

マウス内耳培養細胞の酸化ストレス誘導性早期老化に
おける Transcription factor EB の役割

日本大学大学院医学研究科博士課程
病理系病態代謝学専攻

鈴木 佑奈

修了年 2022 年

指導教員 榎島 誠

目次

略語・同義語一覧	4
第1章 概要	6
第2章 緒言	7
2-1 加齢性難聴について	
2-2 細胞老化について	
2-3 TFEB を介したオートファジー・ライソゾーム経路	
2-4 蝸牛内耳における酸化ストレス誘導性早期老化モデル	
第3章 研究の目的	12
第4章 材料と方法	13
4-1 使用試薬と抗体	
4-2 細胞及び細胞培養	
4-3 細胞生存率の計測及び細胞増殖試験	
4-4 老化特異的 β -ガラクトシダーゼ染色	
4-5 Total RNA の抽出及び逆転写反応による cDNA 合成	
4-6 リアルタイム PCR	
4-7 細胞への small interfering RNA (siRNA) 導入	
4-8 細胞質・核タンパク質の分画	
4-9 細胞の総タンパク質抽出及びウェスタンブロッティング	
4-10 細胞の蛍光免疫染色	
4-11 細胞浸透性蛍光プローブ DCFH-DA による ROS の測定	
4-12 Lysotracker®による細胞内ライソゾーム評価	
4-13 透過型電子顕微鏡による細胞内微細構造の観察	
4-15 統計解析	
第5章 結果	21
5-1 マウス内耳培養細胞は NaAsO ₂ 曝露により細胞老化表現型を呈する	
5-2 NaAsO ₂ 誘導性の内耳細胞老化は酸化ストレスに依存する	
5-3 マウス内耳培養細胞において、NaAsO ₂ 曝露によりオートファジー・ライソゾーム系が活性化する	
5-4 マウス内耳培養細胞において TFEB は ROS 依存性に活性化し、オートファジー・ライソゾーム経路に関与する	
5-5 TFEB KD 内耳培養細胞では酸化ストレス誘導性の早期老化表現型が増強する	

第6章	考察	27
第7章	結語	32
第8章	謝辞	33
第9章	函	34
第10章	函説	49
第11章	引用文献	56
第12章	研究業績目録	70

略語・同義語一覧

4HNE : 4-hydroxy-2-nonenal
ATM : ataxia telangiectasia mutated
ATG : autophagy related gene
BafA1 : bafilomycin A1
bHLH-Zipper : basic helix-loop-helix-leucine zipper
BSA : bovine serum albumin
CDKN : cyclin dependent kinase
cDNA : complementary DNA
CQ : chloroquine diphosphate salt
CXCL C-X-C motif chemokine ligand
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCFH-DA : 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetates
DDR : dna damage response
DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium
DNA : deoxyribonucleic acid
EBSS : Earle's balanced salt solution
EDTA : 2-({2-[bis(carboxymethyl)amino] ethyl} (carboxymethyl)amino) acetic acid
ER : endoplasmic reticulum
FBS : fetal bovine serum
FGF-R : fibroblast growth factor receptor
GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HADC1 : histone deacetylase 1
IL : interleukin
LAMP1 : lysosomal-associated membrane protein 1
MCOLIN : mucolipin TRP cation channel
MiT/TFE : microphthalmia/transcription factor E
mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1
PIK3 : phosphoinositide 3-kinase
PBS : phosphate buffered saline

RNA : ribonucleic acid

ROS : reactive oxygen species

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

SAMP : senescence accelerated mouse-prone

SDS : sodium dodecyl sulfate

SOD1 : superoxide dismutase 1

TFEB : transcription factor EB

ULK1 : unc-51 like autophagy activating kinase 1

第1章 概要

加齢性難聴は社会的孤立や認知症のリスクファクターであり、高齢化社会における重要な課題の一つである。加齢に伴い緩徐に進行する感音難聴であり、有効な治療法は補聴器や人工内耳のみである。

加齢に伴う慢性疾患では、組織における細胞老化が発症・増悪に寄与することが知られている。細胞老化は様々な細胞ストレスによるDNA損傷によって誘導され、加齢性難聴においては酸化ストレスによる有毛細胞の細胞老化が病態の一つとして考えられている。

オートファジー・ライソゾーム系による細胞内分解機構は、細胞老化に拮抗するメカニズムの一つとして知られ、近年、細胞ストレスに応答したオートファジー・ライソゾーム系の調節因子としてtranscription factor EB (TFEB) が同定された。TFEBは個体老化や加齢性疾患に関与することが知られているが、有毛細胞の細胞老化における役割は不明な点が多い。

本研究では、マウス培養内耳細胞 HEI-OC1 に亜ヒ酸ナトリウム (sodium arsenite ; NaAsO₂) を処理することで酸化ストレス誘導性の早期老化モデルを作製し、TFEB を介したオートファジー・ライソゾーム系がどのように機能するかを検討した。HEI-OC1 細胞に NaAsO₂ を 250 μM から 500 μM の濃度で 60 分間曝露させ、通常培地に戻して培養を継続した。NaAsO₂ 曝露後の HEI-OC1 細胞は、3 日間の培養後に複数の細胞老化表現型を示したことから、酸化ストレス誘導性の早期老化モデルとして解析を行なった。NaAsO₂ 曝露後に TFEB は核内移行を示し、同時にオートファジー・ライソゾーム関連遺伝子の発現増加や、ライソゾーム生合成の促進がみられた。siRNA を用いて TFEB をノックダウンすることにより、これらは有意に抑制され、TFEB が酸化ストレス応答性にオートファジー・ライソゾーム機能を転写レベルで制御していることが示された。TFEB ノックダウン細胞では、NaAsO₂ 曝露によって誘導された細胞老化表現型がさらに顕著に認められた。本研究結果は、マウス内耳培養細胞において TFEB がストレス応答としての機能を持ち、オートファジー・ライソゾーム系を制御することにより細胞老化に拮抗することを示唆している。

第2章 緒言

2-1 加齢性難聴について

加齢性難聴は、加齢に伴う進行性の聴力低下であり、純音聴力の低下、語音聴取能の低下^{1,2}などが主な特徴として知られる。この結果、日常会話や社会活動が困難になり、近年では認知症³⁻⁵、うつ病^{6,7}、社会的孤立⁸のリスクファクターとしても重要とされる。

