Fumiyuki, Okami Kenji, Nishiyama Koichiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Association between swallowing function and muscle strength in elderly individuals with dysphagia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 261 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2020.09.007	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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 123
2. 論文標題 めまいの頭位治療とリハビリテーションの実際	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 385-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 92
2. 論文標題 高齢者のめまい疾患別 最新治療 心因性めまい	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 452-456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 244
2. 論文標題 【耳鼻咽喉科の問診のポイント-どこまで診断に近づけるか-】診断精度を上げる問診のポイント メニエール病が疑われる場合の問診のポイント	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ENTON1	6. 最初と最後の頁 57-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Murofushi Toshihisa, Goto Fumiyuki, Tsubota Masahito	4. 巻 11
2. 論文標題 Vestibular Migraine Patients Show Lack of Habituation in Auditory Middle Latency Responses to Repetitive Stimuli: Comparison With Meniere's Disease Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 26-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2020.00024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto Nobuko, Mutai Hideki, Namba Kazunori, Goto Fumiyuki, Ogawa Kaoru, Matsunaga Tatsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Profiles of DFNA11 at Diverse Stages of Development and Aging in a Large Family Identified by Linkage Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 26-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002604	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 該当する

1. 著者名 五島史行	4. 巻 122
2. 論文標題 小児のめまいへの対応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 989-991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 122
2. 論文標題 慢性めまいへの対応 心因性めまい.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 1102-1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 増田圭奈子, 五島史行, 松永達雄	4. 巻 78
2. 論文標題 小児めまいの問診票(DHI-PC)の検討 適応年齢について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 267-273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 五島史行, 寺邑堯信, 村上知聡	4. 巻 78
2. 論文標題 めまいと頭痛のダイアリーが前庭性片頭痛の診断に有用であった症例.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 562-566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 46
2. 論文標題 耳鼻咽喉科における見逃しやすい頭痛	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本頭痛学会誌	6. 最初と最後の頁 62-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 五島史行	4. 巻 46
2. 論文標題 めまい(耳鼻咽喉科)からみた前庭性片頭痛(臨床疫学)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本頭痛学会誌	6. 最初と最後の頁 179-183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五島史行
2. 発表標題 頭痛患者の耳鳴
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五島史行
2. 発表標題 緊急事態宣言下での耳鼻咽喉科初診患者の変化
3. 学会等名 耳鼻臨症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五島史行
2. 発表標題 補聴、音響治療の観点からの耳鳴患者の分類と無難聴性耳鳴の特徴
3. 学会等名 日本聴覚医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五島史行
2. 発表標題 最新の国際的診断治療に基づいためまい・平衡障害の疾患概念とその治療
3. 学会等名 日本神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五島史行
2. 発表標題 耳鼻咽喉科診療で知っておくと役立つ漢方治療 - パフォーマンス漢方 -
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五島史行
2. 発表標題 ミニシンポジウム めまいに対する加味帰脾湯処方症例
3. 学会等名 日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五島史行
2. 発表標題 シンポジウム メニエール病と前庭性片頭痛の類似点と相違点 前庭性片頭痛の疫学
3. 学会等名 日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2020年

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 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2020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	永田 栄一郎 (Nagata Eiichiro) (00255457)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	室伏 利久 (Murofushi Toshihisa) (30242176)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	
研究分担者	北原 紘 (Kitahara Tadashi) (30343255)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	

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
---------	---------