

令和元年5月28日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11197

研究課題名(和文) 蝸牛培養細胞における小胞体ストレス応答

研究課題名(英文) Endoplasmic stress response in cochlear culture

研究代表者

大石 直樹(Oishi, Naoki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10348740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛培養細胞において、小胞体ストレスの3つの主要pathwayであるPERK pathway, IRE1 pathway, およびATF 6 pathwayの評価を行った。その結果、IRE 1 pathwayはapoptosisなどの細胞死評価を行うのが可能であったが、その他の2つのpathwayは蝸牛培養細胞上では適切な染色が難しく、評価は困難であることが判明した。IRE 1 pathwayの特異的マーカーCHOPの評価は可能であったが、細胞死レスキューの有効な系の確立が困難であった。結果として、蝸牛有毛細胞死における小胞体ストレスの関与に関する新たな知見を得るのが困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感音難聴は未だ有効な治療法に乏しく、病態生理の解明と有効な治療戦略の確立が急務である。これまでのモデル動物や臨床試験から、一部の難聴の発症機序に酸化ストレスが関与することが明らかとなっているが、抗酸化剤antioxidantによる治療効果は動物実験レベルですら十分でない。そのため酸化ストレス以外の病態生理も難聴の発症に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、蝸牛培養細胞の細胞死における、小胞体ストレスの関与を明らかにすることを目的としたが、有意義な結果を得ることが困難であった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated three major pathways of endoplasmic reticulum stress in cochlear culture. The IRE 1 pathway was able to be evaluated, however the other two pathways, PERK pathway and ATF 6 pathway, was difficult to be evaluated in cochlear culture. The specific ER stress marker CHOP was activated in cochlear culture but was not able to be rescued. As a result, we failed to obtain a new result about ER stress and hearing loss.

研究分野：耳科学

キーワード：小胞体ストレス 蝸牛 難聴

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は未だ有効な治療法に乏しく、病態生理の解明と有効な治療戦略の確立が急務である。これまでのモデル動物や臨床試験から、一部の難聴の発症機序に酸化ストレスが関与することが明らかとなっているが、抗酸化剤 antioxidant による治療効果は動物実験レベルですら十分でない。そのため酸化ストレス以外の病態生理も難聴の発症に関与している可能性が考えられ、治療成績向上のためにも新規病態生理の解明が重要である。

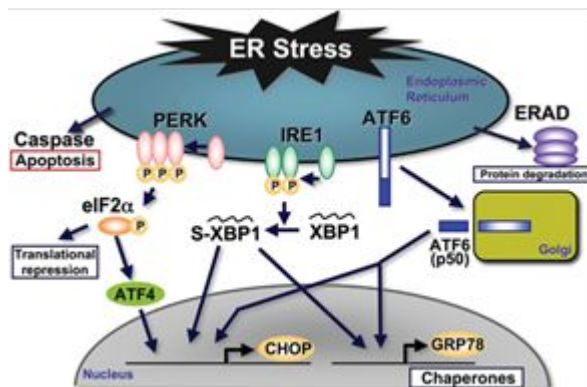
小胞体ストレスは異常タンパクが小胞体に蓄積することで細胞死を引き起こす致死的ストレスの一種である。小胞体はタンパク質を正常におりたたむ過程を担う重要な細胞内小器官である。小胞体内でのタンパク質折りたたみ機構の恒常性の維持は細胞の生存のために必須であるが、感染や炎症などの影響を受け、細胞内に異常な構造タンパク質が蓄積してしまう状態を小胞体ストレスと呼ぶ。異常タンパク質を処理し、恒常性を維持するための細胞内機構として、小胞体ストレス応答が存在することがいままでも明らかとなっており、小胞体ストレス応答の破たんにより、アポトーシスが誘導される。これまでに、糖尿病や肥満、悪性腫瘍や神経変性疾患の発症に深く関与することが明らかとなっている。

研究代表者の大石はマウスへのゲンタマイシン局所投与による薬剤性難聴モデルで、蝸牛ラセン神経節細胞死に小胞体ストレスが関与することを明らかにした (Oishi et al, Cell Death Dis 6:e1763, 2015)。また、音響外傷モデルマウスでは小胞体特異的タンパク質 GRP78 の発現が傷害後に変化することを示し (Oishi et al, ARO Meeting, 2012)、さらに加齢性難聴モデルマウスを用いて小胞体ストレスの軽減は加齢性難聴の予防に効果的であることを発見した (大石、日耳鼻、2015)。

