

内耳感覚細胞における XBP1-FoxO1 相互作用による
小胞体ストレス誘導性オートファジーの制御

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系耳鼻咽喉科学専攻

岸野明洋

修了年 2018 年

指導教員 大島猛史

目次

第 I 章：研究の概要.....	1
第 II 章：緒言	
1. 感音難聴.....	2
2. 小胞体ストレスと小胞体ストレス応答.....	3
3. XBP1 mRNA スプライシング.....	4
4. オートファジー.....	6
5. FoxO1.....	7
6. 研究の目的.....	7
第 III 章：対象と方法	
1. 試薬および抗体.....	9
2. 細胞培養および培養条件.....	9
3. 細胞生存率測定.....	10
4. フローサイトメトリーと蛍光顕微鏡による細胞死の検出.....	10
5. ウェスタンブロット解析.....	11
6. 細胞質・核内タンパク質抽出.....	12
7. 共免疫沈降法.....	12
8. 透過型電子顕微鏡.....	13
9. Small interfering RNA トランスフェクション.....	13

10. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR).....	13
11. 統計解析.....	14
第IV章：結果	
1. ツニカマイシン処理による小胞体ストレスは後期アポトーシスおよびネクロシスの両方を誘導する.....	16
2. 小胞体ストレスはXBP1 mRNA スプライシングを誘導する.....	17
3. 小胞体ストレスはオートファジーを誘導する.....	18
4. XBP1 はオートファジーの誘導に関与する.....	19
5. IRE1 α による XBP1 mRNA スプライシングは小胞体ストレス誘導性オートファジーに必要である.....	20
6. FoxO1 は小胞体ストレス下でのオートファジー誘導に関与する.....	21
7. XBP1 は小胞体ストレス下での FoxO1 の発現を制御する.....	22
第V章：考察.....	23
第VI章：まとめ.....	28
謝辞.....	30
図説.....	31
引用文献.....	53
研究業績.....	63

第 I 章 研究の概要

本研究は、内耳感覚細胞の小胞体ストレスに対する防御反応として誘導される小胞体ストレス応答(Unfolded protein response: UPR)とオートファジーの関係を明らかにすることを目的として、マウス由来の内耳培養細胞である HEI-OC1 細胞を用いて小胞体ストレス応答因子 X-box-binding protein 1 unspliced, spliced (XBP1u, s)、Forkhead box O1 (FoxO1)とオートファジー間のクロストークによるシグナル伝達を検討した。

本研究では、小胞体ストレス誘導剤(ツニカマイシン)処理による小胞体ストレス下の内耳感覚細胞において、Inositol-requiring protein1 α (IRE1 α)を介する XBP1 mRNA スプライシングと FoxO1 の発現誘導が小胞体ストレス誘導性オートファジーの誘導に深く関与すること、XBP1u, s は FoxO1 の発現を負に制御していることを実験的に証明した(図 10)。すなわち、我々は小胞体ストレス下の内耳感覚細胞において、XBP1u, s - FoxO1 間の相互作用がオートファジー誘導に深く関与し、細胞死を制御していることを世界に先駆け報告した。我々の結果は、小胞体ストレスによるオートファジーの誘導が内耳感覚細胞機能に与える影響を基礎的に検討したことによって、内耳障害の根底にある病態解明と感音難聴に対する新規治療の開発に大きく貢献しうる。また、本研究の要旨は下記 Scientific Reports 誌に掲載された。

Kishino A, Hayashi K, Hidai C, Masuda T, Nomura Y, Oshima T.

XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells.

Scientific Reports. 2017;7: 4442. doi: 10.1038/s41598-017-02960-1.

第Ⅱ章 緒言

本研究の目的は、内耳培養細胞において小胞体ストレス下での XBP1 および FoxO1 の機能と UPR およびオートファジーのクロストークを検討することである。下記の知見に基づき、本研究を行った。

1. 感音難聴

感音難聴は、蝸牛に障害のある内耳性(迷路性)難聴と蝸牛神経から皮質聴覚野を含む区間の聴覚伝導路に障害のある後迷路性難聴に分けられるが、その原因の多くは突発性難聴、メニエール病、急性音響性外傷、ウイルス性難聴などの内耳障害であると考えられている。世界で最も頻度の高い身体障害の一つであり、QOL の低下は著しく患者の社会的生活に多大な影響を及ぼす。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。しかし、感音難聴の病態生理については広範な研究と大きな臨床的関心にもかかわらず、依然として不明であり、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。急性内耳障害は慢性内耳障害と比較すれば、発症早期にステロイド治療が施され効果を奏する場合はあるが、エビデンスは乏しくその有効性は確立されていない。また、感音難聴の発症や予後を予想する客観性のある分子マーカーも存在しない。感音難聴に対する有効な新規治療法の確立の為にも更なる病態生理の解明が求められる。これまでに感音難聴の内耳障害については、細胞死の観点から様々な基礎研究がなさ

れてきた。近年、小胞体ストレスが蝸牛有毛細胞とラセン神経節細胞におけるアポトーシスを誘導し、感音難聴の発症に深く関与することが報告された^{1,2}。

2. 小胞体ストレスと小胞体ストレス応答

細胞は、飢餓や虚血および酸化ストレスのような外因性ストレスだけでなく、小胞体ストレスのような細胞内ストレスにも絶えず曝露されている。小胞体はタンパク質の高次構造の形成および分泌に関与する非常に重要な細胞小器官である^{3,4}。細胞が新たに合成するタンパク質の多くは正しい高次構造をとっていない不良タンパク質である。真核生物において合成されたタンパク質は小胞体に挿入されて高次構造が形成されて機能的なタンパク質となる。しかし、細胞が様々なストレスに曝されるとタンパク質の高次構造の形成が障害される。小胞体ストレスは、高次構造の異常な不良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、細胞は小胞体ストレス応答(Unfolded protein response: UPR)として知られる適応反応を誘導する^{5,6}。小胞体の恒常性を維持するために、UPRは新規タンパク質合成の抑制、小胞体関連タンパク質分解(ER-associated protein degradation: ERAD)および小胞体シャペロン遺伝子の転写を活性化することなどによって小胞体ストレスを緩和する⁷。しかしながら、UPRによるストレス回避能を超える小胞体ストレスが負荷された場合には細胞死が誘導される(図 1)。

ツニカマイシンは、N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼの阻害剤であ

り、広く使用されている小胞体ストレス誘導因子の1つである⁸。ツニカマイシンは未成熟タンパク質のN-末端への糖鎖付加を阻害する⁹。N-末端への糖付加の阻害は、小胞体における高次構造の異常なタンパク質の蓄積をもたらして小胞体ストレスを誘導し、そして最終的に長期のストレスは細胞死を誘導する¹⁰。過去の報告では、ツニカマイシン処理が蝸牛の有毛細胞および神経節細胞における特異的小胞体ストレス関連アポトーシス促進因子である C/EBP homologous protein (CHOP)の発現を誘導し、有毛細胞と神経節細胞の変性を引き起こしたことが報告されている^{1,2}。また、有毛細胞および神経節細胞においてツニカマイシンによって誘導された細胞死は、アポトーシスの特徴を示した¹¹。

3. XBP1 mRNA スプライシング

哺乳動物細胞において Inositol-requiring protein1 α (IRE1 α)、PKR-like ER kinase (PERK) および activating transcription factor 6 (ATF6)の3種類の小胞体ストレス受容体が小胞体膜に同定されている¹²⁻¹⁴。これらの小胞体膜タンパク質は小胞体ストレスを感知し、不良タンパク質による負担を軽減するためにUPR伝達経路を活性化する。これらの3つの小胞体ストレス受容体のうち、IRE1 α シグナル伝達経路は酵母から哺乳類まで最も進化的に保存されている。IRE1 α は X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA スプライシングに関与する小胞体膜貫通型 RNase である^{15,16}。XBP1は小胞体ストレスへ適応するUPRにおける重要な制御因子の一つである。XBP1

は、スプライシングされた **spliced XBP1 mRNA (XBP1s mRNA)**から産生されるタンパク質 **XBP1s**、およびスプライシングを受けない **unspliced XBP1 mRNA (XBP1u mRNA)**から産生されるタンパク質 **XBP1u** の2つのアイソフォームを有する。**XBP1s** はUPRに関与する遺伝子の転写を制御する重要な転写因子であり、**XBP1u** は転写活性のない不活性型である¹⁷。**IRE1 α** は細胞質側にキナーゼドメインとRNaseドメインの両方を持ち、小胞体ストレスを感知するとキナーゼドメインが二量体化して自己リン酸化することによってRNaseドメインが活性化する¹⁸。定常状態では**XBP1u mRNA**は持続的に産生され、翻訳され合成されたタンパク質**XBP1u**はプロテアソームによる迅速な分解を受ける¹⁹。小胞体ストレス下では、リン酸化された**IRE1 α (p-IRE1 α)**による小胞体膜上の細胞質スプライシングによって**XBP1u mRNA**のオープンリーディングフレームから26塩基のイントロンが切除され、フレームシフトが起こり、**XBP1s mRNA**が生成される²⁰。**XBP1s mRNA**は機能的な転写因子であるタンパク質**XBP1s**に翻訳され、核内に移動してUPRおよびERADに関わる遺伝子の転写を誘導する^{15,21}。小胞体ストレスは神経変性疾患、精神疾患、老化の病態に関与し²²⁻²⁴、また感音難聴や加齢性難聴を引き起こすことが示されている^{1,2,11,25}。さらに、**XBP1**の異常はパーキンソン病およびアルツハイマー病を含む神経変性疾患だけでなく、代謝障害、炎症性疾患および癌の発症にも関与することが報告されている²⁶⁻⁴⁶。Oishiらは、マウスモデルを用いて、**XBP1**欠損がアミノグリコシドによる小胞体ストレス誘導性感音難聴の発症に寄与していることを明らかにし

た¹¹。小胞体ストレスは内耳感覚細胞におけるアポトーシスを誘導し、感音難聴を引き起こすが、臨床的に永続的でなく大きく変動する感音難聴をアポトーシスによる細胞死の観点からのみで説明することは困難である。そこで、アポトーシスや細胞機能不全に拮抗する細胞内現象としてオートファジーという概念に着目した。

IRE1 α シグナル伝達経路は、XBP1 mRNA スプライシングを介した UPR とオートファジーを誘導することによって蓄積された高次構造の異常なタンパク質を分解し、小胞体ストレスを緩和することが明らかになっている⁴⁷。

4. オートファジー

オートファジーは、真核細胞における恒常性および生物学的エネルギーの維持に非常に重要な役割を果たすリソソームを分解の場とする細胞内主要分解機構である。オートファジーは細胞質に出現した隔離膜が傷んだ細胞小器官や老廃物を取り囲み、徐々に伸長して二重膜構造をもつオートファゴソームという小胞が形成される過程と、オートファゴソームに分解酵素を含むリソソームが融合し、オートリソソームとなり内容物を加水分解する過程からなる(図 2)。内耳感覚細胞においてもオートファジーは確認されており、細胞生死または老化に関与する^{48,49}。オートファジーは異なる生理学的条件下で生存促進または細胞死の 2 つの役割を有することが報告されている。オートファジーは自食作用による細胞死を回避するためにストレスに応答して持続的に活性化されることは滅多にないが、オートファジーの過剰誘

導は細胞死をもたらす⁵⁰。これまでにオートファジーの機能障害は、神経変性疾患や加齢などのさまざまな障害を引き起こすことが報告されている⁵¹。また、オートファジーの障害が感音難聴の発症に関与することが報告されている⁵²。

5. FoxO1

Forkhead box O1 (FoxO1)は、細胞周期の停止、アポトーシス、老化などの重要な生物学的プロセスに関与している転写因子である^{53,54}。神経細胞およびヒト癌細胞株において細胞質活性または転写活性を介したオートファジーの誘導におけるFoxO1の関与が報告されている⁵⁵⁻⁵⁷。さらに、FoxO1とXBP1との潜在的な相互作用を実証するいくつかの研究がある。Zhaoらは、癌細胞においてXBP1uが20Sプロテアソームを介したFoxO1の分解によってオートファジーを抑制することを報告している⁵⁸。一方でZhouらは、膵臓β細胞においてXBP1sがプロテアソームを介した分解によってFoxO1を負に制御することを報告している⁵⁹。過去の報告では、FoxO1がオートファジーの制御において重要な機能を有することが実証されているが、内耳感覚細胞において、XBP1とFoxO1の制御の関連性は明らかになっておらず、またUPR伝達経路とオートファジーとの関係についても依然として不明である。

6. 研究の目的

小胞体ストレスは、細胞機能不全およびアポトーシスを誘導することが報告されている⁹。しかしながら、永続的でなく大きく変動する聴力障害を細胞レベルのアポトーシスの観点からのみで説明することは困難である。したがって、UPR とオートファジーの両方の観点から内耳保護効果を分析する必要がある。小胞体ストレス下での内耳感覚細胞では、UPR とオートファジーとの関連性は依然として不明である。我々は、内耳感覚細胞における小胞体ストレスの研究が感音難聴を含む内耳疾患の病態の理解に重要な貢献に寄与し、新規治療法の開発につながると考えている。そこで、XBP1、FoxO1 およびオートファジーの機能に焦点を当てて、内耳培養細胞である HEI-OC1 細胞に対するツニカマイシンを用いた小胞体ストレスの影響を解析した。

第Ⅲ章 対象と方法

1. 試薬および抗体

ツニカマイシンは Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA)より、クロロキン、バフィロマイシン A1 は MBL 社 (Nagoya, Japan)より入手した。一次抗体である抗 IRE1 α 抗体、抗 XBP1s 抗体、抗 FoxO1 抗体、抗 caspase-3 抗体、抗 HDAC1 抗体、抗 GAPDH 抗体、抗 β -actin 抗体は Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA)より、抗 XBP1u 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社 (Dallas, TX, USA)より、抗 LC3 抗体は MBL 社より、抗 p-IRE1 α 抗体は Abcam 社 (Cambridge, UK)より入手した。二次抗体である抗 mouse IgG 抗体は Cell Signaling Technology 社より、抗 rabbit IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社より入手した。XBP1、IRE1 α およびコントロールの Small interfering RNA (siRNA)は Santa Cruz Biotechnology 社より入手した。FoxO1 siRNA は Cell Signaling Technology 社より入手した。細胞質・核内タンパク質抽出キットは 101 Bio 社 (Palo Alto, CA, USA)より入手した。