2008~2010年に国内で実施された老化に関する長期横断疫学研究(NILS-LSA)⁹によれば、日本における難聴の有病率は男女ともに65歳以上で急速に増加し、男性では65~69歳:43.7%, 70~74歳:51.1%, 75~79歳:71.4%, 80歳以上:84.3%, 女性では年齢群順にそれぞれ27.7%, 41.8%, 67.3%, 73.3%と推計される。全国の高齢難聴人口は1,500万人を超え、代表的な加齢性疾患と言える。加齢性難聴は感音難聴の一つに分類され、蝸牛内耳組織の有毛細胞及びらせん神経節細胞が加齢に伴い脱落、変性することが主な病理形態学的変化として知られている¹⁰。これらの細胞は再生能を持たないため、聴力低下は不可逆的な臨床経過を辿り、治療は補聴器や人工内耳といったデバイスによる介入のみである¹¹。

一般に加齢性難聴の発症や程度に影響する因子としては、遺伝要因¹²⁻¹⁴の他、騒音曝露歴^{15,16}、喫煙¹⁷、糖尿病・循環器疾患等の合併^{15,18}などが挙げられている。これらに共通する要素として、蝸牛内耳組織内での酸化ストレスの影響が考えられている。騒音曝露により感音難聴を呈したマウスの蝸牛内耳組織では、正常聴力のマウスと比較し、酸化ストレスマーカー 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE) の蓄積が高度に認められることや¹⁹、生体に有害なスーパーオキシドを毒性の弱い過酸化水素と水に変換する酵素である Superoxide dismutase 1 (SOD1) を欠損したマウスは早期から感音難聴を呈する^{20,21} ことなど、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) による有毛細胞及びらせん神経節細胞の障害が聴力低下と関連することが報告されている。先行研究から、過剰な ROS 産生に伴うミトコンドリア DNA の損傷集積、ミトコンドリア機能低下に起因する有毛細胞のアポトーシスが主流なメカニズムと考えられているが^{16,22,23}、多様な臨

床像を持つ感音難聴においては、未だに明らかにされていない点も多い。

2-2 細胞老化について

ヒト線維芽細胞を繰り返し継代培養すると、対数増殖期にあった細胞が不可逆的な増殖停止に至ることが1960年代にL.Hayflickにより見出された²⁴。この現象は細胞老化と名付けられ、彼らによって初めて提唱された概念である。ほとんどの体細胞では細胞分裂の繰り返しによって徐々にテロメアが短小化し、ある一定の長さに達したテロメアはDNA二重鎖切断として認識される^{25,26}。そこに γ H2AX(セリンの139番目がリン酸化されたヒストンH2AX)や53BP1などのDNA損傷応答因子が集積し²⁷、そこから生ずる持続的なDNA損傷応答(DNA damage response ; DDR)が細胞周期阻害因子p21もしくはp16を誘導し、細胞の増殖停止を引き起こすことが知られている²⁸。このようなテロメア短小化に依存した細胞老化は複製老化と呼ばれている^{25,29,30}。

一方で、さまざまな物理化学的ストレスによって生じたDNA損傷によって、テロメア長とは無関係に速やかに細胞老化表現型が誘導されることが明らかにされている。酸化ストレスや電離放射線、紫外線などによるDNA二重鎖切断³¹⁻³³、あるいはがん遺伝子の過剰発現³⁴によって、DDRを介した増殖停止を引き起こす。これらのテロメア非依存的な外的ストレスによって誘導される細胞老化は早期老化と称される(図1a)。複製老化と早期老化は、いずれにおいても共通した老化表現型を呈し、不可逆的な増殖停止に加えて、老化関連 β -ガラクトシダーゼ(Senescence-associated β galactosidase ; SA- β gal)活性^{35,36}、サイトカイン、ケモカインなどの老化随伴分泌因子(Senescence-associated secretory phenotype ; SASP)の発現亢進^{37,38}、ならびにアポトーシス抵抗性^{39,40}などの特徴を示す(図1b)。

細胞老化は、DNA損傷により不安定なゲノムを有した細胞の異常増殖を防ぐ発癌抑制^{41,42}やSASPによる組織修復機能⁴³として、生体の恒常性維持を担うと考えられていた。しかし、近年になり、SASPによる慢性炎症や様々な生理活性変化に起因し、細胞老化が慢性疾患の発症・増悪に関与することが明らかになった⁴⁴。また、p16陽性の老

化細胞特異的にアポトーシスを誘導する遺伝子改変マウスにおいて、組織に蓄積した老化細胞を選択的に除去することで加齢性疾患の症状改善が見られた⁴⁵。このように、細胞老化と加齢性疾患の相関が直接的に示され、加齢に伴う慢性疾患の治療戦略として細胞老化に対する制御メカニズムの解明が必要とされている。

2-3 TFEB を介したオートファジー・ライソゾーム経路について

オートファジーとは細胞が栄養飢餓などの危機的状态に置かれた時に、自らの細胞質成分を分解して生存に必須なエネルギーなどを獲得する機構として知られる⁴⁶⁻⁴⁸。種々の細胞ストレスに対しても応答し、損傷したミトコンドリアや構造異常タンパク質を分解することで細胞の恒常性を維持する機能を持つ。加齢性難聴においては、ATG5 及び ATG7 を欠損させたオートファジー不全マウスが早期から難聴を呈することや^{49,50}、ATG7 をノックダウンした内耳培養細胞で細胞老化表現型が顕著に見られたことが報告され⁵¹、オートファジーが蝸牛有毛細胞の細胞老化に対して抑制的に働くことが考えられる。

オートファジーの初期過程では、栄養飢餓や種々のストレスを発端としてセリン・スレオニンキナーゼ mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1) を抑制し⁵²、unc-51 like autophagy activating kinase (ULK1)の活性化により Atg タンパク質 (autophagy-related gene ; Atg) をリン酸化することで隔離膜 (オートファゴソーム) を形成する⁵³。オートファゴソームの膜タンパクとして microtubule protein 1 light chain 3 (LC3)が同定され、隔離膜の伸長に必須とされる⁵⁴。また、オートファジーにおける選択的基質として p62/SQSTM1 (以下 p62) が知られている。p62 は LC3 と結合し、ユビキチン化された特異的タンパク質や細胞小器官をオートファゴソームへ誘導する受容体タンパク質として分解を受けることが知られている^{55,56}。オートファゴソームは、細胞小器官を隔離した後にライソゾームと融合することでオートリソソームを形成し、ライソゾーム内の加水分解酵素によって分解を行う^{57,58}。これらの一連の過程はオートファジー・ライソゾーム経路と呼ばれている⁵⁹ (図 2)。

