

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592494

研究課題名(和文)オートファジー誘導による内耳保護作用の新規分子標的治療への応用

研究課題名(英文)The application of autophagy to prevent inner ear damage

研究代表者

五島 史行(Fumiyuki, Goto)

慶應義塾大学・医学部・客員講師

研究者番号：80286567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレス下で内耳培養細胞HEI-OC1にオートファジーが誘導されるかどうかを確認するため、GFP-LC3をHEI-OC1に遺伝子導入し、共焦点レーザー顕微鏡下にGFP-LC3の発現を細胞質内に確認した。その際に、形態的にはnecrosisを起こしていることを確認した。また、電子顕微鏡下でautophagic vacuolesを認め、酸化ストレス内耳培養細胞には、autophagyとnecrosisが同時に誘導されていることを確認した。また、オートファジー誘導剤であるラパマイシンを活性酸素処理したHEI-OC1に投与したところ、細胞生存率は活性酸素単独処理時と比較して有意に上昇した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the autophagy in inner ear cultured cell line of HEI-OC1 under the oxidative stress condition, GFP-LC3 was introduced to HEI-OC1. As a result, the appearance of GFP-LC3 was observed under the confocal microscope in cytoplasm of the cultured cell. In addition the necrosis was confirmed morphologically. From the observation of autophagic vacuoles was confirmed under the electron microscope, the both autophagy and necrosis was observed in the inner ear culture cell under the oxidative stress condition. Rapamysine as a autophagy inducer was applied the HEI-OC1 treated with reactive oxygen, the cell viability was significantly improved than Rapamysine (-) condition.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳鼻咽喉科 酸化ストレス オートファジー

1. 研究開始当初の背景

申請者はストレスや精神疾患と平衡障害についての臨床研究を行い、抗うつ薬による治療の有効性などについて報告してきた(2007年めまい平衡医学会賞)。その臨床経験から、特に酸化ストレスが、様々な内耳疾患の発症において重要な働きをしていることに着目し進行したメニエール病において酸化ストレスに対する脆弱性が亢進していることを報告した(Bioscience Trends. 2010)。一方、酸化ストレス下での細胞生死に、オートファジーが重要な役割をはたしていることが報告されている。オートファジーの破綻は、神経変性疾患(Hara T, Nature 2006)など様々な病態と関与しているが、内耳細胞におけるオートファジーの機能の詳細は不明である。今回、内耳細胞でのオートファジーの機能を解明し、メニエール病、感音難聴などの内耳障害治療に応用しようと発案したことが研究の背景である。

2. 研究の目的

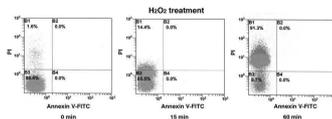
in vitro において、内耳培養細胞 HEI-OC1 を用いて酸化ストレス誘導性オートファジーの分子メカニズムを明らかにする。次に in vivo において内耳特異的オートファジー欠損マウスを作製し、内耳細胞においてオートファジーの機能と、内耳細胞生死への関与を明らかにする。さらに、ターゲットになる薬剤や遺伝子導入によって、オートファジーを活性化かせ、内耳細胞死を防止させることができるか検討する。

3. 研究の方法

平成 23 年度
内耳培養細胞を用いた in vitro でのオートファジーの検討
酸化ストレス (H₂O₂)、小胞体ストレス誘導剤あるいはオートファジー阻害剤 (3-AB) を加えた内耳培養細胞をオートファジー誘導剤 (mTOR 阻害剤; ラパマイシン) で処理する。その際に、オートファジーは GFP-LC3 を遺伝子導入した内耳培養細胞を用いモニタリングし、蛋白抽出キットを用いタンパク質を抽出し Western blot を行い、LC3 の定量化を行う。次に、ATG7, p62 のタンパク質レベルでの発現検討を行う。連携研究者の小松と連携し、Western blot の条件等を設定し、タンパク質の解析を行う。
siRNA を用いて、ATG7, p62 の内耳培養細胞での発現を抑制し、オートファジー不全状態を作り、これらの遺伝子が、内耳培養細胞の生死にどのように関与するかを検討する。また、オートファジー選択的分解基質と考えられている p62 の内耳培養細胞における機能解析を行う。さらに、内耳培養細胞におけるオートファジー制御伝達経路 (mTOR: target of rapamycin カスケード) に関係する多様なタンパク質の発現と機能について検討する。

