

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18747

研究課題名(和文)新規オートファジー誘導タンパクを用いた感音難聴の病態解明と新規治療戦略

研究課題名(英文) Autophagy acceleration attenuates endoplasmic stress-induced cell death in auditory cells

研究代表者

岸野 明洋 (Kishino, Akihiro)

東北大学・加齢医学研究所・分野研究員

研究者番号：80825307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では内耳感覚細胞におけるオートファジーと小胞体ストレスによる細胞死の関連性を分子生物学的に解明することを目的とした。オートファジー関連遺伝子であるAtg7およびBeclin-1をノックダウンしたオートファジーの機能障害のある細胞では、小胞体ストレスに対してより多くの細胞死が誘導された。一方で、オートファジー誘導剤であるラパマイシンで処理し、オートファジーを活性化させた細胞では小胞体ストレスによる細胞死は減少した。これらの結果は、内耳感覚細胞においてオートファジー機能の活性化は小胞体ストレスに対して細胞防御機構として機能する可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感音難聴の病態生理については依然としてその病態は不明であり、有効性の明白なエビデンスを有する治療法は確立されていない。また、感音難聴の発症や予後を予期する客観性のある分子マーカーも存在しない。高度な感音難聴による患者のQOLの低下は著しく、社会的生活に大きな影響を及ぼす。また、加齢による感音難聴については高齢化社会の進行に伴い、患者数のさらなる増加が予想される。そのため、感音難聴に対する有効な新規治療法の確立の為に病態生理の解明が求められる。本研究における結果から、オートファジー機能の活性化は感音難聴を含む内耳疾患の病態解明や新規治療法の開発・発展応用へ貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：Autophagy dysfunction and endoplasmic reticulum (ER) stress in auditory cells are associated with the pathogenesis of sensorineural hearing loss (SNHL). This study aimed to uncover the association between autophagy and cell death in auditory cells under ER stress. We demonstrated that the acceleration of autophagy attenuates ER stress-induced cell death in HEI-OC1 cells. This inference was based on two important findings. First, autophagy impairment by knockdown of Beclin-1 and Atg7 led to the increase C/-EBP homologous protein (CHOP) expression and promotes much more cell death. Second, autophagy induction by rapamycin, an autophagy inducer, suppressed cell death with the decrease of CHOP expression. Together, our findings revealed that autophagy upregulation serves as a prosurvival mechanism by suppressing ER stress-induced cell death in auditory cells. The present study reveals that efficient autophagy induction is a potential target for SNHL.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：感音難聴 内耳感覚細胞 小胞体ストレス オートファジー 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感音難聴の病態生理について広範な研究と大きな臨床的関心にも関わらず、依然としてその病態は不明であり、有効性の明白なエビデンスを有する治療法は存在しない。また、感音難聴の発症や予後を予期する客観性のある分子マーカーも存在しない。高度な感音難聴による患者の Quality of life の低下は著しく、社会的生活に大きな影響を及ぼす。また、加齢による感音難聴については高齢化社会の進行に伴い、患者数のさらなる増加が予想される。有効な治療法の確立の為に更なる病態生理の解明が求められる。

小胞体ストレスは、高次構造の異常な折りたたみ不全タンパク質が小胞体内に蓄積することによって引き起こされる細胞内ストレスであり、神経変性疾患や老化などの病態に深く関与する。近年、小胞体ストレスが蝸牛有毛細胞におけるアポトーシスを誘導し、感音難聴の病態に関与することが報告された(Fujinami Y, et al. *J Pharmacol Sci* 2012)。我々はこれまでにメニエール病などの内耳疾患の臨床研究を行い、その臨床的特徴を報告してきた(Kishino A, et al. *Equilibrium Res* 2015)。その経験の中で臨床的に永続的でなく大きく変動する感音難聴を細胞死の観点からのみで説明することは困難であると考えた。その考えのもとに、細胞機能不全に拮抗する細胞内現象として細胞内主要分解機構の一つであるオートファジーに着目し、基礎研究として小胞体ストレス下の内耳感覚細胞における細胞死およびオートファジーの研究を行ってきた。小胞体ストレス下の内耳感覚細胞においてオートファジーとアポトーシスの両方が誘導されること、さらに XBP1 mRNA スプライシングはオートファジーを誘導し、かつ細胞保護機構として機能することを世界に先駆けて解明した(Kishino A, et al. *Sci Rep* 2017)。しかし、小胞体ストレス下の内耳感覚細胞における細胞死のシグナル伝達メカニズムおよびオートファジーとの関連性の分子メカニズムについては明らかになっていない。これまでの研究成果から感音難聴を含む内耳障害の病態メカニズム解明および新規治療戦略の開発には、内耳感覚細胞における細胞生死とオートファジーの分子生物学的な研究解明が必須であると考えた。