以上のように、オートファジーの制御は主に上記のタンパク質の翻訳後修飾により行われていると考えられている。しかしその一方で、一連の細胞内分解機構の効率化のためには、これら遺伝子の発現上昇によるライソゾーム内の加水分解酵素の活性や、ライソゾーム生合成の上昇が必要であることが示され^{60,61}、前述のタンパク質の発現を協調的に制御する転写因子として TFEB が同定された⁶¹。TFEB は bHLH-Zipper 型の転写因子である MiT/TFE サブファミリーの一つであり、オートファジー・ライソゾーム関連遺伝子のプロモーター領域上にある共通配列に TFEB が結合することが明らかにされている^{62,63}。栄養飢餓などのさまざまな刺激により TFEB の脱リン酸化が起こると、TFEB は核に移行してオートファジー・ライソゾーム関連遺伝子を同時に発現上昇させることが知られている⁶⁴。TFEB は、線虫の寿命制御⁶⁵や、マウスにおける神経変性疾患^{66,67}、代謝疾患^{68,69}などに関与することが報告されている。感音難聴においては、ライソゾーム機能調節を担う Ca チャネル mucolipin TRP cation channel (MCOLIN) 1 及び 3 の欠損マウスで早期から感音難聴が見られることが報告され⁷⁰、ライソゾーム機能との関連が示唆されているが、TFEB が有毛細胞の早期老化にどのように影響するかは明らかではない。

2-4 蝸牛内耳における酸化ストレス誘導性早期老化モデル

本研究では、加齢性難聴における細胞老化の関与、及び、そこに TFEB を介したオートファジー・ライソゾーム系がどのように関わっているかを調べるために、研究モデルの探索を行った。加齢性難聴においては、マウス有毛細胞の細胞老化を示す報告がある。老化関連病態を系統特異的に発症する老化促進モデルマウスである *senescence accelerated mouse-prone 8 (SAMP8)* は感音難聴を発症することが知られているが⁷¹、その有毛細胞では SA- β gal 活性の増加をはじめとする細胞老化表現型が確認されている⁷²。これに関連して、蝸牛内耳組織では抗酸化ストレス因子の発現低下と DNA 損傷マーカーの上昇が認められている。これらの報告から、加齢性難聴の背景には ROS に対する脆弱性に起因する酸化ストレスの上昇と、それに伴う DNA 損傷応答によって引き起こされる早期老化の関与が示唆されている^{73,74}。

以上のことから、内耳培養細胞や蝸牛組織の器官培養系において、酸化ストレス誘導剤を用いて早期老化を誘導したモデルが加齢性難聴の病態解明を目的として利用されている。そこで、本研究ではいくつかの細胞株で早期老化の誘導が報告されている NaAsO_2 に着目した⁷⁵⁻⁷⁸。実際に、 NaAsO_2 長期曝露によるヒトの聴覚への影響に関する疫学研究では、飲料水に含まれるヒ素摂取によって高音障害型の聴覚低下といった加齢性難聴や騒音性難聴に類似する特徴的な聴力像を示すことが報告されている^{79,80}。また、マウスにおいては NaAsO_2 を含む水溶液の経口摂取により、ヒト同様に聴覚障害が見られることが報告されている⁸⁰。 NaAsO_2 を含む無機ヒ素化合物においては、ヒ素の3価から5価への酸化反応に伴いメチル基が導入される酸化的メチル化反応が主要な代謝機構であり、その過程で ROS が生じることで酸化ストレスを誘発することが知られている^{81,82}。さらに、ヒ素化合物とタンパク質の SH 基との親和性に起因し、チオレドキシン還元酵素及びグルタチオン還元酵素などの阻害により間接的に細胞の酸化ストレスを上昇させることが報告されている⁸³。これらの知見を元に、内耳培養細胞 HEI-OC1 において NaAsO_2 を用いた酸化ストレス誘導性早期老化モデルを構築し、以下の研究を行った。

第3章 研究の目的

加齢性難聴をはじめとする感音難聴は、超高齢化を迎える現代において社会活動への影響が懸念されるが、現時点では詳細な病態が明らかではなく有効な予防法もない。加齢性難聴では、酸化ストレスによる蝸牛有毛細胞の早期老化が病態に関与することが示唆され、これらの抑制により聴力低下の進行を防ぐことが期待される。オートファジーは細胞内分解機構の一つであり、酸化ストレスによって生じる損傷オルガネラや凝集タンパク質を隔離し除去することから、細胞老化を抑制することが知られている。これまで、オートファジーの誘導に必須とされる **Atg5** 及び **Atg7** 遺伝子のノックアウトマウスが早期から感音難聴を呈することが報告され、オートファジーが蝸牛有毛細胞に対して保護的な役割を持つことが既に示されている。しかし、**Atg** によるオートファジーの誘導、隔離膜の形成のみならず、ライソゾームとの融合と分解過程を含めた一連の過程（オートファジー・ライソゾーム系）が正常に機能することで自食作用が完結することから、ライソゾームの機能調節を含めた協調的な制御メカニズムの存在が想定される。近年、ライソゾームの機能低下が老化の一要因とされ、オートファジー・ライソゾーム系を調節する転写因子 **TFEB** の活性化が、線虫の寿命を延長し⁶⁵、マウスのパーキンソン病やライソゾーム病の病態を抑制することが明らかになった^{66,67}。しかし、加齢性難聴における **TFEB** についての報告はなく、有毛細胞において、**TFEB** によるオートファジー・ライソゾーム系の遺伝子発現調節が細胞老化にどのように影響するかどうかは明らかではない。

本研究では、加齢性難聴の細胞モデルとして、内耳培養細胞に **NaAsO₂** を用いた酸化ストレスによる早期老化を誘導し、**TFEB** を介したオートファジー・ライソゾーム系が早期老化に対してどのような役割を果たすかを検討した。

第4章 材料と方法

4-1 使用試薬と抗体

亜ヒ酸ナトリウム (sodium arsenite, NaAsO₂)、クロロキンニリン酸塩 (Chloroquine diphosphate salt, CQ)、N-アセチル-L-システイン(N-Acetyl-L-cysteine, NAC) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、バフィロマイシン A 1 (Bafilomycin A1, BafA1) 及びラパマイシン (Rapamycin) は Selleck (Houston, USA) より入手した。ウェスタンブロット及び細胞蛍光免疫染色に使用した1次抗体については、抗TFEB抗体、抗p62/SQSTM1抗体、抗Cathepsin-B抗体、抗HDAC1抗体、抗GAPDH抗体、抗 γ H2AX抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)より、抗p16抗体、抗p21抗体、Alexa488標識抗LAMP1抗体は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)より、抗LC3抗体は MBL (Nagoya, Japan)、抗 β -actin抗体は Dako (Glostrup, Denmark) より入手した。2次抗体については、HRP標識抗マウスIgG及び抗ウサギIgG抗体、Alexa555標識抗ウサギIgG抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より入手した。

4-2 細胞及び細胞培養

マウス内耳培養細胞として温度感受性 SV40 Large T 抗原導入トランスジェニックマウスの蝸牛より分離された House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1)を用いた。HEI-OC1細胞には、有毛細胞特異的な遺伝子として Myosin7a、Prestin や Atoh1 などの遺伝子の発現が確認されている。また、蝸牛支持細胞のマーカー分子である Connexin 26、fibroblast growth factor receptor (FGF-R) の発現していることが報告されている。^{84,85} HEI-OC1細胞は Professor F. Kalinec (UCLA, Los Angeles, CA, USA) より供与頂いた。細胞培養は 10% CO₂, 33°Cの許容条件において、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) を含む high-glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地を用いて行った。細胞は3~4日ごとに 0.05% トリプシン、0.53mM EDTA (Nacalai