2. 細胞培養および培養条件

内耳培養細胞として Kalinec らによって、温度感受性 SV 40 Large T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスの蝸牛の Corti 器より樹立された House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1)を用いた。HEI-OC1 には、Myosin7a、Calretinin や Atoh1 など内耳感覚細胞として機能する遺伝子の発現が確認されている⁶⁰。HEI-OC1 は

33°C、10%CO₂ の培養条件では脱分化の状態では細胞増殖するが、39°C、5%CO₂ の培養条件では分化し、培養 48 時間で細胞増殖は停止する特徴を示す。培養液は high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, USA)を用い、10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、1% penicillin-streptomycin (Gibco)、50 U/ml mouse IFN- γ (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)を添加した。培養条件は 33°C、10% CO₂ とした。

3. 細胞生存率測定

HEI-OC1 細胞(5×10^4 cells/ml)を 24 ウェルプレートに播種して 24 時間培養した後、ツニカマイシン(5, 50, 100 μ g/ml) を添加することによって小胞体ストレスを誘導して 12、24、48 時間培養した。細胞生存率の測定は 0.4%トリパンブルー(Gibco)を添加して血球計算盤を用いて計測を行った。青く染まった細胞を死細胞、染まらなかった細胞を生細胞とした。細胞生存率は生細胞/全細胞(%)として評価した。

4. フローサイトメトリーと蛍光顕微鏡による細胞死の検出

細胞死の検出には Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Abcam)を用いた。蛍光顕微鏡法では細胞浮遊液(5×10^4 cells/ml)を 96 ウェルプレート、フローサイトメトリーでは細胞浮遊液(6×10^5 cells/ml)を 24 ウェルプレートに播種し 24 時間培養した後、ツニカマイシン(50 μ g/ml)を添加して 12、24、48 時間培養した。培養液を除去した

後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した。次いで、5 μ l の Annexin V-FITC および 5 μ l のヨウ化プロピジウム(PI)を添加し、室温で 5 分間、暗所で培養した。イメージングのために、蛍光顕微鏡(BZ-X710, KEYENCE, Osaka, Japan)を用いて細胞を観察した。フローサイトメトリーでは、フローサイトメーター(Gallios Flow Cytometer, Beckman Coulter, CA, USA)により細胞を取得し、FlowJo ソフトウェア(FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA)を用いて解析した。PI 陰性および Annexin V 陰性である細胞は生細胞、PI 陰性および Annexin V 陽性の細胞は早期アポトーシス、PI および Annexin V の両方が陽性の細胞は後期アポトーシスおよびネクローシスとした。

5. ウェスタンブロット解析

処理細胞の抽出液(10 μ g)をドデシル硫酸ナトリウム(SDS) - ポリアクリルアミドゲル(4~12%、12%)上で 90~120 分間電気泳動し、次いで iBlot (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いてポリフッ化ビニリデン(PVDF)メンブレンに転写した。Tween20 含有トリス緩衝生理食塩水(TBS-T)中に 1 : 1000~1 : 3000 希釈の一次抗体の存在下で、メンブレンを 4°Cで一晩インキュベートした。メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄した後、TBS-T 中で 1 : 2000~1 : 3000 の希釈率で対応する二次抗体と共に 1 時間インキュベートした。次いで、Amersham ECL Prime (Sigma-Aldrich)を用いて化学発光させたメンブレン上のタンパク質を LAS-4000 mini (FUJIFILM, Tokyo,

Japan)を用いて検出した。

6. 細胞質・核内タンパク質抽出

24 ウェルプレートに 90~100%コンフルエントの状態まで細胞を培養し、PBS で 2 回洗浄した。細胞質抽出バッファーを 300 μ l 添加して、氷上で 5 分間インキュベートした。細胞溶解液を 15 秒間ボルテックスして、4°C14000~15000 rpm で 5 分間遠心した。上清を細胞質タンパク質として抽出した。次いで、核抽出バッファー150 μ l をペレットに添加して、15 秒間ボルテックス、氷上で 1 分間インキュベートを 4 回繰り返した。4°C14000~15000 rpm で 30 秒間遠心して、この上清を核内タンパク質として抽出した。

7. 共免疫沈降法

Dynabeads[®] Protein G Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて共免疫沈降法を行った。細胞を 50 μ g/ml のツニカマイシンを添加して 24 時間培養し、次いでプロテアーゼ阻害剤(Nacalai, Tokyo, Japan)を用いて RIPA 緩衝液(Wako, Tokyo, Japan)に溶解した。細胞溶解液を一次抗体と共に 4°Cでローテーターで回しながら一晩インキュベートした。Protein G 結合磁気ビーズの添加後、ローテーターで回しながら 90 分間インキュベートした。免疫沈降物を洗浄バッファーで 3 回洗浄し、SDS サンプルバッファーを加え 70°Cで 10 分間煮沸することによりビー

ズから抽出した。サンプルはウェスタンブロット解析に供した。

8. 透過型電子顕微鏡

細胞を 0.1M カコジル酸緩衝液(pH7.4)中の 2.5%グルタルアルデヒドで一晩固定し、0.1M カコジル酸緩衝液(pH7.4)中の 1%オスミウム四酸化物で2時間後固定した。勾配エタノールで脱水し、Quetol-812 に包埋した。超薄切片をウルトラマイクローム(ULTRACUT UCT, Leica, Wien, Austria)上でダイヤモンドナイフで切断した。薄片を酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡(JEM-1200EX, JEOL, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

9. Small interfering RNA トランスフェクション

XBP1、IRE1 α および FoxO1 遺伝子のノックダウンには、XBP1、IRE1 α (Santa Cruz Biotechnology)、FoxO1 (Cell Signaling Technology)およびコントロール(Santa Cruz Biotechnology)に対する small interfering RNA を用いた。24 ウェルプレートに細胞を60~80%コンフルエントの状態まで培養し、Lipofectamin[®] RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific)と Opti-MEM Medium (Thermo Fisher Scientific)を用いて siRNA を48時間トランスフェクションした。

10. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

Total RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)で抽出した。Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen)、dNTP Mix(Invitrogen)、RNase Inhibitor (Ambion, Austin, TX, USA)および SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いて逆転写反応し、cDNA を合成した。プライマーと KOD-Plus-Neo (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて PCR を施行した(94°C2分、98°C15秒、55°C10秒、68°C30秒、68°C3分を35サイクル)。得られた PCR 産物をマイクロチップ電気泳動システム(MCE-292 MultiNA, Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて電気泳動し、MultiNA Viewer ソフトウェアで定量した。PCR 産物を各マイクロチップ(88×50 μm)に導入し、キャピラリー電気泳動緩衝液を用いて電気泳動を行った。移動する核酸は、SYBR Gold による蛍光検出によって検出した。PCR 産物のサイズを検出するためのサイズ検量線は、ラダーの泳動時間および断片サイズから作成された。各ピークの DNA 濃度はサンプルピーク面積および上部マーカ(UM)ピーク面積から定量した。測定結果は、古典的な電気泳動ゲル様画像に変換することによって表現された^{61,62}。

XBP1 および GAPDH のプライマーは以下の通りである。

XBP1 5'-GAACCAGGAGTTAAGAACACG-3', 5'-AGGCAACAGTGTCAGAGTCC-3'

GAPDH 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3', 5'-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3'

11. 統計解析

全データを平均±標準偏差(S.D.)として表示した。統計解析は2群間の検定は

Student's *t*-test を行い、3 群間以上の検定は一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合 Tukey-Kramer test を用いて多重比較検定を行った。P<0.05 を統計学的有意差ありとした。

第IV章 結果

1. ツニカマイシン処理による小胞体ストレスは後期アポトーシスおよびネクローシスの両方を誘導する

HEI-OC1 細胞に対する小胞体ストレスの影響を検討するために、細胞を異なる濃度のツニカマイシン(0, 5, 50 および 100 $\mu\text{g/ml}$)で処理し、細胞生存率の解析を行った。図 3A および B に示すように、ツニカマイシン処理した細胞は用量依存的および時間依存的な細胞死を示した。ツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$)への曝露は、48 時間処理で細胞生存率を 25.6%まで低下した。

次に、光学顕微鏡下で細胞形態を観察した。ツニカマイシン処理後 24 時間で細胞膜と核の両方が膨大し、最終的に処理後 48 時間で細胞膜が破裂して細胞質の漏出を認めた。これらの細胞の形態変化はネクローシス様の形態を示した(図 3C)。

ツニカマイシン処理が HEI-OC1 細胞においてアポトーシスまたはネクローシスを誘導するかどうかを確認するために、細胞を Annexin V-FITC および PI 染色に供した後、フローサイトメトリー解析を行った(図 1D)。図 1E に示すように、ツニカマイシン曝露は後期アポトーシスおよびネクローシスの両方を誘導した。

次に、ツニカマイシン処理が HEI-OC1 細胞におけるアポトーシス伝達経路を活性化するかどうかを確認するために、ウェスタンブロット法によって cleaved caspase-3 の発現を解析した。図 1F に示すように、cleaved caspase-3 の発現は増加し、full length caspase-3 の発現は減少した。

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が、内耳感覚細胞に

において後期アポトーシスおよびネクローシスの両方を誘導することを示した。

2. 小胞体ストレスは XBP1 mRNA スプライシングを誘導する

内耳感覚細胞において小胞体ストレスが XBP1 mRNA スプライシングを誘導することを確認するために、ウェスタンブロット法により p-IRE1 α 、IRE1 α 、XBP1u および XBP1s の発現を解析した。p-IRE1 α および IRE1 α の発現レベルは、ツニカマイシン処理後 12 時間でピークに達し、処理後 24 時間で減少した(図 4A)。XBP1u の発現レベルは処理後 24 時間でピークに達し、処理後 48 時間で減少した(図 4B)。

XBP1s の発現レベルは、12 時間でピークに達し、処理後 24 時間から減少した(図 4C)。これらの結果は、XBP1 mRNA スプライシングが、内耳感覚細胞における IRE1 α の活性化と関連している可能性が高いことを示している。

次に、小胞体ストレス下で XBP1u, s が細胞の核内に移動するかどうかを評価するために、核内および細胞質蛋白質を抽出し、ウェスタンブロット法によって核内、細胞質の XBP1u, s の発現を解析した。図 4D に示すように、細胞質における XBP1u の発現レベルは、ツニカマイシン処理 24 時間後にピークに達したが、核内の XBP1u の発現は検出できなかった。一方、核内の XBP1s の発現レベルは、処理 12 時間後にピークに達したが、細胞質 XBP1s の発現は検出できなかった(図 4E)。これらの結果は内耳感覚細胞において XBP1u が主に細胞質内に局在し、XBP1s は核内に局在することを示している。

次に、小胞体ストレス下での内耳感覚細胞における XBP1 mRNA スプライシングを検出するために RT-PCR 法を用いて解析を行った。図 4F および G に示すように、ツニカマイシン未処理の細胞は、低い XBP1s mRNA の発現レベルと高い XBP1u mRNA の発現レベルを示した。一方でツニカマイシン処理細胞の場合では、XBP1s mRNA の発現レベルは有意に増加し、処理 12 時間後から高い発現レベルが維持された。一方、XBP1u mRNA の発現レベルは、ツニカマイシン処理 12 時間後から低いままであった。これらの結果は、小胞体ストレスが内耳感覚細胞において XBP1 mRNA スプライシングを誘導することを示している。

3. 小胞体ストレスはオートファジーを誘導する

内耳感覚細胞における小胞体ストレスとオートファジーとの関連性を検討するために、オートファジーの指標となる microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II) の発現をウェスタンブロット法により解析を行った。細胞質に存在する前駆体である LC3-I はオートファジーの誘導にともなって LC3-II に変換される。LC3-II はオートファゴソームの膜に特異的に局在し、オートファゴソームの数に比例するため、その発現はオートファジーの誘導を反映する⁶³。LC3-II の発現レベルは、ツニカマイシン処理 24 時間後でピークに達し、処理後 48 時間で減少した(図 5A)。重要なことに、クロロキンまたはバフィロマイシン A1(リソソームとオートファゴソームとの融合の阻害剤)の存在下でのツニカマイシン処理細胞は、LC3-II 発現レベル

の更なる増加を示した(図 5B)。

次に、小胞体ストレス下での内耳感覚細胞の超微細構造変化を透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察した。ツニカマイシンで 24 時間処理した細胞は、細胞質内にオートファジーの特徴であるオートファゴソームの形成および小胞体内腔の軽度の膨大が明らかになった。この時点で、オートファゴソームは細胞小器官だけでなく、凝集体のような内容物も含んでいた。ツニカマイシンで処理 48 時間後の細胞では、顕著に膨大した細胞膜と縮小した核を認めた。ツニカマイシン処理 48 時間後の細胞では、小胞体内腔の面積の拡大は処理 24 時間後の細胞よりも有意な増加を示した(図 5C)。オートファゴソームの数は、ツニカマイシン処理 24 時間でピークに達し、処理後 48 時間で減少した(図 5D)。また、オートファゴソームの数はコントロール細胞とツニカマイシン処理細胞との間に有意差が認められた。小胞体の内腔面積の大きさは、ツニカマイシン処理細胞において増加を示した(図 5E)。これらの結果は、内耳感覚細胞においてツニカマイシン処理による小胞体ストレスがオートファジーを誘導することを示している。

4. XBP1 はオートファジーの誘導に関与する

XBP1 を siRNA によりノックダウン(KD)し、内耳感覚細胞における UPR とオートファジー誘導との関連性を調べた。ウェスタンブロット法による解析では、IRE1 α および p-IRE1 α の発現は、ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞において有意に増

加した(図 6A, B および C)。LC3-II の発現は、ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞において有意に抑制された(図 6D)。また、ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞(50 μ g/ml、48 時間)における細胞生存率はコントロール細胞と比較して有意に低下を示した(図 6E)。

TEM によるツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞(50 μ g/ml、24 時間)の形態観察では、細胞質内にオートファゴソームの存在は確認されなかったが、凝集体の存在が明らかとなった。図 6F に示すように、ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞における小胞体内腔の面積は増大したが、ツニカマイシン処理したコントロール細胞(50 μ g/ml、48 時間)よりも小さかった。その上、小胞体の内部には脂質様の物質がほとんど観察されなかった。ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞におけるオートファゴソームの数は、ツニカマイシン処理したコントロール細胞よりも有意に少なかった(図 6G)。また、ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞とコントロール細胞との間に小胞体内腔の面積の大きさに有意差があった(図 4H)。これらの結果は、内耳感覚細胞において XBP1 が小胞体ストレス下でのオートファジーの誘導に関与することを示している。