2. 研究の目的

小胞体ストレス下の内耳感覚細胞におけるオートファジーと細胞死のクロストークを中心とした細胞死シグナル伝達のメカニズムを分子生物学的に解明することを目的とする。その成果により、臨床的に感音難聴を中心とする内耳疾患の病態解明や新規治療法、分子マーカーの開発・発展応用へ貢献する。

3. 研究の方法

内耳培養細胞として HEI-0C1、小胞体ストレス誘導剤としてツニカマイシンを用いた。まず、内耳培養細胞において小胞体ストレスによって細胞死およびオートファジー誘導の検討を行った。その後、オートファジーと小胞体ストレスによる細胞死の関連性を検討するたえに、オートファジー関連遺伝子である Beclin-1 および Atg7 を siRNA を用いてノックダウンし、オートファジーの機能障害のある細胞を作成した。この細胞らに対する小胞体ストレスの影響を検討した。その後、オートファジー誘導剤であるラパマイシンで処理し、オートファジー機能を活性化させた細胞に対する小胞体ストレスの影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレス下の内耳感覚細胞における細胞死とオートファジーの検討

HEI-0C1 細胞に対する小胞体ストレスによる影響を確認するために、ツニカマイシン処理した細胞生存率を測定した。ツニカマイシンによる小胞体ストレス負荷は内耳培養細胞において

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

細胞死を誘導することを認めた。次に同様に処理した細胞においてウェスタンブロットによる解析を行うと、オートファジーマーカーである LC-11、小胞体ストレスマーカーである CHOP、GRP78 およびアポトーシスマーカーである cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 の発現上昇を認めた。同様に処理した細胞におけるフローサイトメトリーによる解析では Annexin V-FITC および PI 染色の両陽性の細胞分画の割合の増加を認めた。透過型電子顕微鏡による形態観察では、背生細胞における細胞質にはオートファゴソームの形成を認めた。また、アポトーシスの形態(クロマチンの凝集化、核の断片化)を示す細胞だけでなく、ネクロプトーシスの形態を示す細胞(細胞膜の破壊、腫脹したミトコンドリア、保存された核膜)も認められた。これらの結果から、小胞体ストレスは内耳感覚細胞においてオートファジーを誘導することを確認した。一方で、細胞死に関してはアポトーシスのみでなく制御されたネクローシスであるネクロプトーシスも誘導するのではないかと考えた。そこで、ネクロプトーシス阻害剤である Nec-1 で処理すると細胞死は軽減された。これらの結果は、ツニカマイシン処理による小胞体ストレスはアポトーシスのみでなく制御されたネクローシスであるネクロプトーシスも誘導すること可能性を示唆した。

(2) 小胞体ストレスによる細胞死とオートファジー機能の検討

オートファジーと小胞体ストレスによる細胞死の関連性を検討するために、オートファジー関連遺伝子である Beclin-1 および Atg7 をノックダウンし、オートファジーの機能障害のある細胞を作成した。この細胞をツニカマイシン処理して細胞生存率を測定した。ツニカマイシン処理した Beclin-1、Atg7 ノックダウン細胞はコントロール細胞と比較して有意に細胞生存率の低下を認めた。これらの結果は内耳感覚細胞においてオートファジーの機能障害は小胞体ストレスに対する脆弱性を増大させることを示唆する。

オートファジー誘導剤であるラパマイシンで処理した細胞は有意に細胞生存率の上昇を認めた。これらの結果は内耳感覚細胞においてオートファジーの機能障害は小胞体ストレスに対する脆弱性を増大させる一方で、オートファジー機能の活性化は小胞体ストレスに対して細胞防御機構として機能することを示唆する。一方で、Beclin-1 の機能を活性化する Tat-Beclin-1 は他の生物学的プロセスを非特異的に制御することなくオートファジーを単独に誘導する新しいオートファジー誘導タンパクであるが、HEI-0C1 には導入が難しく、その効果の評価は困難であった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. **岸野明洋**: 良性発作性頭位めまい症の患側はどちらか - 良性発作性頭位めまい症の特徴と耳石置換法の対象とする患側の決定法 - . 日大医学雑誌 78: 87-94, 2019.
2. 岸田杏子, 野村泰之, 地家真紀, 御子柴郁夫, **岸野明洋**, 木村優介, 三浦正稔, 戸井輝夫, 増田 毅, 嶋原俊太郎, 大島猛史: ハンドモデルによる内耳形態の学習効果: 「バンバン, フツ, カチャ」メソッド . Equilibrium Research 78: 157-163, 2019.
3. 野村泰之, 戸井輝夫, **岸野明洋**, 河野 航: 宇宙医学研究による平衡機能科学に学ぶ転倒予防 . 整形・災害外科 62: 743-748, 2019.
4. **岸野明洋**, 大島猛史: 有毛細胞における小胞体ストレスとアポトーシス . Clinical Neuroscience 37: 1481-1485, 中外医学社, 東京, 2019.
5. **Kishino A**, Hayashi K, Maeda M, Jike T, Hidai C, Nomura Y, Oshima T: Caspase-8 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Necroptosis Independent of the Apoptosis Pathway in Auditory Cells. International Journal of Molecular Science 20: 5896. DOI: 10.3390/ijms20235896,

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

2019.