Tesque, Japan) にて剥離し、新しい 6cm ディッシュに播種する方法で継代した。

4-3 細胞生存率の計測及び細胞増殖試験

HEI-OC1 細胞を 12 ウェルプレートに 2×10^4 cells/well の細胞密度で播種し、一晚培養した。50 mM の NaAsO₂ 溶液を目的の最終濃度(125 μ M, 250 μ M, 500 μ M)となるように培地に添加し、1 時間のインキュベーション後にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄を行い、通常の培地に置換して培養を継続した。溶媒コントロールとして滅菌水を培地に添加した細胞でも同様の処理を行った。NaAsO₂ 曝露から 24 時間毎に細胞をトリプシン-EDTA 溶液で剥離し、PBS に懸濁して回収した。この細胞懸濁液に 0.4%トリパンブルー溶液 (Nacalai Tesque, Japan) を 1:1 の比率で添加し、TC10 Automated Cell Counter (Bio-Rad, USA) で細胞数及び細胞生存率を測定した。細胞生存率はトリパンブルーが死細胞の細胞膜に対して選択的に透過性を持つ原理を利用し、全細胞数に対する色素陰性細胞数からの細胞生存率 (%) を算出した。

4-4 老化特異的 β -ガラクトシダーゼ染色

細胞老化の検出には Senescence β -Galactosidase Staining kit (Cell Signaling Technology) を用いた。本キットは、中性 pH 付近で示される β -ガラクトシダーゼ活性の測定により細胞老化の程度を定量するものである。 β -ガラクトシダーゼはライソゾーム中に存在し、増殖期の細胞では至適 pH を 5.0 付近に持つ分子であるが、Dimi らにより継代数を重ねた老化細胞においては至適 pH が 6.0 付近に移行することが報告され³⁶、後にこの現象が細胞老化に特異的であることが様々な細胞株、組織で報告されている³⁵。

HEI-OC1 細胞を 6 ウェルプレート上で培養し、PBS で 1 回洗浄した後にキット付属の固定液により室温で 10 分間固定を行った。X-gal 基質を含む染色液を予め濃塩酸で pH5.9~6.0 の範囲内に調製し、PBS で 2 回洗浄後に 1ml ずつウェルに添加した。CO₂ 非存在下、37°C の条件

下で 24 時間インキュベーションを行い、位相差顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) で細胞像を撮影した。Image J を用いて、青色に呈色した細胞数を計測することにより老化特異的 β -ガラクトシダーゼ陽性細胞率 (%) を算出した。各実験条件下において計 200 個以上の細胞を解析に使用した。

4-5 Total RNA の抽出及び逆転写反応による cDNA 合成

細胞からの Total RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行った。HEI-OC1 細胞を 12 ウェルプレート上で一晚培養し、PBS で 1 回洗浄後に細胞溶解バッファー 600 μ l を添加した。ボルテックスで 1 分間激しく攪拌し、1.5 ml のチューブに回収した。次いで細胞溶解バッファーと同量の 70%エタノールを加え、ピペッティングにより攪拌した。これを RNeasy ミニスピニングカラムにアプライし、13500 rpm で 15 秒間遠心分離した。次いで抽出バッファー 700 μ l をカラムにアプライし、13500 rpm で 15 秒間遠心分離した。廃液を完全に除去した後に洗浄バッファー 500 μ l で 2 回洗浄した。カラムに新しい 1.5ml チューブを取り付け、RNase-free 水をカラムに 30 μ l アプライし、13500rpm で 1 分間遠心分離することで RNA を溶出させた。得られた Total RNA 溶解液は分光光度計 (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で OD₂₆₀ 及び OD₂₈₀ を測定し濃度及び純度を算出した。

cDNA 合成は ImProm-II Reverse Transcription system (Promega Corporation, Madison, WI) を用いて行った。250~500ng の RNA に 10 μ M oligo dT プライマーと RNase-free 水を加え 5 μ l の反応液を作成し、サーマルサイクラーを用いて 70°C、5 分間加熱後に 4°C、5 分間冷却した。次いで、ImProm-II 5xReaction buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 1.2 μ l、10 mM deoxynucleotide triphosphates mixture 0.5 μ l、ImProm-II Transcriptase 0.5 μ l 加え、RNase-free 水で 10 μ l の反応液を調製した。次にサーマルサイクラーを用いて、最初に反応液を 25°C で 5 分間加温して oligo dT プライマーと mRNA をアニーリングさせた後、42°C で 60 分間加温して cDNA の伸長反応を行った。その後 70°C で 15 分間加熱し酵素を失

活させ、氷上で冷却した。得られた cDNA に超純水 20 μ l を加え 3 倍に希釈し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

4-6 リアルタイム PCR

リアルタイム PCR 反応は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて行った。HEI-OC1 細胞の total RNA より作成した cDNA 2 μ l に、目的遺伝子に特異的な配列を持つ 10 μ M Forward primer 0.3 μ l、10 μ M Reverse primer 0.3 μ l、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 7.5 μ l、超純水 4.9 μ l を加えて全量 15 μ l になるように反応液を調製した。リアルタイム PCR 反応は以下の通りに行った。まず、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した。次に、95 $^{\circ}$ C、15 秒間の変性と 60 $^{\circ}$ C、1 分間アニーリング及びポリメラーゼ伸長反応を 40 サイクル行った。遺伝子発現量は内部標準コントロールを Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) として、相対定量法を用いて算出した。実験に使用した primer の配列を以下の表に示す。

遺伝子名	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Cdkn2a</i> (p16)	GAACTCTTTCGGTTCGTACCC	CGAATCTGCACCGTAGTTGA
<i>Cdkn1a</i> (p21)	GGAACATCTCAGGGCCGAAA	TCCTGACCCACAGCAGAAGA
<i>IL-6</i>	GTCGGAGGCTTAATTACACA	TCTGAAGGACTCTGGCTTTG
<i>IL-1b</i>	CAGGATGAGGACATGAGCACC	CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC
<i>IL-8</i>	GTCCTTAACCTAGGCATCTTCG	TCTGTTGCAGTAAATGGTCTCG
<i>Cxcl10</i>	GCCGTCATTTTCTGCCTCA	CGTCCTTGCAGAGGGGATC
<i>Map1lc3b</i> (LC3B)	CGTCCTGGACAAGACCAAGT	ATTGCTGTCCCGAATGTCTC
<i>Sqstm1</i> (p62)	GCTGAAGGAAGCTGCCCTAT	TTGGTCTGTAGGAGCCTGGT
<i>Lamp1</i>	CAGCACTCTTTGAGGTGAAAAAC	CCATTCGCAGTCTCGTAGGTG
<i>Ctsb</i> (CathepsinB)	GAAGAAGCTGTGTGGCACTG	GTTCGGTCAGAAATGGCTTC
<i>Ctsd</i> (CathepsinD)	AGGTGAAGGAGCTGCAGAAG	ATTCCCATGAAGCCACTCAG
<i>Tfeb</i>	AAGGTTCTGGGAGTATCTGTCTG	GGGTTGGAGCTGATATGTAGCA
<i>Gapdh</i>	TGCACCACCAACTGCTTAG	GATGCAGGGATGATGTTC