5. IRE1 α による XBP1 mRNA スプライシングは小胞体ストレス誘導性オートファジーに必要である

IRE1 α が小胞体ストレス下で XBP1 mRNA スプライシングに直接影響を与えるか

どうかを確認するために、siRNA 処理で IRE1 α をノックダウンし、RT-PCR を用いて XBP1 mRNA の発現を解析した。ツニカマイシン処理 24 時間後のコントロール細胞と比較して IRE1 α KD 細胞では、XBP1u mRNA の発現レベルは有意に増加し、XBP1s mRNA の発現レベルは有意に低下した(図 7A)。これらの結果は、IRE1 α が内耳感覚細胞における XBP1 mRNA スプライシングに直接的な影響を与えることを示唆している。

次に、ツニカマイシン処理 IRE1 α KD 細胞における LC3-II の発現をウェスタンブロット法で解析し、XBP1 mRNA スプライシングが小胞体ストレス下で内耳感覚細胞においてオートファジーを誘導するかどうかを検討した。LC3-II の誘導は、ツニカマイシン処理 IRE1 α KD 細胞において有意に抑制された(図 7B)。また、ツニカマイシン処理 IRE1 α KD 細胞(50 μ g/ml、48 時間)の細胞生存率はコントロール細胞と比較して有意に低下した(図 7C)。これらの結果は、XBP1 mRNA スプライシングが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に必要であり、オートファジーが小胞体ストレスによる細胞死に拮抗する細胞保護機構として機能することを示している。

6. FoxO1 は小胞体ストレス下でのオートファジー誘導に関与する

FoxO1 が小胞体ストレス下での内耳感覚細胞におけるオートファジー誘導の制御因子として機能するかどうかを検討するために、ウェスタンブロット法によってツ

ツニカマイシン処理した細胞の FoxO1 の発現、および FoxO1 KD 細胞における LC3-II の発現を解析した。FoxO1 の発現は減少を示した(図 8A)。核内および細胞質における両方の FoxO1 の発現は減少を示した(図 8B)。LC3-II の誘導はコントロール細胞と比較して FoxO1 KD 細胞において有意に抑制された(図 8C および D)。ツニカマイシン処理した FoxO1 KD 細胞(50 µg/ml、48 時間)の細胞生存率はコントロール細胞と比較して有意に低下を示した(図 8E)。これらの結果は、FoxO1 が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に関与していることを示している。

7. XBP1 は小胞体ストレス下での FoxO1 の発現を制御する

内耳感覚細胞における XBP1 と FoxO1 との相互作用を確認するために、ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞およびツニカマイシン処理した FoxO1 KD 細胞における XBP1_{u,s} と FoxO1 の発現をウェスタンブロット法で解析した。興味深いことに、コントロール細胞では、ツニカマイシンの処理時間が長くなったときに FoxO1 発現レベルが低下したが、XBP1 KD 細胞では、ツニカマイシンの処理時間にかかわらず FoxO1 発現レベルは低下を示さなかった(図 9A)。一方、XBP1_{u,s} の発現は、ツニカマイシン処理したコントロール細胞と FoxO1 KD 細胞との間に有意差は観察されなかった(図 9B および C)。

次に、XBP1 と FoxO1 との間の直接的な相互作用を検出するために共免疫沈降法による解析を行った。共免疫沈降法では、XBP1_{u,s} と FoxO1 との間の直接的な相互

作用が明らかになった(図 9D)。また、興味深いことに XBP1u と XBP1s との間の直接的な相互作用も明らかになった。これらの結果は、FoxO1 が小胞体ストレス下での内耳感覚細胞における XBP1u および XBP1s の誘導に影響を与えなかったのに対して、XBP1 が FoxO1 の発現を制御することを示している。

第V章 考察

本研究では、XBP1 mRNA スプライシングが、小胞体ストレス下で FoxO1 の転写制御を介して内耳感覚細胞におけるオートファジーの誘導に関与することを明らかにした。内耳感覚細胞における siRNA による XBP1、IRE1 α または FoxO1 のノックダウンは、LC3-II の発現を有意に抑制した(図 6D, 7B および 8D)。また、内耳感覚細胞における XBP1 のノックダウンは、FoxO1 レベルを制御した(図 9A および D)。これらの結果は、XBP1 と FoxO1 の相互作用が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を制御することを示している。

まず我々は、XBP1 mRNA のレベルと比較してタンパク質 XBP1 の発現が異なる動態を示すことを確認した(図 4B, C, F および G)。過去の研究では、HeLa 細胞において、小胞体ストレスの後期にタンパク質 XBP1u がプロテアソーム分解を介して負のフィードバック制御因子として XBP1s と相互作用することが報告されている⁶⁴。我々の結果もまた、XBP1 mRNA の発現レベルとタンパク質 XBP1 の発現レベルが異なる動態を示すこと、XBP1u の発現後に XBP1s の発現が低下すること、タンパク

質 XBP1u と XBP1s との間に直接的な結合を認めたことから細胞質中のタンパク質 XBP1u が小胞体ストレス下で内耳感覚細胞の核内の XBP1s と相互作用し、負のフィードバック制御因子として機能することを示唆している。また我々は以下のことを推測した。小胞体ストレス時に、IRE1 α はアップレギュレートし、リン酸化によって活性化され(図 4A)、活性化された IRE1 α は、XBP1u mRNA を XBP1s mRNA にスプライシングし、そこからタンパク質 XBP1s が翻訳され、次に小胞体ストレスの初期(ツニカマイシン処理後 12 時間)に核内に移行した(図 4E, F および G)。タンパク質 XBP1s は UPR エlement に結合し、UPR および ERAD に必要な遺伝子の転写を活性化する。小胞体ストレスの後期(ツニカマイシン処理後 24 時間)に、XBP1 mRNA スプライシングは継続するが、タンパク質 XBP1u が増加し、タンパク質 XBP1s を負に制御して UPR を落ち着かせる (図 4B, C および 9D)。まとめると、我々の結果は、IRE1 α を介した XBP1 mRNA スプライシング、およびタンパク質 XBP1s が内耳感覚細胞における XBP1u の負の制御を受けながら小胞体ストレスを軽減する転写因子として主要な役割を果たすことを示した。

オートファジーは、栄養の枯渇など様々なストレスに対応する細胞の恒常性の維持のための主要なタンパク質分解機構の 1 つである⁶⁵。これまでの多くの報告で、小胞体ストレスとオートファジーの誘導との関連性が既に示されている⁶⁶⁻⁶⁸。最近の研究では、XBP1 mRNA スプライシングが血管内皮細胞のオートファジーの制御に関与していることが報告されている²¹。本研究では、オートファゴソーム形成の

過程に必要な LC3-II の発現レベルは、ツニカマイシン処理 24 時間後をピークに増加した(図 5A および B)⁶⁹⁻⁷¹。さらに、細胞質内で観察されたオートファゴソームの数も、LC3-II の発現レベルと同様にツニカマイシン処理 24 時間後をピークに増加した (図 5C および D)。これらの結果は、内耳感覚細胞においてツニカマイシンの処理 24 時間後にオートファジーが誘導されたことを示唆している。図 5E に示すように小胞体内腔面積の大きさは、ツニカマイシン処理細胞において増加し、脂質様の小胞体含有物質の膨大が処理後 24 時間に確認された。

マクロファージや癌細胞においてもツニカマイシン処理を含む小胞体ストレスが UPR を誘導した結果、小胞体内腔の膨大を引き起こすと報告されている^{72,73}。しかし、UPR を介した脂質生合成の活性化による小胞体内腔の膨大において、小胞体の表面積および内腔の拡張は小胞体ストレスを緩和するが、持続的な小胞体の膨大は細胞死をもたらす⁷⁴。オートファゴソームの存在および軽度の小胞体内腔の膨大が同時に観察されることは、UPR とオートファジーとの間の強い相関関係を意味する。処理後 48 時間でオートファゴソームの数は減少し、一方、小胞体内腔の膨大はるかに大きかった(図 5D および E)。興味深いことに、XBP1s および LC3-II の発現は、処理後 48 時間で減少した(図 4C および 5A)。換言すれば、オートファジーは処理後 48 時間で機能低下した。これは、小胞体ストレスがオートファジーを凌駕して細胞死を引き起こしたことを示唆し、内耳感覚細胞における細胞保護機構の破綻を意味する。ツニカマイシン処理 48 時間後の著明な細胞生存率の低下もまた細胞保

護機構の破綻を示唆する結果である(図 3A および B)。

次に、内耳感覚細胞における UPR とオートファジー誘導との関連性を検討するために、siRNA を用いて XBP1 または IRE1 α をノックダウンした。予想通り、ツニカマイシン処理した XBP1 または IRE1 α KD 細胞では LC3-II の発現が有意に抑制された(図 6D および 7B)。また図 6E および 7C 示すように、ツニカマイシン処理した XBP1 または IRE1 α KD 細胞の細胞生存率も有意な低下を示した。さらに TEM による形態観察では、ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞の細胞質ではオートファゴソームの数が有意に減少し、多数の凝集体が存在することを確認した(図 6F および G)。これらの結果は、XBP1 のノックダウンが内耳感覚細胞におけるオートファジーの障害を引き起こしたことを示唆している。これらの結果は、XBP1 mRNA スプライシングが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を誘導し、小胞体ストレス誘導性オートファジーはツニカマイシンによる細胞死から細胞を保護する細胞保護機構として機能することを逆説的に実証している。

前述のように、小胞体ストレスは内耳感覚細胞において小胞体内腔の膨大を引き起こす。過去の研究では、XBP1s が線維芽細胞における小胞体タンパク質の遺伝子発現および脂質生合成の増加によって小胞体内腔の拡張を誘導することが報告されている^{75,76}。本研究において、小胞体内腔の大きさは、コントロール細胞と比較して、XBP1 KD 細胞において有意に減少した(図 6H)。我々の結果は、XBP1 が内耳感覚細胞の小胞体ストレス下で小胞体内腔の拡張を誘導することを示唆している。

XBP1 の機能は、内耳感覚細胞において UPR およびオートファジーを誘導することに加えて、小胞体ストレスを緩和するために小胞体内腔の容量を増大させることによっても細胞生存に寄与すると考えられる。

転写因子 FoxO1 は、いくつかの細胞株で細胞質または転写活性を介してオートファジーの誘導に関与することが報告されている⁵⁵⁻⁵⁷。本研究では、ツニカマイシン処理した FoxO1 KD 細胞において LC3-II の発現が有意に抑制されたため、FoxO1 がオートファジーの誘導に関与していることが明らかになった(図 8D)。最近の報告では、FoxO1 と XBP1 との相互作用が報告されている。Zhao ら⁵⁸によって、XBP1u が FoxO1 と直接相互作用し、細胞質における 20S プロテアソームによる FoxO1 の分解を媒介することが報告された。一方、Zhou ら⁵⁹は、膵臓β細胞におけるプロテアソーム媒介分解によって XBP1s が FoxO1 を負に制御することを報告している。これらの研究に基づいて、XBP1 と FoxO1 との相互作用が内耳感覚細胞に存在するという仮説を立てた。XBP1 と FoxO1 の関係を確認するために、ツニカマイシン処理した XBP1 KD 細胞における FoxO1 の発現およびツニカマイシン処理した FoxO1 KD 細胞における XBP1u, s の発現を解析した。図 9A に示すように、コントロール細胞ではツニカマイシン処理した場合、FoxO1 の発現は有意に低下するが、ツニカマイシン処理 XBP1 KD 細胞は、ツニカマイシンの処理時間にかかわらず FoxO1 の発現は低下を示さなかった。この結果は、ツニカマイシンによる小胞体ストレスは、XBP1 機能が低下した場合に FoxO1 の発現を抑制できないことを示している。すな

わち、XBP1はFoxO1の発現を制御していることを逆説的に示唆する結果である。一方で非常に興味深いことに、ツニカマイシン処理FoxO1 KD細胞ではコントロール細胞と比較してXBP1_{u,s}レベルに有意差は無かった(図9BおよびC)。この結果は、FoxO1は小胞体ストレス下での内耳感覚細胞におけるXBP1_{u,s}の誘導には影響しないことを示唆している。次にXBP1_{u,s}とFoxO1との間の直接的な結合の有無を観察するために共免疫沈降法を行い、XBP1_{u,s}とFoxO1との間のタンパク質レベルでの直接的な結合を確認した(図9D)。これらの結果は、XBP1_{u,s}はFoxO1に直接結合し、FoxO1の発現を制御していることを示唆する結果である。

以上の結果より、我々は小胞体ストレス下の内耳感覚細胞においてXBP1はFoxO1の相互作用を介してオートファジーを制御することを実験的に証明することができた(図10)。

第VI章 まとめ

小胞体ストレス下の内耳感覚細胞においてXBP1はFoxO1の相互作用を介してオートファジーを制御することを示した。我々の知りうる限り、本研究は内耳感覚細胞においてXBP1とFoxO1の相互作用によって制御されるオートファジーと小胞体ストレスの関連性を示した初めての研究である。我々の結果は、小胞体ストレスによるオートファジーの誘導が内耳感覚細胞機能に与える影響を基礎的に検討したことによって、聴力障害の根底にある病態解明と感音難聴に対する新規治療の開発に

大きく貢献しうる。しかしながら、聴力障害の発症機序の完全になる解明には、さらなる研究が必要であることを念頭に置き、今後も内耳研究に邁進したい。

本研究の要旨は「**Scientific Reports**」誌に掲載された。

謝辞

本研究においてご指導頂きました日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野研究医員 林 賢先生に心から感謝致します。そして、研究全般にご支援頂きました同、大島猛史教授、野村泰之准教授に心から感謝致します。また、多くのご援助を頂きました日本大学医学部生理学分野 日台智明准教授、日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門 地家豊治氏、日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野研究助手 前田美代子女史に深謝致します。