6. 御子柴郁夫、野村泰之、嶋原俊太郎、齋藤磨理、**岸野明洋**、木村 優介、岸田 杏子、戸井 輝夫、増田 毅、齋藤雄一郎、大島猛史：MRI を撮るべきキーワードはなにか：当初末梢性めまいが疑われた後下小脳動脈 (PICA) 梗塞の 1 例．Equilibrium Research 79: 71-79, 2020.
7. **岸野明洋**、嶋原俊太郎、野村泰、大島猛史：メニエール病の聴力予後に影響する因子の検討．日大医学雑誌 78: 125-132, 2020.
8. **岸野明洋**、村上昌平、赤池孝章、本橋ほづみ：がんの代謝研究から：新たな創薬標的の可能性．医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 51: 576-584, 2020.
9. 野村泰之、**岸野明洋**：症例から診るめまい診療 良性発作性頭位めまい症．JOHNS 37: 25-31, 東京医学社, 東京, 2021.
10. 原 将太、**岸野明洋**、新藤秀史、原田英誉、平井良治、野村泰之、嶋原俊太郎、大島猛史：耳管開放症診断基準案 2016 による耳管開放症確実例の検討．Otology Japan 31: 50-57, 2021.
11. **Kishino A**, Masuda T, Nomura Y, Shigihara S, Oshima T. Comparison between MB11 BERAphone® and ALGO2e color for hearing screening in Japanese healthy newborns. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 144: 110673, 2021.

[学会発表](計9件)

1. **岸野明洋**, 林 賢, 野村泰之, 大島猛史：内耳感覚細胞における小胞体ストレス誘導性ネクロプトーシス．第 120 回学会通常総会・学術講演会, 大阪, 2019 年 5 月
2. **Kishino A**, Hayashi K, Hidai C, Nomura Y, Oshima T: Caspase-8 regulates ER stress-induced Necroptosis in Auditory Cells. The 123rd American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience, New Orleans, USA, 2019 年 9 月
3. **岸野明洋**：内耳感覚細胞における小胞体ストレス誘導性オートファジーとネクロプトーシス、アポトーシスの関連性の研究．令和元年度日本大学医学部同窓会臨時総会 同窓会 60 周年記念医学奨励基金研究助成金受領者成果報告, 東京, 2019 年 11 月
4. **Kishino A**, Hayashi K, Oshima T. Autophagy acceleration attenuates endoplasmic stress-induced cell death in auditory cells. The American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation 2020 Virtual Annual Meeting & OTO Experience, Virtual, 2020 年 9 月
5. Hayashi K, Suzuki Y, Goto F, **Kishino A**, Ogawa K. The Impact of Extracellular miRNA let-7b as a Top-Down Signal in the Auditory-Brain. The American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation 2020 Virtual Annual Meeting & OTO Experience, Virtual, 2020 年 9 月
6. **Kishino A**, Murakami S, Sekine H, Motohashi H. Cytoprotective and anti-aging function of NRF2 and its role in sulfur metabolism. Coldspring Harbor Meeting: Mechanisms of Aging, Virtual, 2020 年 9 月
7. 御子柴郁夫、嶋原俊太郎、野村泰之、**岸野明洋**、木村優介、齋藤雄一郎、大島猛史：温度刺激試験と vHIT の乖離がみられた慢性めまいの 1 例．第 79 回めまい平衡医学会総会・学術講演会, 横浜, 2020 年 11 月
8. 原 将太、嶋原俊太郎、**岸野明洋**、野村泰之、大島猛史：外耳道多形腺腫の 1 例．第 82 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会, 京都, 2020 年 12 月
9. **岸野明洋**、村上昌平、関根弘樹、本橋ほづみ．硫黄を利用した生体防御機構とエネルギー代謝．シンポジウム「Persulfide Biology and Medicine」第 73 回日本酸化ストレス学会 第 20 回日本 NO 学会 合同学術集会 WEB 開催, 2020 年 10 月