4-7 細胞への small interfering RNA (siRNA)導入

TFEB に対する siRNA は siTFEB #1; Santa Cruz Biotechnology、siTFEB #2; Dharmacon Technologies (Lafayette, CO, USA) より購入した。コントロール si RNA は Santa Cruz Biotechnology より購入した。細胞への siRNA 導入は以下の通りに行った。まず、細胞を 6 ウェルプレート上に細胞密度 2×10^5 cells/well、培地 2ml の条件で播種し一晩培養した。Opti-MEM 120 μ l に各 siRNA 60 pmol、Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific) 4.5 μ l を加え攪拌し、室温で 15 分間インキュベーションした。この反応液を細胞培養液に添加し 48 時間培養した。

4-8 細胞質・核タンパク質の分画

細胞質・核タンパク質の分画には NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) を用いた。まず、細胞を 6cm ディッシュに 1×10^6 cells/well の細胞密度で播種し一晩培養した。氷冷した PBS で 1 回洗浄し、トリプシンで剥離し遠心分離することで細胞のペレットを得た。そこに細胞質タンパク質抽出バッファー 100 μ l を加え、15 秒間激しく攪拌した。氷上に 1 分間放置後に 4°C、13500rpm で 5 分間遠心分離し、上清を細胞質タンパク質として回収した。次いで核タンパク質抽出バッファー 50 μ l を残存したペレットに添加し、15 秒間激しく攪拌した後に氷上に 10 分間放置した。これを 4 度繰り返した後に 4°C、13500rpm で 10 分間遠心分離し、上清を核タンパク質として回収した。

4-9 細胞の総タンパク質抽出及びウェスタンブロッティング

細胞を氷冷 PBS で 1 回洗浄し、スクレーパーで剥離し 1.5ml チューブに回収した。細胞溶解バッファー (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 1% NP40, 1mM Na_3VO_4 , 20mM NaF, Protease inhibitor cocktail) 100 μ l を加え、ホモジナイザーで均一に細胞を破碎した。4°C、13500rpm、20 分間遠心分離を行い、上清を総タン

パク質抽出液として回収した。得られたタンパク質は Pierce BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。各タンパク質に 6×SDS サンプルバッファー (0.35M Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS, 30% Glycerol, 9.3% Dithiothreitol, 0.03% Bromophenol blue) を加え 100°C、5 分間加熱した後にグラディエントポリアクリルアミドゲル (7~15%) で泳動し、iBlot (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いてタンパク質をポリフッ化ビニリデン(PVDF)メンブレンに転写した。転写後のメンブレンは 5%スキムミルクを含む PBS-T (1x PBS, 0.1% Tween 20) を用いて室温で 1 時間ブロッキング反応を行った。1 次抗体は上記のブロッキング溶液に希釈し、4°Cで一晩反応させた。メンブレンは PBS-T で洗浄し、2 次抗体により室温で 1 時間反応させた。抗原抗体複合体は ECL Prime Western Blotting Reagent (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いた化学発光法及び FUSION Solo chemiluminescence system (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) を用いて検出した。目的のタンパク質の定量は、各 1 次抗体特異的に検出されたバンドの発光量を、 β -actin (総タンパク質)、HDAC1 (核分画)、GAPDH (細胞質分画) のバンドの発光量を内部標準コントロールとして補正することにより算出した。実験に使用した 1 次抗体の希釈倍率を以下に示した。2 次抗体はすべての条件で 3000 倍に希釈して使用した。

1 次抗体	希釈倍率
マウス 抗 p21 抗体 (Santa Cruz, sc-6246)	1:200
マウス 抗 p16 抗体 (Santa Cruz, sc-377412)	1:200
ウサギ 抗 γ -H2AX (Ser139)抗体 (Cell signaling, #9718)	1:1000
ウサギ 抗 LC3 抗体 (MBL, PM036)	1:1000
ウサギ 抗 SQSTM1/p62 抗体 (Cell signaling, #5114)	1:1000
ウサギ 抗 Cathepsin B 抗体 (Cell signaling, #31718)	1:1000
ウサギ 抗 TFEB 抗体 (Cell signaling, #32361)	1:1000
マウス 抗 HDAC 1 抗体 (Cell signaling, #5356)	1:1000
ウサギ 抗 GAPDH 抗体 (Cell signaling, #2118)	1:1000
マウス 抗 β -actin 抗体 (Dako, A 5316)	1:10000

4-10 細胞の蛍光免疫染色

細胞は観察用の 35mm ガラスボトムディッシュ (Greiner, Germany) 上で一晩培養した。培地を 4%パラホルムアルデヒドに置換し、室温で 1 時間反応させて細胞の固定を行い、PBS で洗浄後に 0.1% Triton-X 100 を 5 分間処理し細胞膜の透過を行った。次いで、1% BSA を含む PBS-T 溶液により室温で 1 時間ブロッキング反応を行った。1 次抗体及び 2 次抗体は 1% BSA 溶液に希釈し、1 次抗体を 4°C で一晩反応させ、細胞を PBS で洗浄後 2 次抗体を室温、暗所で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含むマウント剤 (VECTSSHIELD Mounting Medium, Vector Laboratories) を用いて核染色及び封入処理を行い、図 1E の実験は蛍光顕微鏡 (KEYENCE) にて、図 5F 及び図 6B の実験は共焦点蛍光顕微鏡 (A1R, Nikon, Tokyo, Japan) にて細胞像を撮影した。得られた画像は ImageJ を用いて解析した。実験に使用した 1 次抗体の希釈倍率を以下の表に示す。2 次抗体は Alexa555 標識抗ウサギ IgG 抗体を 1000 倍に希釈して使用した。

1 次抗体	希釈倍率
ウサギ抗 γ H2AX 抗体 (Cell signaling, #9718)	1:500
ウサギ抗 TFEB 抗体 (Cell signaling, #32361)	1:500
Alexa488 標識ラット抗 LAMP1 抗体 (sc-19992 AF488)	1:1000