酸化ストレス (H₂O₂) あるいはオートファジー阻害剤で処理された内耳培養細胞の細胞死は、Necrosis か Apoptosis のいずれが原因であるかを確認するため、FACScan Analysis を行う。申請者は、酸化ストレス (H₂O₂) 処理された内耳培養細胞 (HEI-OC1) は、Necrosis Cell が時間依存性に増加すること (図 6) を確認している。

図6 Flow cytometry analysis



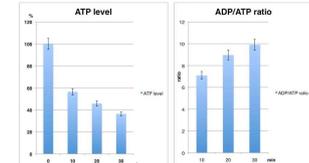
Flow cytometry解析の結果は、内耳培養細胞を2μM H₂O₂ 処理した場合、necrotic cellのみが増加し、apoptotic cellは全く認めないことを示している。

同条件下で ATP/ADP ratio kit (Bioassay Systems) を用いて、オートファジーを誘起する細胞内

ATP 濃度低下と細胞内 ADP 濃度増加を確認する。申請者は、酸化ストレス (H₂O₂) 処理された内耳培養細胞は、時間依存性に細胞内 ATP 濃度が低下することと ADP/ATP 比が時間

依存性に増加することを確認している (図 7)。

図7 内耳培養細胞内ATP濃度とADP/ATP比率



左図は内耳培養細胞内のATP濃度を、右図は内耳培養細胞内のADPとATPの比を示している。H₂O₂ 処理した内耳培養細胞内ATP濃度は時間依存性に低下したが、逆にADPとATPの比は時間依存性に増加した。

平成 24 年度
GFP-LC3 遺伝子導入マウスによる in vivo でのオー

トファジーの検討

GFP-LC3 遺伝子導入マウス (理研リソースセンターより購入) を用い、酸化ストレス (H₂O₂) あるいはオートファジー阻害剤 (3-AB) を内耳に直接投与し、月齢ごとに聴性脳幹反応と、ATG7, p62 を用いた内耳の免疫組織学的検討を行う。内耳特異的オートファジー欠損マウスの内耳に蓄積する異常蛋白質をプロテオーム解析により検討する。

平成 25 年度

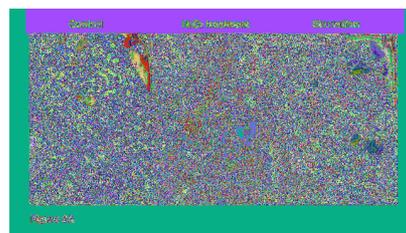
内耳特異的オートファジー欠損マウス (ATG7 KO mice) による in vivo でのオートファジーの検討

内耳特異的オートファジー欠損マウスの作製を共同研究者の小松と行う。内耳有毛細胞の発生に特異的に関係している Math1 をターゲットにした ATG7 KO mice の作製を予定している。

4. 研究成果

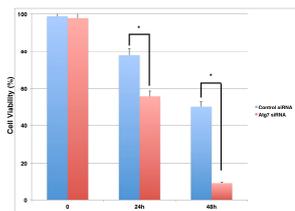
酸化ストレス下では内耳培養細胞 HEI-OC1 にオートファジーが誘導されるかどうかを確認することを目的として、GFP-LC3 を HEI-OC1 に遺伝子導入し、共焦点レーザー顕微鏡下にて GFP-LC3 の発現を細胞質内に確認した。その際に、核は扁平化、細胞質は膨張し、形態的には necrosis を起こしていることを確認した。

また、



電子顕微鏡下で autophagic vacuoles を認めた。すなわち、酸化ストレス内耳培養細胞には、autophagy と necrosis が同時に誘導されていることを確認した。