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 6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 岸野明洋、大島猛史	4. 巻 37
2. 論文標題 有毛細胞における小胞体ストレスとアポトーシス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1481-1485
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 Kishino A, Hayashi K, Maeda M, Jike T, Hidai C, Nomura Y, Oshima T	4. 巻 20
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 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 88-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20235896, 2019	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 岸野明洋	4. 巻 78
2. 論文標題 良性発作性頭位めまい症の患側はどちらか - 良性発作性頭位めまい症の特徴と耳石置換法の対象とする患側の決定法 -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日大医学雑誌	6. 最初と最後の頁 87-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4264/numa.78.2_87	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 岸田杏子, 野村泰之, 地家真紀, 御子柴郁夫, 岸野明洋, 木村優介, 三浦正稔, 戸井輝夫, 増田 毅, 嶋原俊太郎, 大島猛史	4. 巻 78
2. 論文標題 ハンドモデルによる内耳形態の学習効果：「バンバン、フツ、カチャ」メソッド	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 157-163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3757/jser.78.157	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 野村泰之, 戸井輝夫, 岸野明洋, 河野 航	4. 巻 62
2. 論文標題 宇宙医学研究による平衡機能科学に学ぶ転倒予防	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 743-748
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 御子柴郁夫、野村泰之、嶋原俊太郎、齋藤磨理、岸野明洋、木村 優介、岸田 杏子、戸井 輝夫、増田 毅、齋藤雄一郎、大島猛史	4. 巻 79
2. 論文標題 MRI を撮るべきキーワードはなにか : 当初末梢性めまいが疑われた後下小脳動脈 (PICA) 梗塞の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 71-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3757/jser.79.71	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 岸野明洋、嶋原俊太郎、野村泰、大島猛史	4. 巻 78
2. 論文標題 メニエール病の聴力予後に影響する因子の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日大医学雑誌	6. 最初と最後の頁 125-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4264/numa.79.3_125	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 岸野明洋、村上昌平、赤池孝章、本橋ほづみ	4. 巻 51
2. 論文標題 新たな創薬標的の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 576-584
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 野村泰之、岸野明洋	4. 巻 37
2. 論文標題 症例から診るめまい診療 良性発作性頭位めまい症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 25-31
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 原 将太、岸野明洋、新藤秀史、原田英誉、平井良治、野村泰之、嶋原俊太郎、大島猛史	4. 巻 31
2. 論文標題 耳管開放症診断基準案2016による耳管開放症確実例の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 50-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3950/jjibi inkoka.120.15	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, Masuda T, Nomura Y, Shigihara S, Oshima T	4. 巻 144
2. 論文標題 Comparison between MB11 BERAphone and ALG02e color for hearing screening in Japanese healthy newborns	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Pediatr Otorhinolaryngol	6. 最初と最後の頁 110673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijporl.2021.110673	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9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 岸野明洋, 林 賢, 野村泰之, 大島猛史
2. 発表標題 内耳感覚細胞における小胞体ストレス誘導性ネクロプトーシス
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kishino A, Hayashi K, Hidai C, Nomura Y, Oshima T
2. 発表標題 Caspase-8 regulates ER stress-induced Necroptosis in Auditory Cells
3. 学会等名 The 123rd American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸野明洋
2. 発表標題 内耳感覚細胞における小胞体ストレス誘導性オートファジーとネクロプトーシス、アポトーシスの関連性の研究
3. 学会等名 令和元年度日本大学医学部同窓会臨時総会 同窓会60周年記念医学奨励基金研究助成金受領者成果報告 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kishino A, Hayashi K, Oshima T
2. 発表標題 Autophagy acceleration attenuates endoplasmic stress-induced cell death in auditory cells
3. 学会等名 The American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation 2020 Virtual Annual Meeting & OTO Experience (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayashi K, Suzuki Y, Goto F, Kishino A, Ogawa K
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 The American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation 2020 Virtual Annual Meeting & OTO Experience (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kishino A, Murakami S, Sekine H, Motohashi H
2. 発表標題 Cytoprotective and anti-aging function of NRF2 and its role in sulfur metabolism
3. 学会等名 Coldspring Harbor Meeting: Mechanisms of Aging (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 御子柴郁夫、嶋原俊太郎、野村泰之、岸野明洋、木村優介、斎藤雄一郎、大島猛史
2. 発表標題 温度刺激試験とvHITの乖離がみられた慢性めまいの1例
3. 学会等名 第79回めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 将太、嶋原俊太郎、岸野明洋、野村泰之、大島猛史
2. 発表標題 外耳道多形腺腫の1例
3. 学会等名 第82回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸野明洋、村上昌平、関根弘樹、本橋ほづみ
2. 発表標題 硫黄を利用した生体防御機構とエネルギー代謝
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 第20回日本N0学会 合同学術集会 (招待講演)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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