4-11 細胞浸透性蛍光プローブ DCFH-DA による ROS の測定

細胞内 ROS 産生量は DCFA-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, Sigma) を用いて測定した。まず、細胞を 12 ウェルプレート上に培養し、各種の薬剤処理を行った。ROS 測定時までの培養日数に達した細胞を 10 μ M の DCFA-DA を含む培地で 1 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄した後に EBSS 培地 (Gibco) に置換して蛍光顕微鏡 (KEYENCE) にて撮影した。

4-12 Lysotracker®による細胞内ライソゾーム活性の評価

ライソゾーム活性の評価は Lysotracker®Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。細胞を観察用のガラスボトムディッシュ (Greiner) 上で一晩培養した。37°C に加温した 10% FBS を含む DMEM 培地に 50 nM の濃度で Lysotracker 溶液を希釈し、各サンプルに添加し 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、Hoechst33342 (10 µg/ml) を含む PBS に置換し、核染色を行った。蛍光顕微鏡 (KEYENCE) にて撮影を行い、Image J により細胞 1 個あたりの輝度の総和を測定した。各実験条件下において計 100 個以上の細胞を解析に使用した。

4-13 透過型電子顕微鏡による細胞内微細構造の観察

細胞を 0.05% トリプシン-EDTA 溶液で剥離し、0.1 M 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、0.1 M 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ミクロトーム (ULTRACUT UCT, Leica, Wien, Austria) 上でダイヤモンドナイフを用いて切削した。薄片を酢酸ウラン及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。

4-14 統計解析

統計解析は Prism9 (GraphPad) を用いて行った。全ての実験データは平均±標準偏差 (S.D) として表示した。2 群間の検定は Student's *t*-test を用いて行った。3 群間以上の検定は一元分散配置分析を用いて行い、有意差が認められた場合に Tukey 法により多重比較検定を行った。

第5章 結果

5-1 マウス内耳培養細胞は NaAsO₂ 曝露により細胞老化表現型を呈する

ストレス誘導性の早期老化において、細胞は非致死性的ストレスによる不可逆的な細胞周期停止状態にあるとされる。はじめに、NaAsO₂の曝露により早期老化が誘導されるかを調べるために、細胞増殖と細胞生存率に対する NaAsO₂の影響を調べた。HEI-OC1 細胞に複数の濃度 (0, 125, 250, 500 μM) の NaAsO₂を 60 分間曝露し、通常の培地に置換し培養を継続した。その結果、NaAsO₂の濃度依存性に細胞増殖が抑制された (図 3A)。一方で、NaAsO₂曝露 3 日目における死細胞の割合は、いずれの濃度においても変化がみられなかった(図 3B)。これらの結果は、NaAsO₂曝露により HEI-OC1 細胞は生存を維持した状態で細胞増殖が停止することを示している。そこで、細胞老化において発現が増加することが知られる細胞周期阻害因子 *Cdkn1a* および *Cdkn2a* (それぞれ p21, p16 をコードする) の mRNA 発現を解析した。NaAsO₂曝露 24 時間後では、*Cdkn1a* の mRNA 発現量が増加し、*Cdkn2a* の mRNA 発現量は不変であった (図 3C)。また、これらの遺伝子発現変化と一致して、p21 タンパク質も NaAsO₂曝露により増加することが示された (図 3D)。次に、DNA の二重鎖切断のマーカースとして知られるリン酸化ヒストン H2AX (γH2AX) のタンパク質量を調べた。NaAsO₂曝露により、γH2AX タンパク質は増加し (図 3D)、免疫染色によりγH2AX タンパク質を標識すると、NaAsO₂曝露後に核内での DNA 二重鎖切断を示すフォーカス数が増加していることが確認された (図 3E)。次に、細胞老化に特異的な活性の上昇が広く知られている老化関連-βガラクトシダーゼ (SA-βgal) 活性を調べた。NaAsO₂曝露後に 3 日間培養を継続すると、全細胞数に対する SA-βgal 陽性細胞数の割合は vehicle 処理に比して増加した (図 3F)。また、老化した細胞は増殖期の細胞とは異なる形態を示すことが知られているが、NaAsO₂曝露後の HEI-OC1 細胞においても肥大化、平坦化を特徴とする形態変化が見られた (図 3G, 黒矢印)。さらに、SASP として知られるいくつかの炎症関連遺伝子の発現亢進も認められた (図 3H)。これ

らの結果から、内耳培養細胞を NaAsO₂ に曝露すると、DDR 及び増殖停止が起こり、複数の細胞老化表現型を呈することが示された。

5-2 亜ヒ酸ナトリウム誘導性の内耳細胞老化は酸化ストレスに依存する

内耳培養細胞に対する NaAsO₂ 曝露が ROS を産生するかどうかを確認するために、DCFH-DA による細胞内 ROS の標識を行った。NaAsO₂ (0, 250, 500 μ M) で 60 分間曝露後、通常培地による培養 3 日後の HEI-OC1 細胞では、陽性コントロールの過酸化水素 (800 μ M, 60 分間) 処理と同様に DCFH-DA の蛍光強度の増加を認め、細胞内 ROS の蓄積が示された (図 4A)。次に、NaAsO₂ 曝露による内耳細胞の早期老化に対して、細胞内 ROS が寄与するかについて調べるために、抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC) による ROS 抑制後の細胞老化表現型を解析した。まず、HEI-OC1 細胞を NAC (2mM) を含む培地で 60 分間前処理した後に NaAsO₂ (500 μ M) に 60 分間曝露させた (図 4B)。NaAsO₂ 曝露によって増加した DCFH-DA の蛍光は NAC 処理によって減少し、細胞内 ROS 産生が抑制された (図 4C)。さらに、NaAsO₂ 曝露によって増加した SA- β gal 陽性細胞率及び p21 のタンパク質量は NAC 処理によって減少した (図 4D,E)。これらの結果により、内耳培養細胞における NaAsO₂ 誘導性早期老化は酸化ストレスに依存することが示された。

5-3 マウス内耳培養細胞において、亜ヒ酸ナトリウム曝露によりオートファジー・ライソゾーム系が活性化する

次に、内耳培養細胞における酸化ストレス誘導性の早期老化に対して、オートファジー・ライソゾームによる細胞内分解系がどのように関与するかを検討した。まず、オートファゴソームの膜タンパク質 LC3 の発現パターンを調べた。LC3 はシステインプロテアーゼ Autophagy-related 4 (Atg4) により C 末端 22 残基が切断除去されて LC3-I となり、細胞質に拡散する。LC3-I はリン脂質フォスファチジルエタノールアミンと共有結合して LC3-II に変換されてオートファゴソーム膜に結合することから、オートファジー誘導の指標として LC3-