図1

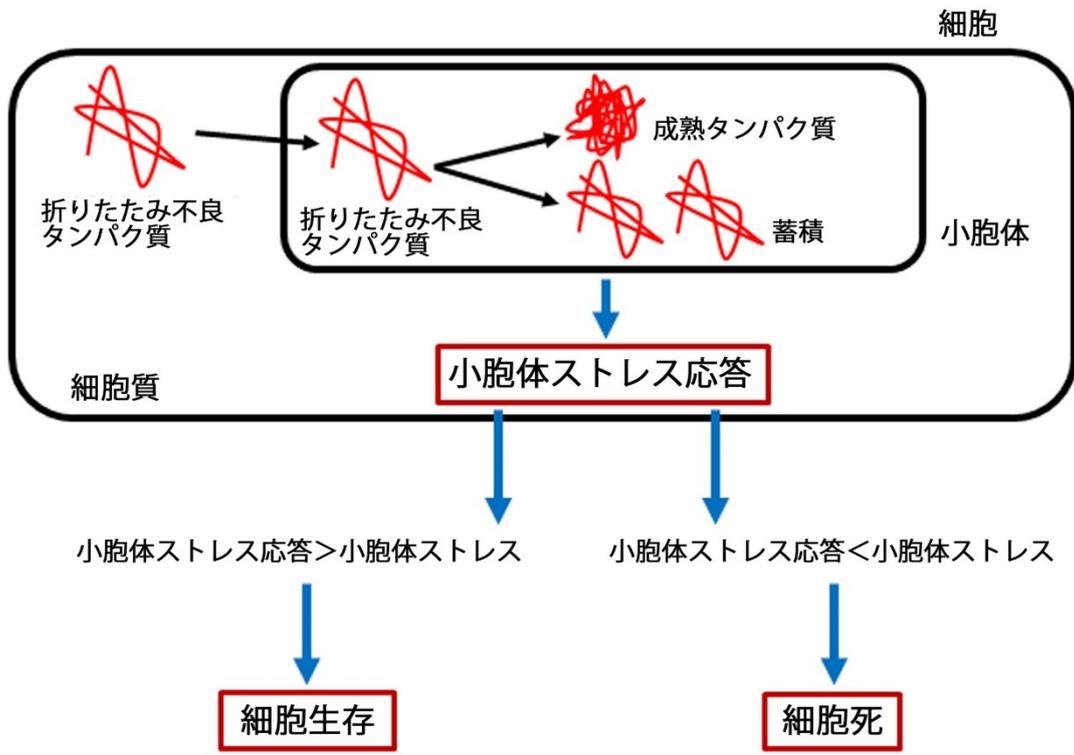


図 1. 小胞体ストレスと小胞体ストレス応答

細胞内で新たに合成された折りたたみ不良タンパク質は小胞体に挿入され、その高次構造が形成されて成熟したタンパク質となる。細胞が様々なストレスに曝露されるとタンパク質の高次構造の形成が障害され、折りたたみ不良タンパク質が小胞体内に蓄積して小胞体ストレスとなる。細胞は小胞体ストレスを緩和するための適応反応として小胞体ストレス応答(Unfolded protein response: UPR)を誘導する。しかし、UPR によるストレス回避能を超える小胞体ストレスが負荷された場合あるいは UPR 機能そのものが機能不全を起こした場合には細胞死が誘導される。

図2

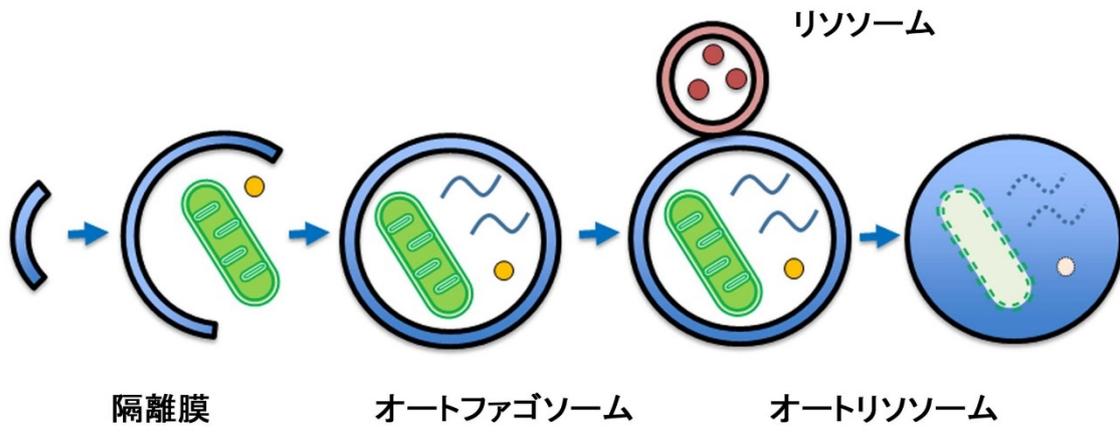


図 2. オートファジー

オートファジーは細胞の恒常性維持のために非常に重要な役割を果たす細胞内分解機構である。オートファジーは細胞質に出現した隔離膜が細胞質成分を取り囲み、二重膜構造をもつオートファゴソームという小胞を形成する。オートファゴソームに分解酵素を含むリソソームが融合し、オートリソソームとなり内容物を加水分解する。

3

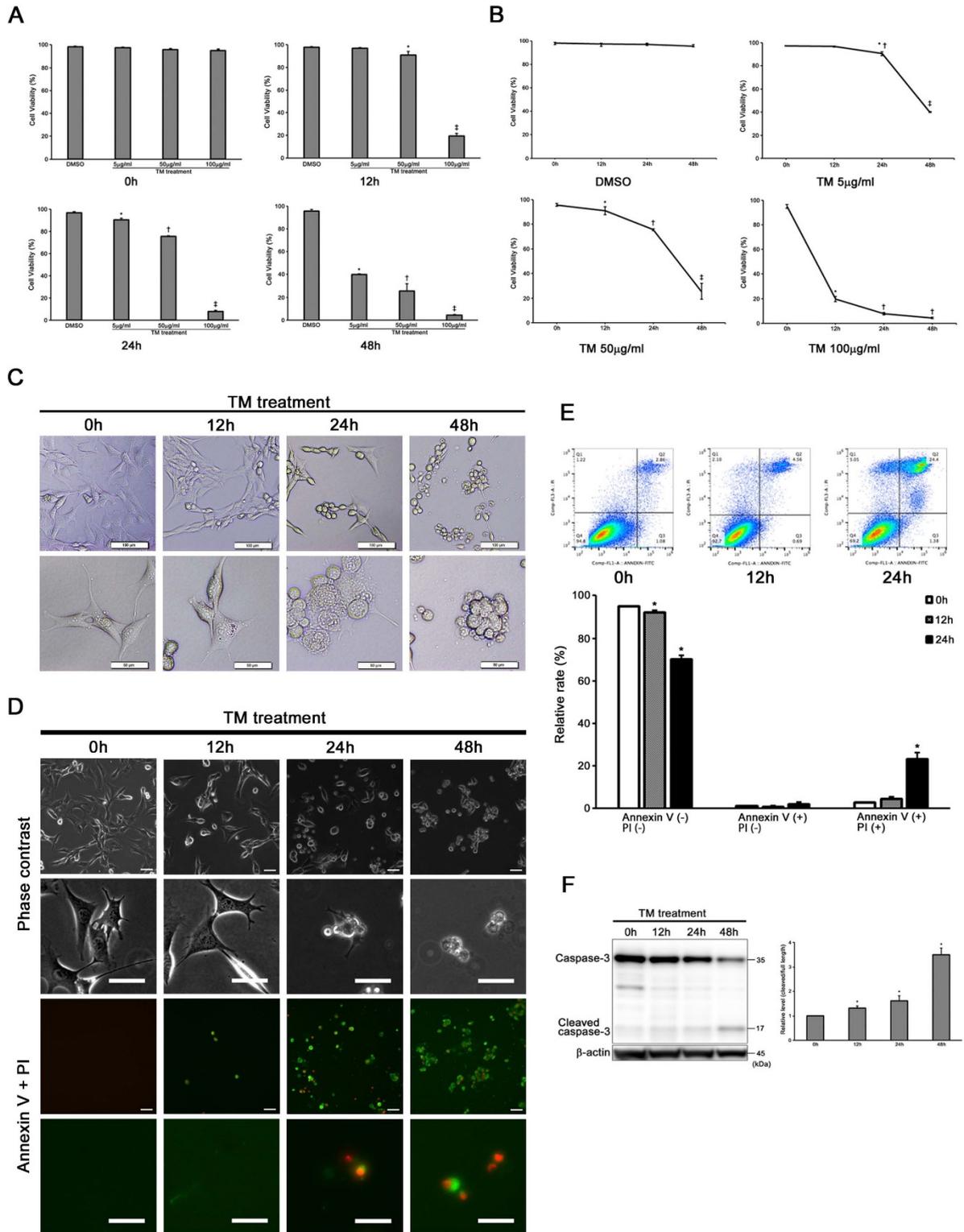
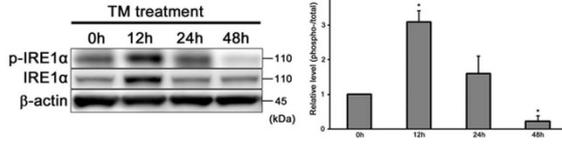


図 3. ツニカマイシン処理による小胞体ストレスは後期アポトーシスおよびネクローシスの両方を誘導する. (A) ツニカマイシン処理した HEI-OC1 細胞の細胞生存率は用量依存的な低下を示した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対 DMSO、† $p < 0.05$ 対 5 $\mu\text{g/ml}$ 、‡ $p < 0.05$ 対 50 $\mu\text{g/ml}$ 、Tukey-Kramer test)。細胞は異なる濃度のツニカマイシン(5, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)で 12、24、48 時間培養した。(B) ツニカマイシン処理した HEI-OC1 細胞の細胞生存率は時間依存的な低下を示した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対 0 時間、† $p < 0.05$ 対 12 時間、‡ $p < 0.05$ 対 24 時間、Tukey-Kramer test)。(C) 細胞をツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$)処理して 12、24、48 時間培養した後、光学顕微鏡下で細胞形態を観察した。処理後 0、12 時間後の細胞では、核構造は正常で細胞突起は長く樹状であった。処理後 24 時間後の細胞では、細胞膜は膨大し、核の拡大を認めた。処理後 48 時間後では、細胞膜は破裂して、細胞質の漏出を認めた。スケールバー ; 100 μm (上)および 50 μm (下)。(D) ツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$)処理し、12、24、48 時間培養した後、Annexin V (緑)および PI (赤)染色に供して蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー ; 50 μm 。(E) フローサイトメトリー解析では、後期アポトーシスおよびネクローシス(Annexin V +、PI +)の割合の増加を示した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対 0 時間、Tukey-Kramer test)。(F) ウェスタンブロット法による解析では、cleaved caspase-3 の発現は増加し、full length caspase-3 の発現は減少した。β-actin はローディングコントロールとして示す。Full

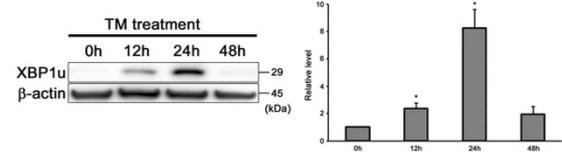
length および cleaved caspase-3 の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 ± S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対 0 時間、Tukey-Kramer test)。

4

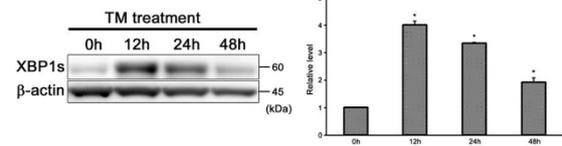
A



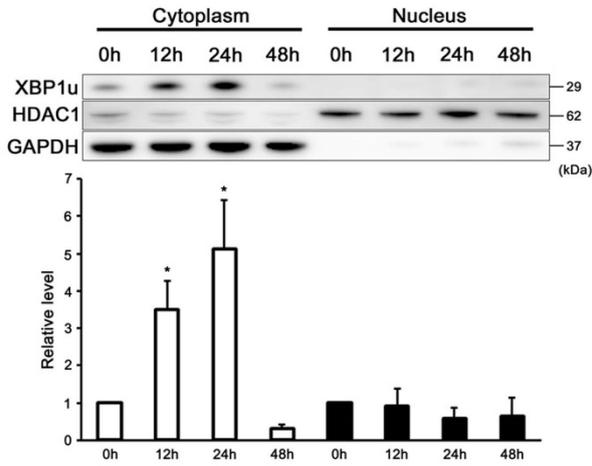
B



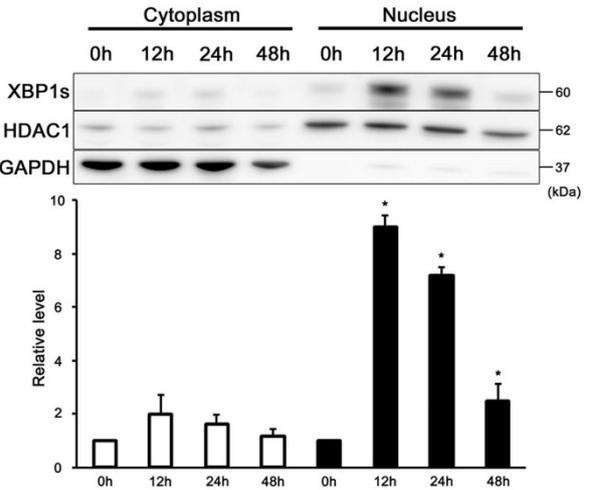
C



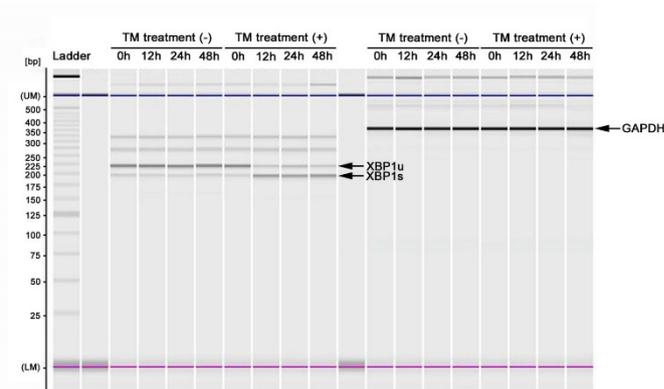
D



E



F



G

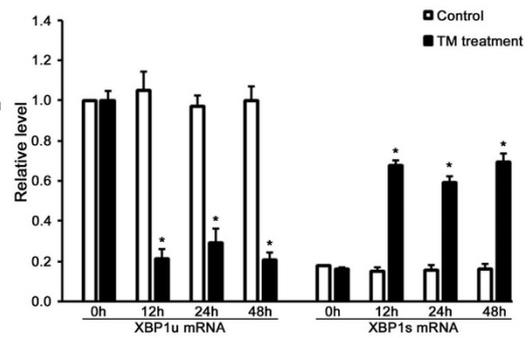


図 4. 小胞体ストレスは XBP1 mRNA スプライシングを誘導する. (A, B および C)

