

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09899

研究課題名(和文) miRNA/TLR7を介した聴覚伝導路異種細胞間クロストーク解析と新規治療戦略

研究課題名(英文) Cross-talk analysis between heterotypic cell-cell communication via siRNA/TLR7 and new therapeutic strategy

研究代表者

林 賢 (HAYASHI, Ken)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：80534528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、聴覚細胞に過興奮性細胞死を起こすエクソソーム(Exo)miRNA let-7bが認知症指標となるミスマッチ陰性電位(MMN)に及ぼす影響を明確にすることである。Exo-miRNA let-7b処理神経細胞の逸脱検出応答はSSAI(Stimulus-Specific Adaptation Index)、培養神経回路の自発バーストを総発火率(TSR)により評価した。処理神経細胞の逸脱検出2次応答のSSAIは有意に減少し、間歇的自発バーストの発生を確認した。Exo-miRNA let-7bが、内耳-神経細胞との異種細胞間コミュニケーションを介することに起因する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、内耳細胞の過興奮性細胞死を引き起こすmiRNA let-7bが認知症等の神経障害における耳鳴あるいは脳過敏反応の原因となる可能性を示唆している。即ち、miRNA let-7bは、臨床的に聴覚中枢制御機能低下による耳鳴バイオマーカーとして有用であることを意味している。また、エクソソームは細胞への親和性も高く高率に細胞移入可能であり、miRNA let-7b阻害剤は耳鳴中枢制御機能をターゲットとした新規治療薬になり得る。本研究は、客観的な評価法・的確な治療法のない耳鳴で苦しむ多くの患者にとって大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Our objective is to clarify the impact of exosomal (exo-) miRNA let-7b inducing hyper excitability-induced auditory cell death to the mismatch negativity (MMN) reflecting an auditory memory traces in neural cells. Primary neuronal cells are prepared from Wistar rat brains. The stimulation selectivity of the deviance detection was evaluated by stimulus-specific adaptation index (SSAI), and the spontaneous burst-firing was estimated by total spike rate (TSR). SSAI was significantly decreased in the secondary response in exo-miRNA let-7b-treated cells. The intermittent spontaneous burst-firing was confirmed by the increase of TSR in neural circuitry after exposure of exo-miRNA let-7b. These results indicate that exo-miRNA let-7b holds the potential to decrease auditory MMN leading to the generation of the spontaneous burst-firing in neural cells. Our results suggest that exo-miRNA let-7b might disrupt the sensory memory network in the auditory-brain, decreasing the special perception.

研究分野：内耳基礎研究

キーワード：エクソソームmiRNA let-7b 異種細胞間コミュニケーション ミスマッチネガティビティ 間歇的自発バースト 初代神経培養細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本年、脳内炎症を伴う Cochlear Migraine (内耳性片頭痛)によるトップダウンシグナルが感音難聴や耳鳴を発症させるという興味深い報告がなされた。しかし、脳内からのトップダウンシグナルが内耳障害を起こすメカニズムについては、明らかではない。中枢神経系には髄膜リンパ管が存在し、高分子を排出するリンパ管ネットワークが存在するという興味深い論文が発表された (Louveau A, Nature, 2015)。2018年には慢性化した片頭痛、うつ病や認知機能障害には、脳内炎症が関与するという非常に興味深い論文が発表された (Ramachandran R, Semin Immunopathol, 2018) (Xie X, Neuron, 2018) (Miyahara J, J Neurosci, 2018)。さらに、脳内炎するリンパ管ネットワークが存在するという論文が発症を伴う Cochlear Migraine (内耳性片頭痛)のトップダウンシグナルが感音難聴や耳鳴を発症させるという衝撃的な報告もなされた (Lai JT, JAMA, 2018)。しかし、脳内炎症によるトップダウンシグナルが内耳障害を起こすメカニズムについては、明らかではないことが研究の背景である