II量の測定が汎用されている^{86,87}。図 5A に示すように、LC3-IIタンパク質発現量は NaAsO₂ 曝露 24 時間後に増加し (図 5A) 、 NaAsO₂ 濃度依存性の発現量増加が認められた (図 5B) 。続いて、同条件下でオートファジーにおける選択的基質 p62 の発現パターンを調べた。p62 タンパク質発現量は、NaAsO₂ 曝露 12 時間、24 時間後に増加し (図 5A) 、 NaAsO₂ 濃度依存性に発現量増加が見られた (図 5B) 。NaAsO₂ 曝露後の内耳培養細胞ではオートファゴソムの増加が起きている一方で、分解されるべき基質タンパク質である p62 の発現量の増加も同時に起きていることが示された。この結果は、オートファジーが誘導されて両者の生合成が促進されている場合と、ライソゾーム経路の阻害により分解が抑制されている場合のいずれかの可能性を示している。そこで、両者を識別するためにバフィロマイシン A1 (BafA1) を用いた LC3-II のターンオーバーアッセイ⁸⁸ を行った。BafA1 は vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPase) 特異的阻害剤であり、ライソゾームの酸性化を阻害することでオートファゴソムとその基質タンパク質の分解を抑制する⁸⁹。ライソゾーム経路の阻害によりオートファゴソムが蓄積した場合、BafA1 の存在下で LC3 と p62 のタンパク質発現量は不変であるが、NaAsO₂ 曝露により LC3 と p62 のタンパク質発現量は増加し、BafA1 の存在下でさらなる増加を引き起こした (図 3C) 。この結果から、NaAsO₂ 曝露によって、LC3-II と p62 の生合成は促進されていることが示された。同様に、透過型電子顕微鏡による HEI-OC1 細胞の微細構造の観察では、NaAsO₂ 曝露 24 時間後の内耳培養細胞において二重膜を持つオートファゴソム様小胞の増加が認められた (図 5D) 。次に、ライソゾームの活性及び生合成について検討した。ライソゾームは細胞質と比較して pH が低いオルガネラであるため、NaAsO₂ 曝露によるライソゾーム活性を pH 依存性蛍光プローブである LysoTracker を用いて評価した。陽性コントロールとして、Earle 平衡塩溶液 (Earle's balanced salt solution ; EBSS) で 3 時間培養し、栄養飢餓を誘導した HEI-OC1 細胞を用いた。図 5E に示すように、NaAsO₂ (250, 500 μ M) 曝露 24 時間後における LysoTracker の蛍光強度は陽性コントロールと同程度に上昇していたため、ライソゾーム活性が上昇していることが明らかになった。また、このライソゾームの活

性の上昇が、ライソゾーム生合成の促進によるものかどうかを調べるために、同条件下においてライソゾーム特異的膜タンパク質 Lysosome membrane-associated protein 1 (LAMP1)に対する蛍光免疫染色を行った。その結果、NaAsO₂曝露後の細胞内において、LAMP1 タンパク質の蛍光強度は陽性コントロール同様に増加した (図 5F)。これらの結果から、NaAsO₂曝露後の内耳培養細胞ではライソゾーム生合成が促進し、その結果として活性上昇が起きていることが示された。

5-4 マウス内耳培養細胞において TFEB は ROS 依存性に活性化し、オートファジー・ライソゾーム経路に関与する

次に、TFEB が内耳培養細胞のストレス応答因子として関与するかどうかを検討した。まず、NaAsO₂ (0, 50, 100, 250 μ M)に曝露させた HEI-OC1 細胞の細胞質及び核分画における TFEB のタンパク質量を調べた。TFEB は栄養飢餓ストレス下で核移行する転写因子であることが知られており、EBSS 培地で栄養飢餓を誘導した HEI-OC1 細胞を陽性コントロールとした。TFEB タンパク質量は、EBSS 培地による栄養飢餓条件と同様に NaAsO₂ 曝露により細胞質分画で減少し、核分画で増加した。EBSS による栄養飢餓条件でも同様の細胞内局在変化が見られた。(図 6A)。TFEB 特異的抗体を用いた蛍光免疫染色では、NaAsO₂ 曝露と栄養飢餓条件において核内の TFEB タンパク質量が増加した (図 6B)。また、TFEB の下流の標的遺伝子であるオートファジー・ライソゾーム関連遺伝子の発現レベルは栄養飢餓条件と同様に NaAsO₂ 曝露によって上昇した (図 6C)。さらに、NAC 処理により細胞内 ROS を抑制すると、核分画の TFEB の発現量は低下した (図 6D)。これらの結果より、TFEB が NaAsO₂ 曝露によって生じた酸化ストレスに反応して核内に移行し、その転写活性を発揮することが示された。

次に、酸化ストレスに依存した TFEB の活性化が、NaAsO₂ 曝露後のオートファジーの誘導とライソゾーム機能に関与するかどうかを検討した。TFEB の異なる配列に対する siRNA (#1, 2) を HEI-OC1 細胞に導入し、TFEB ノックダウン (KD) 細胞を作成した。siTFEB #1, #2 をトランスフェクションした細胞では TFEB の mRNA 発現量が低下していることを確認した (図 6E)。TFEB の標的遺伝子 *Map1lc3b*、

Sqstm1 (各々、LC3 と p62 をコードする) 及びライソゾーム関連遺伝子 *Lamp1*、*Ctsd* は、TFEB KD 細胞において NaAsO₂ 依存性の発現量増加が抑制された (図 6F)。また、LC3-II、p62、活性型 Cathepsin B のタンパク質量も同様に抑制された (図 6G)。これらの結果から、TFEB は NaAsO₂ 曝露による ROS 産生に応答した活性化によって、オートファジーの誘導とライソゾーム機能を転写レベルで制御していることが示された。

5-5 TFEB KD 内耳培養細胞では酸化ストレス誘導性早期老化が増強する

酸化ストレスによる内耳培養細胞の早期老化に対して、TFEB を介したオートファジー・ライソゾーム経路がどのように影響を与えるかを検証した。まず、ライソゾーム阻害剤として用いられるクロロキンニリン酸塩 (CQ) 及び BafA1 を HEI-OC1 細胞に処理し、SA-βgal 陽性細胞を評価した。NaAsO₂ 曝露後に増加した SA-βgal 陽性細胞は、CQ を処理することでさらに増加した。BafA1 処理後では、SA-βgal 陽性細胞数に有意差は認められないものの、増加の傾向を示した (図 7A)。次に、オートファジー誘導剤として用いられるラパマイシンを処理し、SA-βgal 陽性細胞を評価した。NaAsO₂ 曝露後に増加した SA-βgal 陽性細胞はラパマイシン処理によって減少した (図 7B)。これらの結果から、オートファジー・ライソゾーム経路の活性化は内耳培養細胞の早期老化を抑制することが示された。