ウェスタンブロット法を用いて、(A) p-IRE1 α 、IRE1 α 、(B) XBP1u、(C) XBP1s の発現を解析した。(A) p-IRE1 α および IRE1 α の発現レベルは、ツニカマイシン(50 μ g/ml) 処理後 12 時間でピークに達し、処理後 24 時間で減少した。(B) XBP1u の発現レベルは処理後 24 時間でピークに達し、処理後 48 時間で減少した。(C) XBP1s の発現レベルは、12 時間でピークに達し、処理後 24 時間から減少した。 β -actin はローディングコントロールとして示す。p-IRE1 α 、IRE1 α 、XBP1u および XBP1s の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対 0 時間、Tukey-Kramer test)。(D および E) ウェスタンブロット法によってツニカマイシン(50 μ g/ml)処理した細胞の細胞質および核内の XBP1u、XBP1s の発現を解析した。GAPDH は細胞質タンパク質、HDAC1 は核内タンパク質ローディングコントロールとして示す。XBP1u の発現は細胞質でのみ検出され、XBP1s の発現は核内でのみ検出された。XBP1u および XBP1s の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対 0 時間、Tukey-Kramer test)。(F および G) RT-PCR 法を用いて、未処理細胞またはツニカマイシン(50 μ g/ml)処理細胞の XBP1u mRNA および XBP1s mRNA の発現の解析を行った。GAPDH はローディングコントロールとして示す。XBP1u mRNA および XBP1s mRNA の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コントロール群、Student's *t*-test)。

5

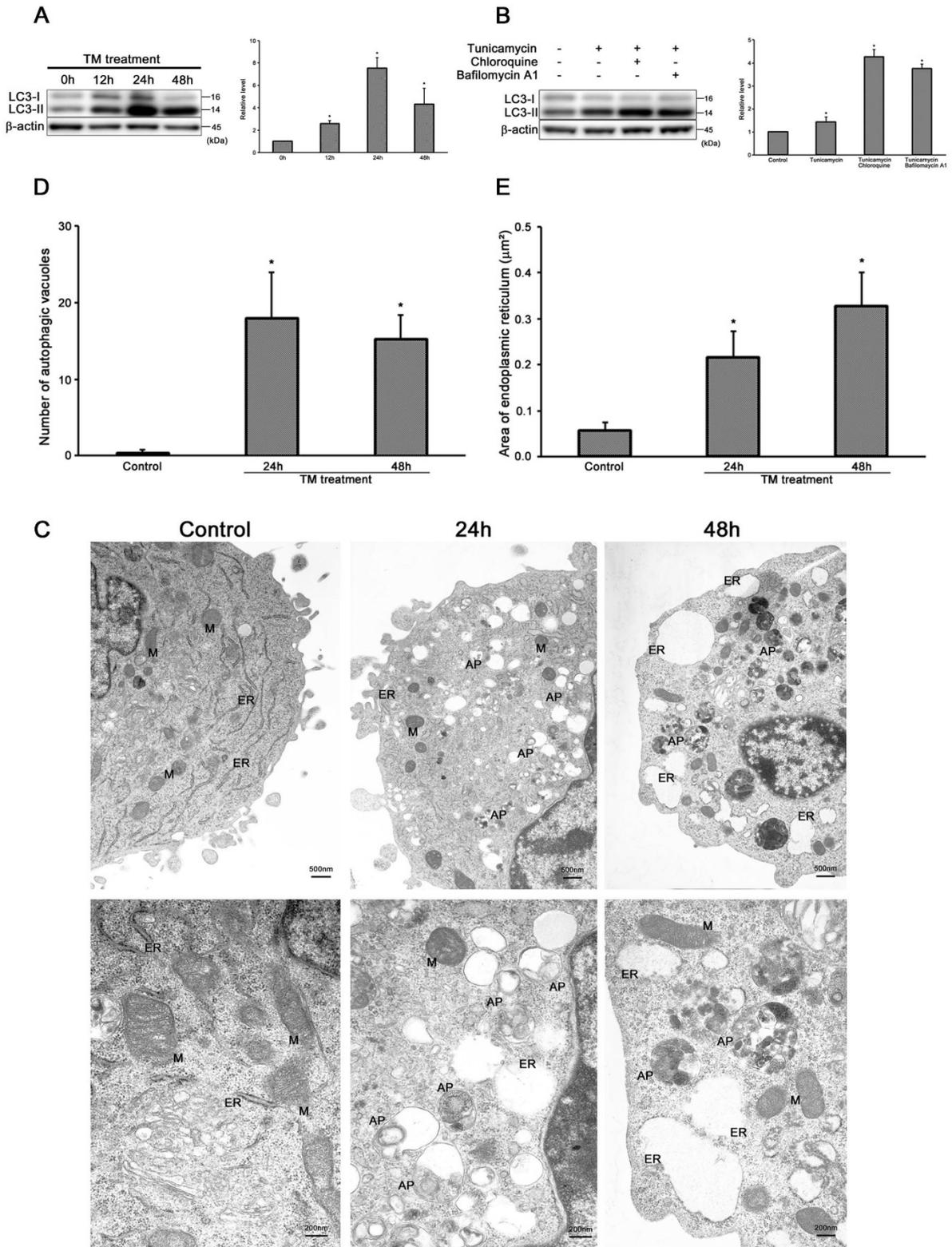


図5 小胞体ストレスはオートファジーを誘導する. (A) ウェスタンブロット法を用いて LC3-II の発現を解析した。β-actin はローディングコントロールとして示す。LC3-II の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* p <0.05 対 0 時間、Tukey-Kramer test)。 (B) 細胞をクロロキン(50 μM)またはバフィロマイシン A1(100 nM)の存在下でツニカマイシン(50 μg/ml、24 時間)処理し、ウェスタンブロット法を用いて解析した。ツニカマイシン処理細胞における LC3-II の発現は、リソソーム阻害剤によって有意に増加した。β-actin はローディングコントロールとして示す。LC3-II の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* p <0.05 対コントロール群、Tukey-Kramer test)。 (C) ツニカマイシン(50 μg/ml、24 および 48 時間)処理した HEI-OC1 細胞の透過型電子顕微鏡像を示す。コントロール細胞では、核および細胞小器官の構造は正常である(左、×10,000)。ツニカマイシン(50 μg/ml、24 時間)処理細胞では、オートファゴソームの形成および軽度の小胞体内腔の拡張が観察された(中央、×10,000)。ツニカマイシン(50 μg/ml、48 時間)処理細胞では、オートファゴソームの形成および小胞体内腔の高度な拡張が観察された(右、×10,000)。M ; ミトコンドリア、ER ; 小胞体、AP ; オートファゴソーム。 (D) 1 細胞あたりのオートファゴソームの数を測定した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* p <0.05 対コントロール群、Tukey-Kramer test)。 (E) 1 細胞あたりの小胞体内腔の面積を測定した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* p <0.05 対コントロール群、Tukey-Kramer test)。

6

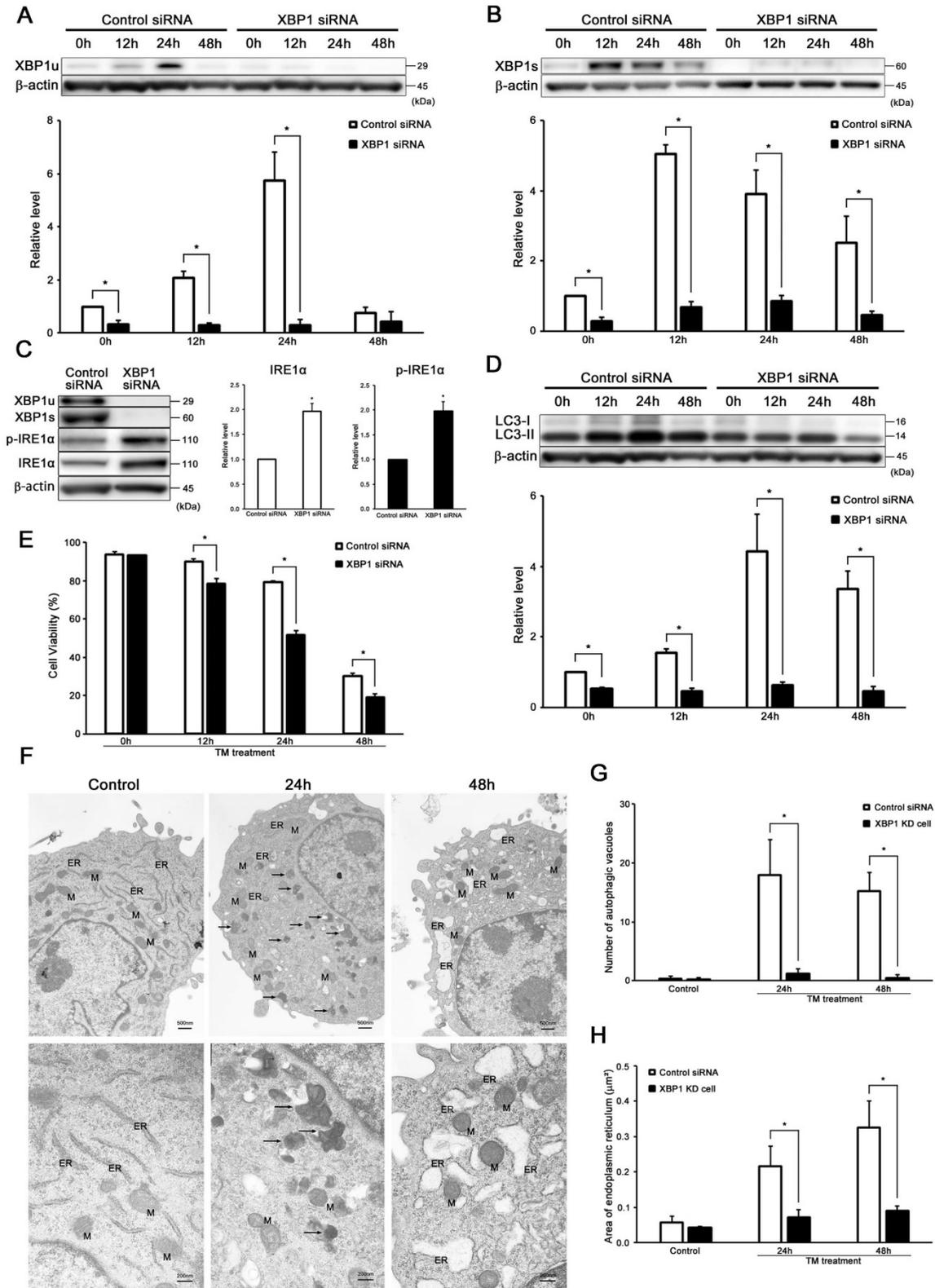


図 6. XBP1 はオートファジーの誘導に関与する. (A, B, C および D) ウェスタンブロット法によってツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$)処理した XBP1 KD 細胞における(A) XBP1u、(B) XBP1s、(C) p-IRE1 α 、IRE1 α 、(D) LC3-II の発現を解析した。XBP1 KD 細胞における LC3-II の発現は有意に抑制された。 β -actin はローディングコントロールとして示す。XBP1u、XBP1s、p-IRE1 α 、IRE1 α および LC3-II の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コントロール群、Student's *t*-test)。 (E) XBP1 およびコントロール siRNA を 48 時間トランスフェクションした後、細胞をツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間)処理して細胞生存率を測定した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コントロール群、Student's *t*-test)。 (F) ツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$ 、24 および 48 時間)処理した XBP1 KD 細胞の透過型電子顕微鏡像を示す。コントロール細胞では、核および細胞小器官の構造は正常である(左、 $\times 30,000$)。ツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$ 、24 時間)処理 XBP1 KD 細胞では、細胞質に凝集体を認めたが、オートファゴソームは観察されなかった(中央、 $\times 30,000$)。ツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間)処理 XBP1 KD 細胞における小胞体内腔の拡張はコントロール細胞よりも小さかった(右、 $\times 30,000$)。M ; ミトコンドリア、ER ; 小胞体、矢印 ; 凝集体。 (G) 1 細胞あたりのオートファゴソームの数を測定した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コントロール群、Student's *t*-test)。 (H) 1 細胞あたりの小胞体内腔の面積を測定した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コン