オートファジーが酸化ストレス下で内耳細胞生死のいずれに関与するのかを確認することを目的として、オートファジー誘導剤であるラパマイシンを活性酸素処理した HEI-OC1 に投与したところ、細胞生存率は活性酸素単独処理時と比較して有意に上昇した。逆に、オートファジー関連遺伝子である Atg7 を siRNA によってノックダウンし、オートファジー誘導を止めた場合、細胞生存率は有意に著しく低下した。この結果は、オートファジーが酸化ストレス下での内耳細胞生存に非常に重要な役割を果たしていることを示唆している。



Western blot 法にて、酸化ストレス処理した HEI-OC1 に p62, Nrf2, Keap1 の時間依存性の発現増加を確認した。Atg7 を siRNA によりノックダウン (KD) すると p62 の発現は低下したが、Nrf2, Keap1 の発現は不変であった。酸化ストレス下での Atg7KD 細胞では p62, Nrf2, Keap1 の発現も不変であり、細胞生存率は Atg7 正常細胞と比較して有意に低下した。この結果は、酸化ストレス下での内耳細胞には p62, Nrf2, Keap1 の間に直接的な分子クロストークが存在し、この分子クロストークが細胞生存に促進的な役割を果たしていることを示唆している。

オートファジーを誘導することにより、酸化ストレス下での内耳細胞死を防ぐことが可能になること、さらに酸化ストレス下において p62, Nrf2, Keap1 の分子クロストークが内耳細胞の酸化ストレス防御機構に重要な役割を果たしていることを確認した。この結果は、オートファジーを介して p62, Nrf2, Keap1 の分子クロストークを活性化することが、酸化ストレスから内耳を保護し、新規分子標的治療につながる可能性を示唆している。

内耳培養細胞 HEI-OC1 に、Atg7 siRNA をエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、Atg7 をノックダウン (KD) させることでオートファジー不全状態を作製した。Western blot 法にて、オートファジー不全状態の内耳感覚細胞において、Keap1, Nrf2 の発現は著しく増加したが、p62 の発現は不変であった。

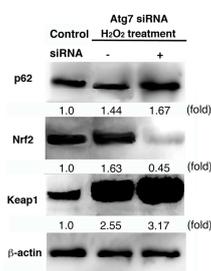


Figure 6C

での Atg7 KD 細胞では、Keap1, p62 の発現は著しく増加したが、逆に Nrf2 は低下した。また、免疫染色にては、Keap1, p62 が細胞内に蓄積したが、逆に Nrf2 は完全に消失したことを確認した。これは、オートファジー不全状態の内耳感覚細胞は、酸化ストレス下において Nrf2 は全く機能しないことを示し、その結果として、酸化ストレスへの脆弱性が亢進する可能性を示唆している。また、p62, Nrf2, Keap1 の分子間クロストークが内耳細胞死シグナル伝達において中心的な役割を果たしていることも示唆している。これは、平成 23 年度に確認した Atg7 KD 細胞を H₂O₂ に暴露した場合、細胞生存率が著しく低下した結果を裏付ける結果と考える。

また、理研より譲渡された GFP-LC3 レポーターマウスを用いて、内耳でのオートファジー誘導を可視化した。GFP-LC3 の発現は外有毛細胞とらせん神経節細胞で活性化していた。この結果は、オートファジーは、外有毛細胞とらせん神経節細胞でのみ誘導される可能性があることを示している。また、Atg7 を内耳特異的にノックアウトしたオートファジー欠損マウスを作製した。その結果、組織学的に、コルチ器では Atg7 の発現は消失していたが、神経節細胞では Atg7 の発現は残存していた。ABR にて、高音域に有意な聴力低下を確認した。この結果は、外有毛細胞において、オートファジーは、その維持に必要不可欠であることを示唆している。