2. 研究の目的

脳内炎症によって分泌されたエクソソーム内 microRNA (miRNA) let-7b が、Toll-Like-Receptor 7 (TLR7) と結合し、TLR7 シグナルを刺激した場合、神経細胞ネットワーク機能を低下させ、内耳感覚細胞死を誘導するか否かを実験的に証明することを目的としている。

3. 研究の方法

ウイスターラット (E18) から摘出した大脳皮質より初代培養神経細胞を樹立し、高密度 CMOS (complementary meta-oxide-semiconductor)-MEAs (microelectrode arrays) (provided by Professor Hierlemann, ETH Zurich, Switzerland) 上で分散培養した。ミスマッチ陰性電位 (MMN) の in vitro モデルを確立するために分散培養した神経細胞の電気活動性を計測した。刺激パラダイムとして、オッドボールブロック (Odd-ball paradigm) と多統制群ブロック (Many-standards paradigm) を使用した。オッドボールブロックは、高頻度に提示される標準刺激と、低頻度にランダムに提示される逸脱刺激の2つから構成される。多統制群ブロックは、刺激頻度が同じ複数の刺激パターンで構成される。本研究では、10パターンの刺激から刺激パターンを作成した。

4. 研究成果

本研究の目的は、細胞死・細胞興奮両方の制御をするエクソソーム内 miRNA let-7b を介した内耳感覚細胞-神経細胞間コミュニケーションによる細胞変性分子シグナル伝達解析と miRNA let-7b 阻害剤による聴覚伝導路における細胞死抑制効果の検討することである。

内耳細胞死を誘導する miRNA let-7b の神経細胞への影響を検討する目的にて胚齢 18 日目の ウィスターラットの胎児の脳皮質領域から抽出した神経細胞から樹立した初代培養神経細胞を CMOS-MEA 上で分散培養し、エクソソーム miRNA let-7b を細胞外から導入した。まず、miRNA let-7b 処理初代培養神経細胞から蛋白質を抽出し、western blot にて TLR7 の誘導を確認し、神経細胞の逸脱検出応答を評価する目的にて、刺激パラダイムを用い検討した。マウスの聴覚野においてミスマッチネガティビティ(MMN) と呼ばれる連続的同一刺激(標準刺激)を提示している時に、異なる刺激(逸脱刺激)を与えると発生する電位が存在するが、神経細胞は過去の入力履歴を基に将来入力される可能性のある刺激を予測しており、その予測が一致しなかったために生じる応答であると考えられている。我々が用いた実験系は、神経細胞の履歴依存的応答性を評価する際に用いられる実験系である。神経細胞による神経活動は、連続して提示される刺激に対しては、減弱する性質を持っている。我々は、逸脱刺激に対する応答が標準刺激に対する応答より大きくなる性質を利用した SSA(Stimulus-Specific Adaptation)インデックスと呼ばれる指標を用い、応答の刺激選択性を評価した。その結果、miRNA let-7b 導入細胞において、1 次応答においては SSAI_{dev/msc} 間に有意な差が見られなかった(pre Dev vs. post Dev, $p > 0.1$)が、2 次応答の SSAI は miRNA let-7b 導入によって有意に減少した(pre Dev vs. post Dev, $p = 0.015$)ことから、miRNA let-7b の細胞外導入により逸脱検出性は低下することを確認した。ミスマッチ陰性電位の低下は認知機能不全と深く関与するという報告はあるが、聴覚細胞に過興奮性細胞死を起こすエクソソーム miRNA が、神経細胞にも同様に及ぼす影響を神経活動性から評価する分散培養による実験系は確立されてはいなかった。今回の我々の実験系は聴覚障害の影響と認知機能低下が、エクソソーム miRNA を介した異種細胞間コミュニケーションによる可能性を示唆する結果として極めて興味深い。

次に、マウスの聴覚野において、連続的同一刺激(標準刺激)を提示する間に、異なる刺激(逸脱刺激)を与えた場合に発生する電位をミスマッチ陰性電位(MMN)と定義している。神経細胞は、連続して提示される刺激に対して活動自体が減弱する性質を持っているため、MMN の発生は、入力履歴を基に将来入力される可能性のある刺激が、神経細胞の予測に一致しなかったことに起因すると考えられている。我々の行った MMN の実験系は、細胞レベルで聴覚障害が認知機能に及ぼす影響の評価モデルになると考察している。