トロール群、Student's t -test)。

7

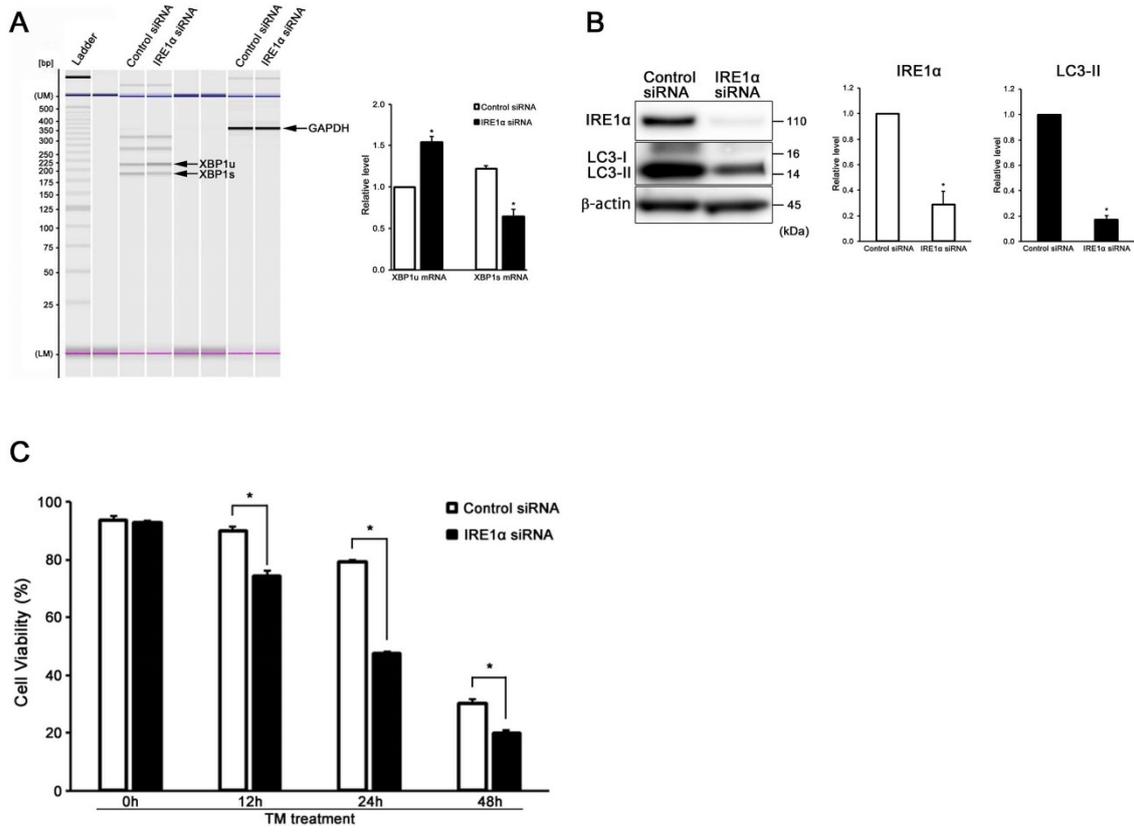
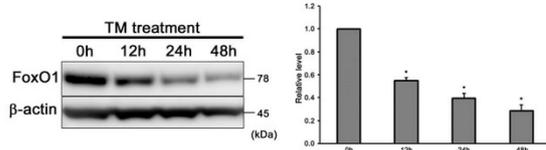
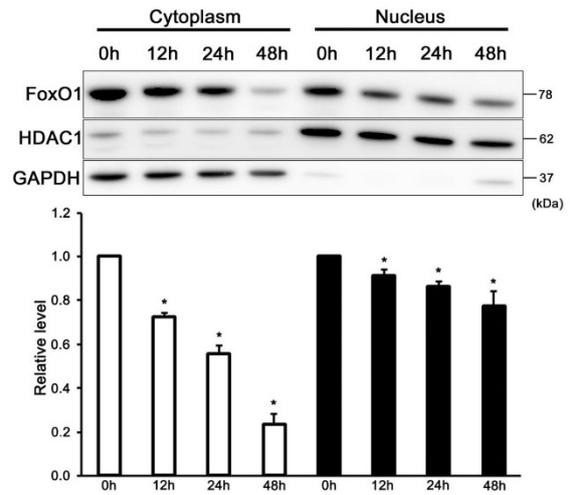


図 7. IRE1 α による XBP1 mRNA スプライシングは小胞体ストレス誘導性オートファジーに必要である. (A) RT-PCR 法を用いて、ツニカマイシン(50 μ g/ml、24 時間)処理した IRE1 α KD 細胞の XBP1u mRNA および XBP1s mRNA の発現の解析を行った。GAPDH はローディングコントロールとして示す。XBP1u mRNA および XBP1s mRNA の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コントロール群、Student's t -test)。 (B) ウェスタンブロット法によってツニカマイシン(50 μ g/ml)処理した IRE1 α KD 細胞における LC3-II の発現を解析した。IRE1 α KD 細胞における LC3-II の発現は有意に抑制された。 β -actin はローディングコントロールとして示す。LC3-II の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コントロール群、Student's t -test)。 (C) IRE1 α およびコントロール siRNA を 48 時間トランスフェクションした後、細胞をツニカマイシン(50 μ g/ml、48 時間)処理して細胞生存率を測定した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コントロール群、Student's t -test)。

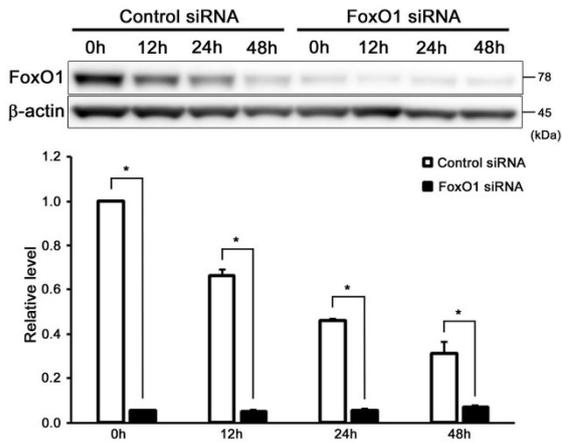
A



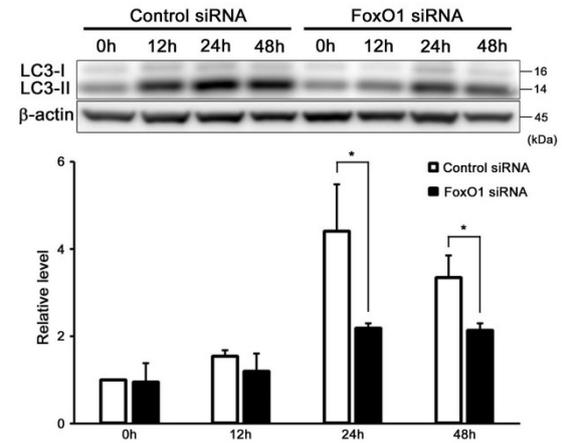
B



C



D



E

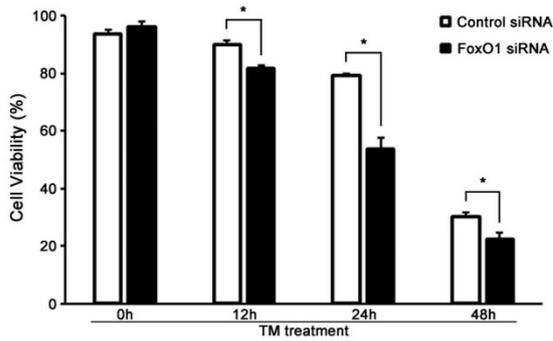


図 8. FoxO1 は小胞体ストレス下でのオートファジー誘導に関与する. (A) ウェスタンブロット法を用いて FoxO1 の発現を解析した。β-actin はローディングコントロールとして示す。FoxO1 の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* p <0.05 対 0 時間、Tukey-Kramer test)。 (B) ウェスタンブロット法によってツニカマイシン(50 μg/ml)処理した細胞の細胞質および核内の FoxO1 の発現を解析した。GAPDH は細胞質タンパク質、HDAC1 は核内タンパク質ローディングコントロールとして示す。FoxO1 の発現は細胞質および核内の両方で検出された。FoxO1 の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* p <0.05 対 0 時間、Tukey-Kramer test)。 (C および D) ウェスタンブロット法によってツニカマイシン(50 μg/ml)処理した FoxO1 KD 細胞における LC3-II の発現を解析した。FoxO1 KD 細胞における LC3-II の発現は有意に抑制された。β-actin はローディングコントロールとして示す。LC3-II の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* p <0.05 対コントロール群、Student's *t*-test)。 (E) FoxO1 およびコントロール siRNA を 48 時間トランスフェクションした後、細胞をツニカマイシン(50 μg/ml、48 時間)処理して細胞生存率を測定した。データは 3 つ以上の独立した実験の平均±S.D.として示す(* p <0.05 対コントロール群、Student's *t*-test)。

9

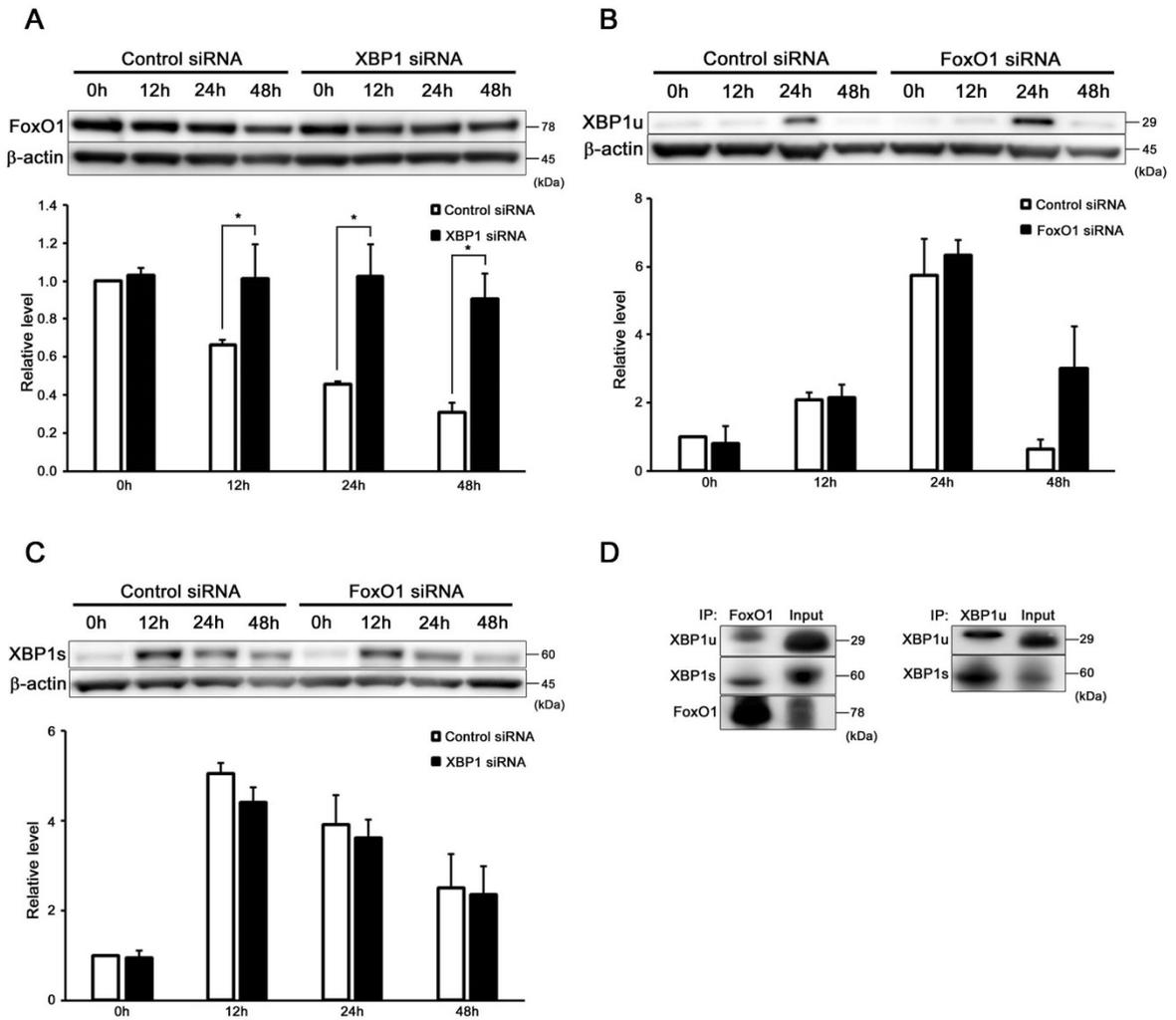


図 9. XBP1 は小胞体ストレス下での FoxO1 の発現を制御する. (A) ツニカマイシン (50 $\mu\text{g/ml}$)処理した XBP1 KD 細胞における FoxO1 の発現をウェスタンブロット法で解析した。XBP1 KD 細胞における FoxO1 の発現は有意な変化を示さなかった。 β -actin はローディングコントロールとして示す。FoxO1 の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す(* $p < 0.05$ 対コントロール群、Student's t -test)。 (B および C) ツニカマイシン(50 $\mu\text{g/ml}$)処理した FoxO1 KD 細胞における XBP1u, s の発現をウェスタンブロット法で解析した。FoxO1 KD 細胞は、コントロール細胞と比較して、XBP1u および XBP1s の発現の有意差を示さなかった。 β -actin はローディングコントロールとして示す。XBP1u および XBP1s の発現量のデータは 3 つ以上の独立した実験の平均 \pm S.D.として示す。 (D) 共免疫沈降法により、XBP1u, s と FoxO1 との間の直接的な相互作用が明らかになった。また、XBP1u と XBP1s との間の直接的な相互作用も明らかになった。示されたデータは、3 つの独立した実験の代表である。

图 10

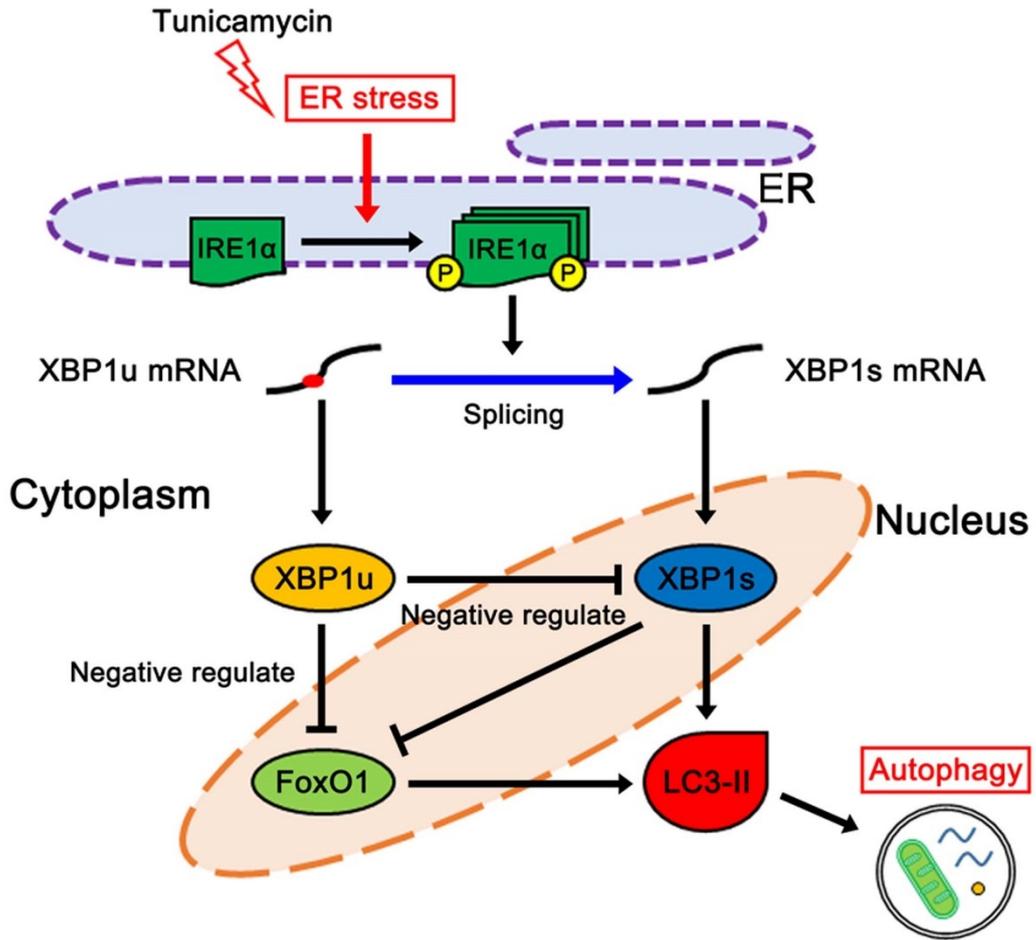


図 10. 内耳感覚細胞において小胞体ストレス下で XBP1 は FoxO1 との相互作用を介してオートファジーを制御する。内耳感覚細胞において XBP1 スプライシングが FoxO1 の転写制御を介して小胞体ストレス誘導性のオートファジーを誘導する。

引用文献

1. Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, et al. Enhanced expression of C/EBP homologous protein (CHOP) precedes degeneration of fibrocytes in the lateral wall after acute cochlear mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem. Int.* 2010;56: 487-94.
2. Fujinami Y, Mutai H, Mizutani K, et al. A novel animal model of hearing loss caused by acute endoplasmic reticulum stress in the cochlea. *J. Pharmacol. Sci.* 2012;118: 363-72.
3. Schronder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74: 739-89.
4. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev.* 2006;86: 1133-49.
5. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13: 89-102.
6. Walter P, Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011;334: 1081-6.
7. Yoshida H. ER stress and disease. *FEBS J.* 2007;274: 630-58.
8. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005;115: 2656-664.
9. Elbein AD. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides.