有毛細胞、らせん神経節細胞、支持細胞にも分化能のある内耳培養細胞 HEI-OC1 細胞を用いた実験を行った。p62 siRNA をエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、p62 をノックダウン (KD) させることで、オートファゴソーム形成不全内耳感覚細胞を作製した。Western blot 法を用いて、p62 KD HEI-OC1 細胞において、LC3-II の発現は著しく低下することを確認した。ところが、Keap1 の発現は低下したが、Nrf2 の発現には変化があまりなかったことを確認した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、p62 KD HEI-OC1 細胞における Nrf2 と Keap1 の局在を検討したところ、Nrf2 は核内に移行し、Keap1 は細胞質内に蓄積することを確認した。さらに、酸化ストレス下での p62 KD 内耳感覚細胞は、細胞内クリアランス低下により酸化ストレスに対する脆弱性が増し、細胞死が促進すること

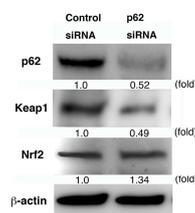


Figure 5B

も確認した。p62 は、内耳感覚細胞においてオートファゴソーム形成に中心的な役割を果たしていることが主たる原因であると推察している。さらには、内耳感覚細胞における p62 は、オートファジーと Nrf2/Keap1 シグナル伝達を介し、内耳感覚細胞死制御の中心的な役割を果たしていることを示唆している。Nrf2 KD 細胞では、Keap1, p62 の発現は共に低

下した。Keap1 KD細胞では、Nrf2 とp62の発現は、共に低下した。これらの結果は、内耳感覚細胞におけるp62, Nrf2, Keap1の間には、分子間クロストークが確実に存在することを示している。この結果は、平成24年度までに行った酸化ストレス下の内耳感覚細胞におけるp62, Nrf2, Keap1の相互作用を裏付ける結果と考えている。

平成23年度の研究成果である「酸化ストレス下での内耳感覚細胞において、オートファジー誘導は、細胞生存に中心的な役割を果たす。」という結果と、平成24年度の成果である「内耳感覚細胞では、p62を介してオートファジーとKeap1/Nrf2がリンクし、酸化ストレスから防御している」という結果を基盤にして研究を進行させ、最終年度である平成25年度は、免疫組織学的検討において、p62 KD HEI-0C1細胞は、無処理状態ではNrf2は細胞を防御するため核内移行するものの、酸化ストレス下ではNrf2は核内から消失した。逆に、Keap1は細胞内に蓄積することを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。Western blot法において、p62 KD HEI-0C1細胞は、無処理状態でNrf2の発現は不変であり、Keap1の発現はやや増加すること、酸化ストレス下ではNrf2の発現はやや低下し、Keap1は増加することを確認した。この結果は、酸化ストレス下での内耳感覚細胞は、p62を介したオートファジーは、Keap1/Nrf2シグナルとクロストークを形成し、酸化ストレスに対する内耳感覚細胞内防御機構の中心的な役割を果たしていることを示唆する全く新しい知見である。すなわち、p62, Keap1, Nrf2のクロストークは、急性感音性難聴の新たなバイオマーカーになりうると考えている。一方で、in vivo studyにも取り組み、内耳特異的Atg7欠損マウスを作製し、高音域を中心とする進行性感音難聴モデルを作製した。この結果は、全く新しい知見であり、内耳感覚細胞レベルにおけるオートファジーは、個体レベルでの老人性難聴を含む高音障害型感音難聴の解明を大きく前進させる研究であると自負している。

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 2件)

- 1) Tanigawa T, Odkhuu E, Morikawa A, Hayashi K, Sato T, Shibata R, Goto F, Ueda H, Yokochi T. Immunological role of prostaglandin E2 production in mouse auditory cells in response to LPS. 査読あり *Innate Immun.* 2013 Sep 20. [Epub ahead of print]
- 2) Tanigawa T, Morikawa A, Hayashi K, Dan K, Tsuchihashi N, Goto F, Ueda H, Yokochi T. Auditory cells produce nitric oxide in

response to bacterial lipopolysaccharide. 査読あり *Innate Immun.* 2013;19(2):115-20.