神経細胞の逸脱検出応答を評価する目的とした刺激パラダイムとして、オッドボールブロックと多統制群ブロックを使用した。オッドボールブロックは、高頻度に提示される標準刺激と、低頻度にランダムに提示される逸脱刺激の2つから構成される。標準/逸脱刺激を入れ替えた2つのオッドボール課題を行い、標準/逸脱刺激として入力した誘発応答の違いをみることで、履歴依存的応答が得られる。本研究では、標準:逸脱刺激の比は、9:1を用いた。多統制群ブロックは、刺激頻度が同じ複数の刺激パターンで構成される。本研究では、10パターンの刺激から刺激パターンを作成した。さらに、応答の刺激選択性を評価することを目的として、逸脱刺激に対する応答が標準刺激に対する応答より大きくなる性質を利用したSSAI(Stimulus-Specific Adaptation Index)と呼ばれる指標を用いた。応答の刺激選択性を評価する目的にて、誘発応答を一次応答(刺激後0-10ms)と二次応答(刺激後30ms以降)に分類し、各刺激後タイムヒストグラム(PSTH)の最大値より一次応答と二次応答の逸脱/多統制群刺激のSSAIを計算した。その結果、1次応答ではいずれの条件でも有意差が消失し、2次応答において、刺激点に重複の無いセッションでの逸脱刺激の応答は有意に減少した。重複の無い逸脱刺激のSSAIと重複の有るSSAIは、共に暴露後も有意差を認めた。暴露前に有意差のあった逸脱刺激対標準刺激のSSAIは暴露後も有意差を認めた(図1)。

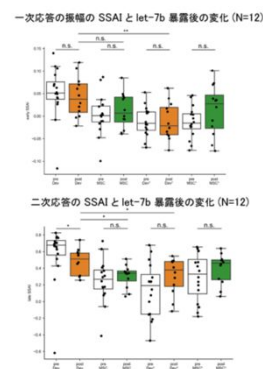


図1 let-7b暴露後培養神経回路におけるMMNIに1次応答と2時応答の変化

以上の結果より、Exo-miRNA let-7bの神経細胞暴露により、二次応答の逸脱検出性は低下することを確認した。この結果は、認知症の記憶障害はmiRNA let-7bに起因する可能性を示唆している。Exo-miRNA let-7b処理細胞において、間歇的自発バーストを確認した(図2)。この結果は、miRNA let-7bが認知症等の神経障害における耳鳴あるいは脳過敏反応の原因となる可能性を示唆している。

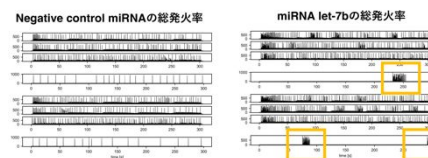


図2 Exo-miRNA let-7b処理後培養神経回路において、間歇的自発バーストの発生を確認した。Exo-miRNA let-7b処理によって神経回路に発生した間歇的自発バーストの発生は極めて稀な現象であり(Wagenaar GA, BMC Neuroscience. 2006)、誘発応答への影響と相関する可能性が示唆される。