- CRC Crit Rev Biochem. 1984;16: 21-49.
10. Takatsuki A, Arima K, Tamura G. Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot.* 1971;24: 215-23.
 11. Oishi N, Duscha S, Boukari H. et al. XBP1 mitigates aminoglycoside-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell death. *Cell Death Dis.* 2015;6: e1763. doi: 10.1038/cddis.2015.108.
 12. Mori K, Ma W, Gething MJ. Et al. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from ER to the nucleus. *Cell.* 1993;74: 743-56.
 13. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999;397: 271-4.
 14. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, et al. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* 1998;273: 33741-9.
 15. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107: 881-91.
 16. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, et al. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998;17: 5708-17.

17. Calfon M, Zeng H, Urano F, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002;415: 92-6.
18. Li H, Korennykh AV, Behrman SL, et al. Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107: 16113-8.
19. Tirosh B, Iwakoshi NN, Glimcher LH, et al. Rapid turnover of unspliced XBP-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 2006;281: 5852-60.
20. Lee K, Tirasophon W, Shen X. et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2001;16: 452-66.
21. Margariti A, Li H, Chen T, et al. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 2013;288: 859-72.
22. Scheper W, Nijholt DA, Hoozemans JJ. The unfolded protein response and proteostasis in Alzheimer disease: preferential activation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Autophagy*. 2011;7: 910-1.
23. Kato T, Kitamura K, Maeda M, et al. Free oligosaccharides in the cytosol of *Caenorhabditis elegans* are generated through endoplasmic reticulum-golgi trafficking. *J. Biol Chem.* 2007;282: 22080-8.
24. Duan Q, Ni L, Wang P, et al. Deregulation of XBP1 expression contributes to myocardial

- vascular endothelial growth factor-A expression and angiogenesis during cardiac hypertrophy in vivo. *Aging Cell*. 2016;15: 625-33.
25. Wang W, Sun Y, Chen S, et al. Impaired unfolded protein response in the degeneration of cochlea cells in a mouse model of age-related hearing loss. *Exp. Gerontol*. 2015;60: 61-70.
 26. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306: 457-61.
 27. Ueki K, Kadowaki T. The other sweet face of XBP-1. *Nat. Med*. 2011;17: 246-8.
 28. Franca LM, Freitas LN, Chagas VT et al. Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014;443: 725-30.
 29. Ye D, Li FY, Lam KS, et al. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut*. 2012;61: 1058-67.
 30. Savic S, Ouboussad L, Dickie LJ, et al. TLR dependent XBP-1 activation induces an autocrine loop in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J. Autoimmun*. 2014;50: 59-66.
 31. Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008;134: 743-56.
 32. Tang CH, Ranatunga S, Kriss CL, et al. Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *J. Clin. Invest*. 2014;124: 2585-98.

33. Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, et al. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature*. 2014;508: 103-7.
34. Scriven P, Coulson S, Haines R, et al. Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2009;101: 1692-8.
35. Fujimoto T, Onda M, Nagai H, et al. Upregulation and overexpression of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) gene in primary breast cancers. *Breast Cancer*. 2003;10: 301-6.
36. Fujimoto T, Yoshimatsu K, Watanabe K, et al. Overexpression of human X-box binding protein 1 (XBP-1) in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Anticancer Res*. 2007;27: 127-31.
37. Vidal RL, Figueroa A, Court FA, et al. Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Hum. Mol. Genet*. 2012;21: 2245-62.
38. Casas-Tinto S, Zhang Y, Sanchez-Garcia J, et al. The ER stress factor XBP1s prevents amyloid- β neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet*. 2011;20: 2144-60.
39. Reinhardt S, Schuck F, Grösgen S, et al. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2013;28: 978-97.
40. Lee JH, Won SM, Suh J, et al. Induction of the unfolded protein response and cell death

- pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. *Exp. Mol. Med.* 2010;42: 386-94.
41. Liu SY, Wang W, Cai ZY, et al. Polymorphism -116C/G of human X-box-binding protein 1 promoter is associated with risk of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19: 229-34.
42. Valdes P, Mercado G, Vidal RL, et al. Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014;111: 6804-9.
43. Duplan E, Giaime E, Viotti J, et al. ER-stress-associated functional link between Parkin and DJ-1 via a transcriptional cascade involving the tumor suppressor p53 and the spliced X-box binding protein XBP-1. *J. Cell. Sci.* 2013;126: 2124-33.
44. Castillo-Carranza DL, Zhang Y, Guerrero-Muñoz MJ, et al. Differential activation of the ER stress factor XBP1 by oligomeric assemblies. *Neurochem. Res.* 2012;37: 1707-17.
45. Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, et al. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J. Biol. Chem.* 2006;281: 30152-65.
46. Hetz C, Thielen P, Matus S, et al. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 2009;23: 2294-306.
47. Vidal RL, Hetz C. Unspliced XBP1 controls autophagy through FoxO1. *Cell*

- Research. 2013;23: 463-4.
48. Hayashi K, Dan K, Goto F, et al. The autophagy pathway maintained signaling crosstalk with the Keap1-Nrf2 system through p62 in auditory cells under oxidative stress. *Cell Signal*. 2015;27: 382-93.
 49. Tsuchihashi NA, Hayashi K, Dan K, et al. Autophagy through 4EBP1 and AMPK regulates oxidative stress-induced premature senescence in auditory cells. *Oncotarget*. 2015;28: 3644-55.
 50. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451: 1069-75.
 51. Yang DJ, Zhu L, Ren J, et al. Dysfunction of autophagy as the pathological mechanism of motor neuron disease based on a patient-specific disease model. *Neurosci Bull*. 2015;31: 445-51.
 52. Fujimoto C, Iwasaki S, Urata S, et al. Autophagy is essential for hearing in mice. *Cell Death Dis*. 2017;8: e2780. doi: 10.1038/cddis.2017.194.
 53. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 2005;24: 7410-25.
 54. Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2008; 27: 2312-9.
 55. Zhao Y, Yang J, Liao W, et al. Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy

- and tumor suppressor activity. *Nat. Cell Biol.* 2010;12: 665-75.
56. Xu P, Das M, Reilly J, et al. JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes Dev.* 2011;25: 310-22.
57. Zhou J, Liao W, Yang J, et al. FOXO3 induces FOXO1-dependent autophagy by activating the AKT1 signaling pathway. *Autophagy.* 2012;8: 1712-23.
58. Zhao Y, Li X, Cai MY, et al. XBP-1u suppresses autophagy by promoting the degradation of FoxO1 in cancer cells. *Cell Res.* 2013; 23: 491-507.
59. Zhou Y, Li X, Cai MY, et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nat. Med.* 2011;17: 356-65.
60. Kalinec GM, Webster P, Lim DJ, et al. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol. Neurootol.* 2003;8: 177-89.
61. Itokawa K, Komagata O, Kasai S, et al. T. Testing the causality between CYP9M10 and pyrethroid resistance using the TALEN and CRISPR/Cas9 technologies. *Sci Rep.* 2016;6: 24652. doi: 10.1038/srep24652.
62. Vanderschaeghe D, Szekrényes A, Wenz C, et al. High-throughput profiling of the serum N-glycome on capillary electrophoresis microfluidics systems: toward clinical implementation of GlycoHepatoTest. *Anal Chem.* 2010;82: 7408-15.
63. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007;3: 542-5.

64. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, et al. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* 2006;172: 565-75.
65. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007;21: 2861-873.
66. Fouillet A, Levet C, Virgone A, et al. ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy.* 2012;8: 915-26.
67. Ghavami S, Yeganeh B, Stelmack GL, et al. Apoptosis, autophagy, and ER stress in mevalonate cascade inhibition-induced cell death of human atrial fibroblasts. *Cell Death Dis.* 2012;3: e330. doi: 10.1038/cddis.2012.61.
68. Vidal RL, Hetz C. Crosstalk between the UPR and autophagy pathway contributes to handling cellular stress in neurodegenerative disease. *Autophagy.* 2012;8: 970-2.
69. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* 2013;368: 651-62.
70. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012;4: 445-544.
71. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010;140: 313-26.
72. Kim SK, Oh E, Yun M, et al. T. Palmitate induces cisternal ER expansion via the activation of XBP-1/CCT α -mediated phospholipid accumulation in RAW 264.7 cells.

Lipids Health Dis. 2015;14: 73. doi: 10.1186/s12944-015-0077-3.

73. Wang H, Liu Z, Gou Y, et al. Apoptosis and necrosis induced by novel realgar quantum dots in human endometrial cancer cells via endoplasmic reticulum stress signaling pathway. *Int J Nanomedicine*. 2015;10: 5505-12.
74. Schuck S, Prinz WA, Thorn KS, et al. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J. Cell Biol*. 2009;187: 525-36.
75. Sriburi R, Jackowski S, Mori K, et al. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol*. 2004;167: 35-41.
76. Sriburi R, Bommasamy H, Buldak GL, et al. Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. *J. Biol. Chem*. 2007;282: 7024-34.

研 究 業 績

岸 野 明 洋

I 発表	①一般発表	57 (単	3/	共	54)
	②特別発表	なし			
II 論文	①原著論文	5 (単	0/	共	5)
	②症例報告	3 (単	0/	共	3)
	③総説	なし			
III 著書		なし			

I 発表

① 一般発表

1. 大内俊孝、岸野明洋、木村優介、友松裕貴、増田 毅、浅川剛志、野村泰之、嶋原俊太郎、古阪 徹：脳脊髄液減少によって感音難聴を示した下垂体腺腫の1例，日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会例会第200回学術講演会，東京，2013年7月
2. 岸野明洋、野村泰之、戸井輝夫、木村優介、上浦大輝、三浦正稔、飯國美沙子、増田 毅、嶋原俊太郎、斎藤雄一郎：入院を要しためまい症例の検討，第72回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2013年11月
3. 戸井輝夫、野村泰之、岸野明洋、木村優介、三浦正稔、飯國美沙子、増田 毅、嶋原俊太郎：地震後めまい症候群の症例患者，第72回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2013年11月
4. 嶋原俊太郎、野村泰之、嶋原じゅん子、増田 毅、戸井輝夫、池田篤生、木村優介、岸野明洋、荘司政利、池田 稔：脳ヘルニアをきたした小脳梗塞と考えられる症例，第72回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2013年11月
5. 松崎洋海、牧山 清、平井良治、高根智之、鈴木啓誉、石井崇平、岸野明洋：喉頭乳頭腫からの癌化が疑われた喉頭癌の一症例，第26回日本喉頭科学会総会・学術講演会，沖縄，2014年3月
6. Akihiro Kishino, Yasuyuki Nomura, Teruo Toi, Yusuke Kimura, Fusako Iikuni, Takeshi Masuda, Shuntaro Shigihara, Yuichiro Saito: Analysis of Inpatients with Vertigo and

Dizziness, 15th KOREA JAPAN Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck

Surgery, Seoul, Korea, 2014 年 4 月

7. Yasuyuki Nomura, Teruo Toi, Akihiro Kishino, Hirotaka Suzuki, Fusako Iikuni, Takeshi

Masuda, Shuntaro Shigihara, Tohru Furusaka: The Patients with Dizziness Without Vertigo,

15th KOREA JAPAN Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Seoul,

Korea, 2014 年 4 月

8. Teruo Toi, Yasuyuki Nomura, Akihiro Kishino, Shuntaro Shigihara, Tohru Furusaka,

Harumi Ishikawa, Kenji Miki, Tomohiko Mizutani: Differentiation Between Mitochondrial

Encephalomyopathy and Multiple Sclerosis in Patients with Dizziness, 15th KOREA JAPAN

Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Seoul, Korea, 2014 年 4 月

9. Hiroumi Matsuzaki, Kiyoshi Makiyama, Ryoji Hirai, Souhei Ishii, Hirotaka Suzuki,

Akihiro Kishino: A RARE CASE OF GLOTTIS CANCER WITH LOW-RISK HPV

INFECTION, 18th World Congress of Broncho-Esophogology, Kyoto, Japan, 2014 年 4 月

10. Hiroumi Matsuzaki, Kiyoshi Makiyama, Ryoji Hirai, Itsuhiro Kudou, Yusho Higuchi,

Fusako Iikuni, Souhei Ishii, Hirotaka Suzuki, Akihiro Kishino: Ho-YAG laser-application to

laryngeal microsurgery-study of irradiation methods-. 18th World Congress of Broncho-