その他、他施設からの報告では、小胞体ストレス誘導剤の蝸牛内投与が有毛細胞死を引き起こし (J Pharmacol Sci, 2012)、またアセトアミノフェン長期投与による聴覚障害の発症機序に小胞体ストレスが関与する (Hear Res, 2014) ことなどが示され、小胞体ストレスは感音難聴発症の一つの機序である可能性が高く、より詳細な検討が必要と考えられる。

### 2. 研究の目的

小胞体ストレス応答には、3つの主調節器 (master regulator) があることが知られている (浦野、2009) (下図)。それらは IRE1 (inositol requiring 1), PERK (PKR-like kinase), そして ATF6 (activating transcription factor 6) であり、それぞれの下流にある pathway からの情報は核内で統合され、小胞体ストレス応答の標的遺伝子の転写が活性化される。



脾臓を初めとする他臓器ではこれらのストレス反応の詳細が明らかになってきているが、蝸牛における小胞体ストレス応答の詳細は全く解明が進んでいない。結果として、小胞体ストレスの緩和による感音難聴の軽減効果に関する検討はほとんど報告されておらず、わずかに研究代表者が薬剤性難聴モデルマウスへ投与した内因性胆汁酸 tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) による難聴軽減効果が報告されているのみである (Oishi et al, Cell Death Dis 6:e1763, 2015)。

以上から、感音難聴に対する有効な治療戦略の1つの柱として小胞体ストレス阻害剤の使用が有効かどうかの検討をさらに行うことは、有効な治療法のない感音難聴への対応を改善させるために非常に重要な意義を有すると考えられる。

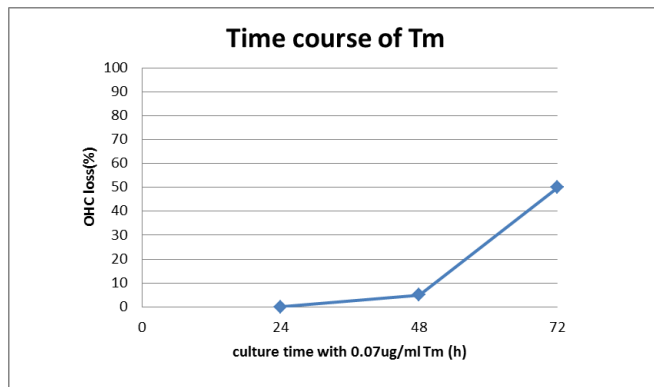
### 3. 研究の方法

小胞体ストレスの惹起による蝸牛有毛細胞およびラセン神経節細胞の細胞死が生じるかどうかを蝸牛細胞培養系で確認した。その後、小胞体ストレス応答が有毛細胞およびラセン神経節細胞のそれぞれの系で細胞死にどうかかわっているか、についての詳細を検討した。さらには、小胞体ストレスに対する複数の小胞体ストレス阻害剤による細胞保護効果について検討し、

有効な薬剤をスクリーニングした。その後、それらの薬剤が培養細胞系でのアミノグリコシドおよびシスプラチンによる蝸牛細胞死を軽減させる効果があるかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

まず蝸牛有毛細胞に対するゲンタマイシンおよびツニカマイシン（小胞体ストレスを惹起する薬剤）による、濃度別の細胞死の割合を評価した。その結果、両者ともに濃度が高まるにつれて、細胞死の割合が高くなることを確認でき、小胞体ストレスによって有毛細胞死を生じることを確認した。



小胞体ストレスの各 pathway である PERK pathway, IRE1 pathway, および ATF 6 pathway の評価を行った。当初予定していた Math1-nGFP マウスを用いた検討は、安定した結果を得るのが難しく、一般購入ができる CBA/J マウスの系統を用いて評価検討を行った。その結果、ツニカマイシン投与後、IRE 6 pathway は apoptosis などの細胞死評価を行うのが可能であったが、その他の 2 つの pathway は蝸牛培養細胞上では適切な染色が難しく、評価は困難であることが判明した。すなわち、IRE 6 pathway の細胞死は、特異的なマーカーである CHOP の発現を評価することで、評価可能であった。一方、他の pathway のマーカーである p-eIF2a などは適切な染色にて評価することができなかった。

そのため、CHOP の発現に評価対象を絞り、小胞体ストレス阻害剤 TUDCA による細胞保護効果を検討した。TUDCA による保護効果は、ある程度容量依存性に有毛細胞およびラセン神経節細胞を小胞体ストレスから保護することが確認できたが、データのばらつきが大きく、有効な評価系を確立することができなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：藤岡 正人

ローマ字氏名：FUJIOKA, Masato

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：専任講師

研究者番号(8桁): 70398626

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、研究者個人に帰属されます。