[学会発表] (計 11件)

- 1) Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Nana Tsuchihashi, Yasuyuki Nomura, Takeshi Masuda, Masato Fujioka, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa : Molecular mechanism of tinnitus from the standpoint of autophagy : 第23回日本耳科学会 2013年11月24日 宮崎
- 2) 土橋 奈々、林 賢、五島 史行、神崎 晶、藤岡 正人、小宗 静男、小川 郁 : 内耳培養細胞におけるオートファジーと細胞老化についての検討 : 第23回日本耳科学会 2013年11月24日 宮崎
- 3) Ken Hayashi, Katsuaki Dan, Fumiyuki Goto, Nana Tsuchihashi, Yasuyuki Nomura, Masato Fujioka, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa : Physiological significance of p62-mediated autophagy in auditory cells : 第117回AAO-HNSF 2013年9月30日 カナダ バンクーバー
- 4) Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Nana Tsuchihashi, Masato Fujioka, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa : Molecular mechanism of tinnitus from the standpoint of autophagy : 第117回AAO-HNSF 2013年9月30日 カナダ バンクーバー
- 5) N. Tsuchihashi, K. Hayashi, F. Goto, M. Fujioka, S. Kanzaki, K. Ogawa : H2O2 Treatment Accelerates Autophagy and Cellular Senescence in Auditory Cell Line : 第117回AAO-HNSF 2013年9月30日 カナダ バンクーバー
- 6) Ken HAYASHI, Katsuaki DAN, Fumiyuki GOTO, Nana TSUCHIHASHI, Yasuyuki NOMURA, Masato FUJIOKA, Sho KANZAKI, Kaoru OGAWA : Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy in auditory cells : IFOS 2013年6月1日 韓国 ソウル
- 7) Nana Akagi TSUCHIHASHI, Ken HAYASHI, Fumiyuki GOTO, Masato FUJIOKA, Sho KANZAKI, Kaoru OGAWA : H2O2 exposure accelerates autophagy and cellular senescence in auditory cell line. IFOS 2013年6月1日 韓国 ソウル
- 8) 林 賢、五島 史行、土橋 奈々、本村 朋子、野村 泰之、藤岡 正人、神崎 晶、小川 郁 内耳培養細胞を用いた細胞死、細胞老化メカニズムの解明とオートファジーを焦点とする新規治療に関する検討、第22回日本耳科学会総会、学術講演会 公募シンポジウム (内耳疾患の病態と治療に関する基礎研究)、2012年10月4-6日、名古屋
- 9) Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Sho Kanzaki and Kaoru Ogawa : Persistent Activation of Nrf2 through p62 in Auditory Cells : The 116th American Academy

Otolaryngology-Head and Neck Surgery
Foundation Annual Meeting & OTO EXPO,
September 9-12, 2012, Washington, DC, USA,
10) Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Sho Kanzaki,
Nana Tsuchihashi, Yasuyuki Nomura and
Kaoru Ogawa;Molecular crosstalk between
Keap1/Nrf2 signaling pathway, autophagy
and necrosis in auditory cells
The First Asian Otology Meeting & the 3rd
Asian Symposium on Otology, June 2-3, 2012,
Nagasaki, Japan,

11) 林 賢、五島 史行、土橋 奈々、本村 朋
子、野村 泰之、藤岡 正人、神崎 晶、小川
郁:内耳感覚細胞における Keap1/Nrf2 分子ク
ロストークとオートファジー:第 113 回日本
耳鼻咽喉科学会総会 2012 年 5 月 10-12 日、
新潟、日本

〔図書〕(計 1 件)

1) 五島史行 金原出版 自宅で治せるめま
いりハビリ 2013 年 88 頁

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五島史行 (Goto Fumiyuki)
慶應義塾大学 医学部 客員講師
研究者番号: 80286567

(2) 研究分担者

神崎 晶 (Kanzaki Sho)
慶應義塾大学 医学部 講師
研究者番号: 50286556

(3) 連携研究者

小松 雅明 (Komatsu Masaaki)
東京都医学研究機構プロジェクトリーダー
研究者番号: 90356254