Esophogology, Kyoto, Japan, 2014 年 4 月

11. 野村泰之、戸井輝夫、岸野明洋、鈴木啓誉、増田 毅、飯國英紗子、嶋原俊太

郎、古阪 徹：ぐらぐら、ふわふわするめまい患者について、第 115 回日本耳鼻咽

喉科学会通常総会・学術講演会, 福岡, 2014 年 5 月

12. 松崎洋海、牧山 清、工藤逸大、平井良治、澤田英紗子、樋口雄将、石井崇平、鈴木啓誉、岸野明洋：HPV 感染を伴った喉頭癌の 2 症例, 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 福岡, 2014 年 5 月

喉科学会通常総会・学術講演会, 福岡, 2014 年 5 月

13. 鈴木啓誉、牧山 清、松崎洋海、石井崇平、岸野明洋、高根智之、平井良治：bFGF を用いた声帯内注射の検討ー高速デジタル撮影と音響分析による経過観察ー, 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 福岡, 2014 年 5 月

14. 岸野明洋：メニエール病の入院症例について, 第 11 回東京メニエール病カンファレンス, 東京, 2014 年 6 月

15. 岸野明洋、野村泰之、戸井輝夫、木村優介、増田 毅、嶋原俊太郎、斎藤雄一郎、古阪 徹：メニエール病の入院症例について, 第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 横浜, 2014 年 11 月

16. 嶋原俊太郎、野村泰之、増田 毅、嶋原じゅん子、高根智之、戸井輝夫、池田篤生、三浦正稔、木村優介、岸野明洋、肥田野なつき、荘司政利、斎藤雄一郎、池田 稔：メニエール病に対する鼓膜チューブ留置の効果, 第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 横浜, 2014 年 11 月

17. 戸井輝夫、戸井輝夫、岸野明洋、木村優介、原田英誉、増田 毅、嶋原俊太郎、斎藤雄一郎、古阪 徹：高齢者の前庭神経炎の一例, 第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 横浜, 2014 年 11 月

18. 木村優介、嶋原俊太郎、岸野明洋、戸井輝夫、増田 毅、野村泰之、斎藤雄一郎：脳 MRI 拡散強調画像で多発性高信号を呈した頭位性めまいの 1 例，第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，横浜，2014 年 11 月
19. 原田英誉、野村泰之、戸井輝夫、岸野明洋、木村優介、増田 毅、嶋原俊太郎、古阪 徹：医師国家試験めまい平衡模擬問題の作成体験，第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，横浜，2014 年 11 月
20. 岸野明洋：鼻腔に発生した多形腺腫の 1 症例，第 30 回城北・埼玉南部耳鼻咽喉科学術集会，東京，2015 年 2 月
21. 岸野明洋、増田 毅、友松裕貴、永田善之、野村泰之、嶋原俊太郎、大島猛史：CE-Chirp を用いた AABR の検討，第 116 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会，東京，2015 年 5 月
22. 嶋原俊太郎、野村泰之、浅川剛志、増田 毅、友松裕貴、三浦正稔、木村優介、岸野明洋、原田英誉、平井良治、池田 稔、大島猛史：当科における中耳真珠腫 Second look operation の検討，第 116 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会，東京，2015 年 5 月
23. 野村泰之、戸井輝夫、岸野明洋、木村優介、原田英誉、森田優登、鈴木啓誉、澤田芙紗子、増田 毅、嶋原俊太郎、大島猛史：ぐらぐら、ふわふわめまいと加齢性平衡障害，第 116 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会，東京，2015 年 5 月
24. 永田善之、増田 毅、友松裕貴、岸野明洋、野村泰之、嶋原俊太郎、大島猛

史：乳児における他覚的聴覚検査の負担軽減の試み，第 116 回日本耳鼻咽喉科学会
通常総会・学術講演会，東京，2015 年 5 月

25. 岸野明洋、嶋原俊太郎、山中弘明、上浦大輝、高根智之、浅川剛志、野村泰
之、古阪 徹、大島猛史：鼻腔に発生した多形腺腫症例，第 77 回耳鼻咽喉科臨床学
会，浜松，2015 年 6 月

26. 山中弘明、岸野明洋、上浦大輝、高根智之、浅川剛志、野村泰之、嶋原俊太
郎、古阪 徹、大島猛史：術後診断が困難であった耳下腺非脂腺型リンパ腺腫の一
例，第 77 回耳鼻咽喉科臨床学会，浜松，2015 年 6 月

27. 嶋原俊太郎、野村泰之、浅川剛志、増田 毅、友松裕貴、平井良治、岸野明
洋、木村優介、池田 稔、大島猛史：当科における中耳真珠腫 Second look operation
の術後聴力の検討，第 25 回日本耳科学会総会・学術講演会，長崎，2015 年 10 月

28. 岸野明洋、野村泰之、戸井輝夫、木村優介、増田 毅、嶋原俊太郎、斎藤雄一
郎、大島猛史：前庭神経炎の入院症例について，第 74 回日本めまい平衡医学会総
会・学術講演会，岐阜，2015 年 11 月

29. 嶋原俊太郎、野村泰之、増田 毅、高根智之、戸井輝夫、池田篤生、三浦正
稔、岸野明洋、木村優介、原田英誉、斎藤雄一郎、荘司政利、嶋原じゅん子、大島
猛史：内リンパ水腫症例のめまい発作に対する苓桂朮甘湯の効果，第 74 回日本めま
い平衡医学会総会・学術講演会，岐阜，2015 年 11 月

30. 増田 毅、野村泰之、戸井輝夫、木村優介、岸野明洋、嶋原俊太郎、斎藤雄一

郎、大島猛史：ふらつき患者に対するプライマー検査としての VEMP, 第 74 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 岐阜, 2015 年 11 月

31. 戸井輝夫、野村泰之、岸野明洋、増田 毅、嶋原俊太郎、大島猛史、斎藤雄一郎：頸部の回旋に伴うめまいを生じた bow hunters 症候群の一例, 第 74 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 岐阜, 2015 年 11 月

32. 野村泰之、岸野明洋、木村優介、戸井輝夫、増田 毅、嶋原俊太郎、大島猛史：高齢者のめまい入院症例, 第 74 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 岐阜, 2015 年 11 月

33. 高根智之、嶋原俊太郎、斎藤雄一郎、岸野明洋、野村泰之、大島猛史：第 8 脳神経血管圧迫症候群と考えられた 6 症例の検討, 第 74 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 岐阜, 2015 年 11 月

34. Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Yasuyuki Nomura, Akihiro Kishino, Kaoru Ogawa: The function analysis of micro RNA let-7b packed into exosome in auditory cell, 16th JAPAN-KOREA Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Tokyo, Japan, 2016 年 3 月

35. 野村泰之、戸井輝夫、岸野明洋、木村優介、森田優登、三浦正稔、澤田芙紗子、増田 毅、嶋原俊太郎、大島猛史：高齢者加齢性めまい平衡障害の経過, 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 名古屋, 2016 年 5 月

36. 嶋原俊太郎、野村泰之、浅川剛志、平井良治、増田 毅、三浦正稔、岸野明

洋、木村優介、原田英誉、池田 稔、大島猛史：両側性真珠腫症例の検討，第 117

回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会，名古屋，2016 年 5 月

37. 林 賢、五島史行、野村泰之、岸野明洋、大島猛史、小川 郁：内耳感覚細

胞におけるエクソソームに含有される microRNA let-7b の機能解析，第 117 回日本耳

鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会，名古屋，2016 年 5 月

38. Akihiro Kishino, Yasuyuki Nomura, Teruo Toi, Yusuke Kimura, Takeshi Masuda,

Shuntaro Shigihara, Takeshi Ohshima: Statistical report on hospitalized cases of Vestibular

Neuritis, 29th Barany Society Meeting, Seoul, Korea, 2016 年 6 月

39. Yasuyuki Nomura, Teruo Toi, Akihiro Kishino, Yusuke Kimura, Masanori Miura,

Shuntaro Shigihara, Takeshi Oshima: Can Age Related Disequilibrium Be Cured? 29th

Barany Society Meeting, Seoul, Korea, 2016 年 6 月

40. Teruo Toi, Yasuyuki Nomura, Akihiro Kishino, Yuichiro Saito, Takeshi Oshima: A Case

Cervical Vertigo, 29th Barany Society Meeting, Seoul, Korea, 2016 年 6 月

岸野明洋：メニエール病入院患者の睡眠の検討、第 13 回東京メニエール病カンファ

レンス，東京，2016 年 6 月

41. Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Akihiro Kishino, Yasuyuki Nomura, Kaoru Ogawa:

MicroRNA let-7b Activates TLR7 and Causes Cell Death in Auditory Cell,

American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual

Meeting & OTO Experience, San Diego, USA, 2016 年 9 月

42. 岸野明洋、鳴原俊太郎、戸井輝夫、木村優介、森田優登、増田 毅、野村泰之、斎藤雄一郎、大島猛史：上半規管裂隙症候群における VEMP の検討，第 75 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2016 年 10 月
43. 岸野明洋、野村泰之、戸井輝夫、木村優介、森田優登、増田 毅、鳴原俊太郎、斎藤雄一郎、大島猛史：メニエール病入院患者の睡眠の検討，第 75 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2016 年 10 月
44. 岸野明洋、野村泰之、戸井輝夫、木村優介、森田優登、増田 毅、鳴原俊太郎、斎藤雄一郎、大島猛史：椎骨脳底動脈循環不全(VBI)の入院症例について，第 75 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2016 年 10 月
45. 野村泰之、戸井輝夫、岸野明洋、木村優介、森田優登、増田 毅、鳴原俊太郎、大島猛史：熊本地震と地震後めまい症候群，第 75 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2016 年 10 月
46. 鳴原俊太郎、野村泰之、増田 毅、高根智之、戸井輝夫、池田篤生、三浦正稔、岸野明洋、木村優介、莊司政利、鳴原じゅん子、大島猛史：聴神経腫瘍経過観察例における平衡障害の変化，第 75 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2016 年 10 月
47. 森田優登、野村泰之、戸井輝夫、岸野明洋、増田 毅、鳴原俊太郎、斎藤雄一郎、大島猛史：当科 1 年間の外来初診患者とめまい患者の動向，第 75 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2016 年 10 月

48. 戸井輝夫、野村泰之、岸野明洋、木村優介、森田優登、三浦正稔、嶋原俊太郎、大島猛史：地震後めまい症候群：熊本地震から東日本大震災を顧みて，第 75 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会，大阪，2016 年 10 月
49. 岸野明洋、増田 毅、木村優介、野村泰之、嶋原俊太郎、大島猛史：CE-Chirp[®]を用いた MB11 BERAPhone[®]の検討，第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会，長野，2016 年 10 月
50. 嶋原俊太郎、野村泰之、平井良治、増田 毅、木村優介、岸野明洋、木村優介、田井道愛、大島猛史：内リンパ水腫症例の聴力予後，第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会，長野，2016 年 10 月
51. 野村泰之、岸野明洋、木村優介、嶋原俊太郎、大島猛史：地震後めまい症候群：熊本地震の避難所にて，第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会，長野，2016 年 10 月
52. 田井道愛、嶋原俊太郎、野村泰之、平井良治、増田 毅、木村優介、岸野明洋、大島猛史：上半規管裂隙症候群手術後の脳脊髄液減少症により機能性難聴を示した一例，第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会，長野，2016 年 10 月
53. 林 賢、五島史行、野村泰之、岸野明洋、神崎 晶、小川 郁：エクソソームに含有される microRNA let-7b が細胞外から内耳感覚細胞に与える影響と細胞死制御機構，第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会，長野，2016 年 10 月
54. 岸野明洋、林 賢、増田 毅、野村泰之、大島猛史：内耳感覚細胞における

IRE1 α -mediated XBP1 mRNA スプライシングと小胞体ストレス誘導性オートファジー, 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 名古屋, 2017 年 5 月

55. Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima: The regulation of autophagy through XBP1-FoxO1 interaction in auditory cells under ER stress, The 8th International Symposium on Autophagy, Nara, Japan, 2017 年 5 月

56. Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Takeshi Masuda, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima: XBP1 regulates ER stress-induced autophagy via FoxO1, American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience, Chicago, USA, 2017 年 9 月

57. Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Akihiro Kishino, Yasuyuki Nomura, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa: TLR7/TRPA1-Mediated Auditory Cell Death and Excitation, American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience, Chicago, USA, 2017 年 9 月

② 特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

1. 岸野明洋、野村泰之、戸井輝夫、木村優介、原田英誉、増田 毅、嶋原俊太郎、齋藤 雄一郎、大島猛史：メニエール病の入院症例について, *Equilibrium Research* 2015;74: 282-9.
2. 戸井輝夫、野村泰之、岸野明洋：一過性虚血による眼振は健側向きなのか？, 電子情報通信学会技術研究報告 2015;115: 39-42.
3. Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Takeshi Masuda, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima: XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells, *Scientific Reports* 2017;7:4442. doi: 10.1038/s41598-017-02960-1.
4. 岸野明洋、野村泰之、戸井輝夫、木村優介、増田 毅、嶋原俊太郎、齋藤 雄一郎、大島猛史：前庭神経炎の入院症例について, *Equilibrium Research* 2017;76: 153-61.
5. 岸野明洋、増田 毅、野村泰之、嶋原俊太郎、大島猛史：CE-Chirp[®]を用いた MB11 BERAPHone[®]の検討, *Audiology Japan* 2017;60: 219-22.

② 症例報告

1. 木村優介、嶋原俊太郎、岸野明洋、戸井輝夫、増田 毅、野村泰之、古坂 徹：小脳くも膜嚢胞によるめまいの1例, *日大医学雑誌*, 2014; 73: 186-90.
2. 岸野明洋、嶋原俊太郎、山中弘明、浅川剛志、野村泰之、古坂 徹、大島猛史：

鼻腔に発生した多形腺腫例, 耳鼻咽喉科臨床 2016;102: 621-7.

3. Akihiro Kishino, Shuntaro Shigihara, Hiroaki Yamanaka, Takeshi Asakawa, Yasuyuki

Nomura, Tohru Furusaka, Takeshi Oshima: A Case of Pleomorphic Adenoma Originating

from the Nasal Cavity, Practica Oto-Rhino-Laryngologica Author's Translation 2017;148: 28-

9.