

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861598

研究課題名(和文)メニエール病における内リンパ嚢細胞内ストレス応答を焦点とした分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)The analysis of molecular mechanism of Meniere disease based on the cellular stress response of endolymphatic sac cell

研究代表者

増田 毅(MASUDA, Takeshi)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：60625218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：内耳培養細胞HEI-OC1を小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンで処理した細胞生存率の結果から、小胞体ストレス誘導性細胞死モデルの条件を設定した。電子顕微鏡下で、オートファゴソームの中で損傷したミトコンドリアが分解されている像を確認した。Western blot法で、IP3RとCHOPは処理後12時間をピークに減少することを確認した。BDNFとCAPS2の発現は、時間依存性に低下した。Atoh1とMyosin7aの発現も時間依存性に低下した。内耳感覚細胞における小胞体ストレス応答、BDNFシグナルを介したIP3R活性とオートファジーの間にクロストークが存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cell viability after treatment of Tunicamycin was decreased in dose- and time- dependent manner. We defined this condition as the model of ER stress-induced auditory cell death. The findings that injured mitochondria surrounded by autophagosomes were confirmed under TEM. The expression of LC3-II was time-dependently increased in Tunicamycin-treated cells. These results mean that autophagy was consistently induced in Tunicamycin-treated cells. The expression of IP3R and CHOP was decreased after peaking at 12 hours after the treatment of Tunicamycin. The expression of BDNF and CAPS2 was time-dependently decreased in Tunicamycin-treated cells. The expression of Bcl-2 and Beclin1 was decreased in Tunicamycin-treated cells. The expression of Atoh1 and Myosin VIIA after treatment of Tunicamycin was time-dependently decreased. Our results lead to the suggestion that there is a signaling cross talk between ER stress response, IP3R activity through BDNF and autophagy in auditory cells.

研究分野：聴覚

キーワード：内耳 小胞体 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) メニエール病は、様々なストレスが誘因となる内リンパ嚢機能不全が、内リンパ水腫を誘発することが病態であると考えられている。申請者は、メニエール病をはじめとするめまい症状に精神的ストレスが深く関与することに着目し、臨床研究を行ってきた。一方、基礎研究においては、内リンパ水腫に関する動物モデルを用いた研究がなされてきたが、細胞レベルでのストレス応答を中心とした本研究における試みは、世界でも皆無である。

(2) 細胞は、絶えず酸化ストレスなどの外的ストレスや小胞体ストレスなどの細胞内ストレスにさらされている。近年、Higoら (Neuron. 2010) によって、小胞体ストレスが、小胞体に局在しカルシウム放出チャンネルとして機能する IP3R (イノシトール三リン酸) 受容体の機能破壊を起こし、細胞内でセカンドメッセンジャーとして細胞応答に作用するカルシウムの恒常性を攪乱し、神経細胞死を引き起こすことが報告された。小胞体ストレスによる細胞死は、内耳感覚細胞障害の原因になると考えられている (Fujinami, J Pharmacol Sci. 2012)。

(3) しかし、小胞体ストレスが内リンパ嚢上皮細胞と前庭有毛細胞の IP3R に及ぼす影響はメニエール病の病態を解明するために重要であるが、現在まで着目されてこなかった。そのため、申請者は House Research Institute より内リンパ嚢上皮細胞培養細胞、前庭有毛培養細胞を独自に入手し、それらの細胞における IP3R の機能解析を行い、小胞体ストレス下でのカルシウムイオン細胞応答機構を中心とする細胞死と細胞内 Na-K イオンバランスの影響について検討することを目的とし本研究を発案した。

2. 研究の目的

(1) カルシウムは、細胞内においてセカンドメッセンジャーとして機能し、細胞分裂、細胞死など様々な細胞応答制御を行っている。このカルシウムを制御するのが小胞体に局在する IP3R である。一方で、小胞体ストレスによって IP3R の機能は低下し、細胞内のカルシウムの恒常性が攪乱され、アポトーシスとオートファジーが誘導される (Decuyper JP, Autophagy, 2011)。しかし、内耳感覚細胞における小胞体ストレス下での IP3R 機能不全、カルシウム恒常性攪乱と細胞死の関係は明らかではない。

(2) 本研究では、内耳感覚培養細胞 HEI-OC1 を用いて、小胞体ストレス下で IP3R を中心とする細胞内カルシウム代謝が、1) どのように

して細胞死を誘導するのか、2) どのように Na-K イオン動態に影響を及ぼすのかを検討する。これまで、内リンパ水腫のメカニズムについての研究は、Na-K イオンの動態とアポトーシスの観点から様々な in vivo 研究が行われてきた。

(3) 今までの研究からは、メニエール病に対するストレスの直接的影響は説明できない。今回の研究では、細胞レベルにおいて、小胞体ストレスが内耳感覚細胞の IP3R に与える影響と、その結果生じるカルシウム恒常性攪乱が誘発する細胞死、さらには Na-K イオン動態への影響を検討することが可能になる。この研究はメニエール病におけるストレスの直接的影響を確認することにもつながり、新規性が高く独創的な研究となる。

3. 研究の方法

(1) 内耳培養細胞は、HEI-OC1 (Kalinec GM, Audiology & Neurology, 2003) を使用した。小胞体ストレス誘導剤として、ツニカマイシン (Sigma) を使用した。細胞生存率測定は、トリパンブルー染色を行い Countess® (Invitrogen, Life Technologies, USA) を用いて検討した。Western blot 法にて、IP3R、オートファジーモニタリングマーカー LC3-II、さらには BDNF と BDNF 調節因子 CAPS2、BDNF 特異的受容体 TrkB、アポトーシス抑制因子 Bcl-2、オートファジー制御因子 Beclin1、小胞体ストレス応答因子 CHOP、内耳マーカー Math1、Myosin 7a、Nestin について発現検討を行った。