本研究結果より、聴覚障害が認知機能低下に及ぼす影響は、内耳感覚細胞の過興奮性細胞死を誘導するExo-miRNA let-7bが、神経細胞との異種細胞間コミュニケーションを介在することに起因する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ken Hayashi, Yuna Suzuki Y, Chisato Fujimoto, Sho Kanzaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy for Genetics of Hearing Impairment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes11111331	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 Kishino A, Hayashi K, Maeda M, Jike T, Nomura Y, Oshima T	4. 巻 20(23)
2. 論文標題 Caspase-8 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Necroptosis Independent of the Apoptosis Pathway in Auditory 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Y, Miwa T, Nakashima M, Shirakawa A, Ishii A, Namba N, Kondo Y, Takeo T, Nakagata N, Motoyama K, Higashi T, Arima H, Kurauchi Y, Seki T, Katsuki H, Okada Y, Ichikawa A, Higaki K, Hayashi K, Minami K, Yoshikawa N, Ikeda R, Ishikawa Y, Kajii T, Tachii K, Takeda H, Orita Y, Matsuo M, Irie T, Ishitsuka Y.	4. 巻 155
2. 論文標題 Fine-tuned cholesterol solubilizer, mono-6-O- α -D-maltosyl- β -cyclodextrin, ameliorates experimental Niemann-Pick disease type C without hearing loss.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother	6. 最初と最後の頁 113698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.113698	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件／うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Ken Hayashi, Yuna Suzuki, Fumiyuki Goto, Yasuyuki Nomura, Sho Kanzaki, Chisato Fujimoto.
2. 発表標題 The effect of exosomal miRNA let-7b to the mismatch negativity as an auditory memory traces in cellular neural network.
3. 学会等名 The 125th American Academy Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO EXPO（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken Hayashi Hideaki Sakata
2. 発表標題 Exosomal miRNA let-7b inducing hyperexcitability-induced auditory cell death decrease the auditory sensorial memory in cellular neural network
3. 学会等名 The 48th NES Congress online (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken Hayashi, Yuna Suzuki, Fumiyuki Goto, Akihiro Kishino, and Kaoru Ogawa
2. 発表標題 The impact of extracellular miRNA let-7b as a top-down signal in the auditory-brain.
3. 学会等名 American Academy Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO EXPO (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken Hayashi, Yuna Suzuki, Akihiro Kishino, Fumiyuki Goto, Kaoru Ogawa
2. 発表標題 The interaction of TRL7 with TRPA1 drives hyperexcitability cell death modulated by miRNA let-7b in auditory cells.
3. 学会等名 43RD Association of research in Otolaryngology, Midwinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Akihiro Kishino, Yuna Suzuki, Yasuyuki Nomura, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa
2. 発表標題 TLR7-TRPA1 interaction drives hyperexcitability cell death modulated by miRNA let-7b in auditory cells
3. 学会等名 ICORL 2019 Symposium, Basic research in hearing loss (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Akihiro Kishino, Yuna Suzuki, Yasuyuki Nomura, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa
2. 発表標題 The cross-talk between exosomal miRNA, apoptosis and autophagy in auditory cell death
3. 学会等名 123thAAO-HNSF (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Yuna Suzuki, Akihiro Kishino, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa
2. 発表標題 The effect of hyperexcitability-induced cell death modulated by miRNA let-7b in the auditory-brain
3. 学会等名 12thAPSCI (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Hayashi
2. 発表標題 Autophagy Signaling Mechanisms Controlling Cell Fate in Auditory Cells -Cell death and Cellular Senescence-
3. 学会等名 The 25th Ajou Otology Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Hayashi, Hideaki Sakata
2. 発表標題 Exosomal miRNA let-7b modulates the interaction between TLR7 and TRPA1, inducing hyperexcitability-induced cell death in auditory cell
3. 学会等名 49th Congress of the Neurootological and Equilibrimetric Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken Hayashi, Hideaki Sakata
2. 発表標題 The functions of exosomal miRNA let-7b as a top-down signal disrupting the neural network in the auditory-brain
3. 学会等名 49th Congress of the Neurootological and Equilibrimetric Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 賢
2. 発表標題 TFEBによるオートファジー・リソソーム経路活性化を介した内耳細胞老化制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第32回 日本耳科学会 総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022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	神崎 晶 (KANZAKI, Sho) (50286556)	東京医療センター臨床研究センター・室長・講師 (82643)	
研究 分担者	高橋 宏知 (TAKAHASHI, Hirokazu) (90361518)	東京大学・大学院情報理工学系研究科・教授 (12601)	

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