(2) 細胞形態観察は、透過電子顕微鏡 (TEM) にて行った。

4. 研究成果

(1) ツニカマイシン処理後の HEI-OC1 の細胞生存率は、時間・濃度依存性に低下した。アポトーシス誘導にも関与する小胞体ストレス応答因子 CHOP は、処理後 12h をピークに誘導された。IP3R も同様に処理後 12h をピークに誘導された。一方で、オートファジーモニタリングマーカー LC3-II は、時間依存性に誘導された。透過電子顕微鏡下では、処理後 24h にてオートファゴソームの形成を、48h 後にはオートリソソーム形成を示す二重膜構造を確認した。この結果は、ツニカマイシン処理後 48 時間にて、オートファジーが確実に誘導されていることを示している。

(2) アポトーシス抑制因子 Bcl-2 とオートファジー制御因子 Beclin1 の発現は、時間依存性に低下した。この結果も、アポトーシスとオートファジーの誘導を裏付ける結果である。一方で、図 1 に示すように、BDNF と BDNF 分泌調節因子 CAPS2 の発現も時間依存性に低下した。

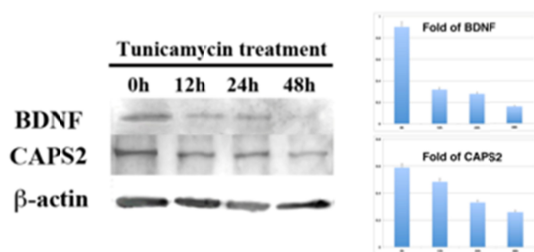


図1 ツニカマイシン処理後のBDNFとCAPS2の発現

この結果は、うつ病などの精神疾患において、脳内で分泌低下するBDNFと細胞内小胞輸送に関与しBDNF調節を行うCAPS2が、小胞体ストレス下の内耳感覚細胞内においても分泌低下する可能性を示唆する結果として興味深い。BDNFと高親和性結合する TrkB受容体の発現は、12hをピークに誘導されたが、その後は低下した。

(3) 以上の結果は、小胞体ストレス下の内耳感覚細胞においては、CAPS2の機能低下に伴う細胞内小胞輸送の低下がBDNF発現低下させ、TrkB受容体も発現低下する。その結果、BDNF/TrkBシグナルが変化をきたし、アポトーシスとオートファジーの誘導にバランス崩壊が生じていると推察される。図2に示すように、内耳マーカーであるAtoh1、Myosin7aとNestinの発現も時間依存性に低下した。

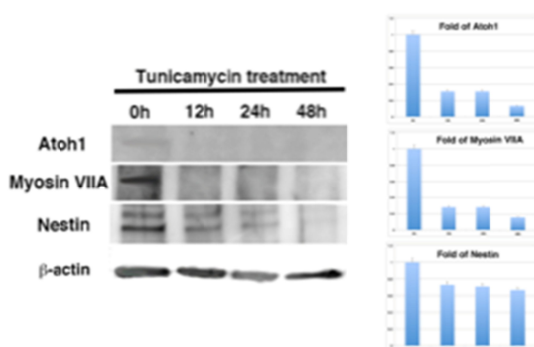


図2 ツニカマイシン処理後のAtoh1、Myosin7aとNestinの発現

これらは、小胞体ストレス下の内耳感覚細胞レベルでの聴覚機能低下を示唆する結果と考えている。小胞体ストレス下の内耳感覚細胞において、IP3R、CAPS2とBDNFの発現低下に伴うBDNF/TrkBシグナルが、オートファジーとアポトーシスのバランスを崩壊させることが示唆された。

引用文献

Higo T, Hamada K, Hisatsune C, Nukina N, Hashikawa T, Hattori M, Nakamura T,

Mikoshiba K. Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor. *Neuron*. 2010 9;68(5):865-78.

Fujinami Y, Mutai H, Mizutani K, Nakagawa S, Matsunaga T. A novel animal model of hearing loss caused by acute endoplasmic reticulum stress in the cochlea. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(3):363-72.

Decuyper JP, Welkenhuyzen K, Luyten T, Ponsaerts R, Dewaele M, Molgó J, Agostinis P, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB, Bultynck G. Ins(1,4,5)P3 receptor-mediated Ca²⁺ signaling and autophagy induction are interrelated. *Autophagy*. 2011;7(12):1472-89.

Kalinec GM, Webster P, Lim DJ, Kalinec F. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol Neurotol*. 2003, 8(4):177-89.

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)

〔学会発表〕(計3件)

Tsuchihashi Nana, Hayashi Ken, Goto Fumiyuki, Yasuyuki Nomura, Takeshi Masuda, Fujioka Masato, Kanzaki Sho, Ogawa Kaoru. H₂O₂ treatment accelerates autophagy and cellular senescence in auditory cell line. Inner Ear Biology Workshop, International Conference Center. Takaragaike, sakyo-ku, Kyoto, November 1-4, 2014.

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 in auditory cells. 15th Korea-Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Seoul, Korea, 3-5 April, 2014.

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回日本耳科学会総会・学術講演会、宮崎県・宮崎市、シーガイアコンベンションセンター 2013.11.24-26

6 . 研究組織

(1)研究代表者

増田 毅 (MASUDA, Takeshi)

日本大学 医学部・助教

研究者番号：60625218

(2)研究協力者

土橋 奈々 (TSUCHIHASHI , Nana)