続いて、TFEB を KD した HEI-OC1 細胞において、NaAsO₂ 曝露後の老化表現型を調べた。NaAsO₂ 曝露後に増加した SA-βgal 陽性細胞は、コントロール siRNA 導入細胞と比して TFEB KD 細胞でさらに増加していた (図 7C)。SASP 関連遺伝子も同様に、TFEB KD 細胞でさらなる mRNA 発現量の増加が認められた。一方で、p21 の発現量は、TFEB KD による有意な増加がみられなかった (図 7D)。また、NaAsO₂ 曝露によって HEI-OC1 細胞に生じた ROS を DCFH-DA を用いて評価した結果、TFEB KD 細胞では DCFH-DA の蛍光強度の増強が認められ、ROS が上昇していることが明らかになった (図 7E)。以上の結果

から、TFEB KD 細胞では、NaAsO₂による SASP 関連遺伝子発現と SA-βgal 活性の増加、及び細胞内 ROS の増加が明らかになった。

第6章 考察

本研究では、蝸牛内耳細胞の細胞老化に対して、オートファジー・ライソゾーム系による細胞内分解機構を介したストレス応答のメカニズムを解明するために、はじめに内耳培養細胞 HEI-OC1 を用いた NaAsO₂ 誘導性の細胞老化モデルを構築し、解析を行った。先行研究では、ヒトグリオブラストーマ細胞 (U87MG 細胞)⁷⁷、ヒト皮膚線維芽細胞⁷⁸、ヒト軟骨細胞⁷⁶、マウス B リンパ腫細胞 (A20 細胞)⁷⁵ などの細胞株において NaAsO₂ の曝露による細胞老化の誘導が報告されている。本研究では、HEI-OC1 に対し 125 μ M から 500 μ M の範囲で 60 分間 NaAsO₂ 曝露を行なった結果、いずれの濃度においても死細胞の増加は見られず、細胞増殖停止が観察された。NaAsO₂ 曝露 3 時間後より γ H2AX の発現上昇が見られたことから、HEI-OC1 の核内で DNA の二重鎖断裂が起きていることが示されている。これまでの報告から、細胞老化の開始期において DNA の断裂部位にセリンスレオニンキナーゼ ataxia telangiectasia mutated (ATM) がリクルートされ、細胞周期チェックポイントや DNA 修復酵素が活性化するとされる^{28,90}。p53 は ATM によって活性化される転写因子であり、p21 は p53 の標的遺伝子であることから、DNA 損傷による p53-p21 経路が亢進し、細胞周期阻害因子として機能したことが推察される。

細胞老化の完成期においては、クロマチン構造の変化によって多くの遺伝子発現調節が亢進していることが知られ、炎症性タンパク質の亢進 (SASP) や細胞内の代謝活性化、SA- β ガラクトシダーゼ活性の上昇の原因の一つとして考えられている⁹¹。本研究では、SASP 関連遺伝子の発現誘導は NaAsO₂ 曝露から 24 時間経過後に mRNA レベルで発現増加が認められていたことから、上記の細胞老化に伴う遺伝子発現変化が起き始めていたことが示唆される。SA- β ガラクトシダーゼは、NaAsO₂ 曝露から 24 時間経過後には陽性細胞が検出されず、72 時間後に 20~25%程度の陽性率となった。SA- β gal は老化細胞内において産生が亢進した余剰の β ガラクトシダーゼを示すものであり、細胞老化に伴う遺伝子群の変化や代謝活性化が起きた結果、老化表現型として表出したと考えられる。一方で、p16 においては、NaAsO₂ 曝露後の発

現変化が見られなかった。p21 と p16 は異なるサイクリン依存性キナーゼを標的とし、p16 は CDK4/6 の活性を、p21 は CDK2 の活性を抑制して細胞周期を停止するため³⁴、理論上はどちらかのサイクリン依存性キナーゼ活性が抑制されれば細胞周期が停止することとなる。実際に、ヒト及びマウス由来の細胞株を用いた細胞老化研究では、老化表現型の表出に伴って p16 もしくは p21 のいずれかが上昇するもの、または p16 と p21 の両方が上昇するもの、どちらも報告されている⁹²。これらの発現パターンを規定する因子は明確ではないが、ヒト線維芽細胞の複製老化では、細胞周期が停止した初期の段階では DNA 損傷応答に依存した p21 の発現上昇が見られ、さらに分裂回数を重ねて安定的に増殖停止した細胞では p21 の発現低下と共に p16 の発現増加が認められている⁹³。このように、細胞老化の確立に際しては p21 に引き続いて p16 が機能する事が示唆されている。HEI-OCI 細胞において、NaAsO₂による DNA 損傷応答が持続した場合、p16 が優位に細胞周期調節を行うことも推察されるが、詳細は今後の研究課題である。

内耳培養細胞を用いた細胞老化モデルでは、酸化ストレス誘導剤として汎用される過酸化水素を一定時間処理することで老化表現型を呈することが報告されており、ROS 産生によって早期老化が誘導されることが示されている^{85,94,95}。本研究では過酸化水素の一定時間処理と同様、NaAsO₂曝露により内耳培養細胞で SA-βgal 陽性細胞の増加や p21 の発現増加が認められた。過去には、Lin らによって 1 mM の過酸化水素を 1 時間曝露させることによる HEI-OC1 の細胞老化モデルが報告されている⁹³。SA-βgal 陽性細胞は過酸化水素曝露から 24 時間後に陽性率の増加が認められ、NaAsO₂と比較してより早期に老化表現型を示した。過酸化水素と NaAsO₂は共に ROS 誘導剤であるが、過酸化水素は直接的なヒドロキシラジカルそのものを発生することで過剰な ROS を産生する一方で、NaAsO₂においては、タンパク質の SH 基との親和性に起因した抗酸化酵素の活性阻害による間接的な ROS 誘導作用を持つことから、細胞老化を誘導するレベルの DNA 損傷が生じるまでには時間を要したことが考えられる。また、NaAsO₂の酸化ストレスが内耳培養細胞における早期老化誘導の要因の一つであることを示されたが、NaAsO₂は凝集タンパク質の蓄積による ER ス

トレス⁹⁶、ミトコンドリア機能障害によるエネルギー代謝不全^{97,98}といった複数の細胞内ストレスも同時に誘導し、これらも早期老化の要因となることが知られている^{99,100}。本研究ではこれらについて検討を行わなかったが、NaAsO₂はROSを含めた複合的な要因によってDNA損傷を引き起こすと考えられ、過酸化水素のモデルとは異なる機序が寄与していることも考慮された。

本研究では、酸化ストレス誘導性の早期老化に拮抗するメカニズムの一つとして、オートファジー・ライソゾーム系による細胞内分解機構が重要な役割を果たしていることを明らかにした。まず、NaAsO₂による酸化ストレス存在下では、内耳培養細胞のLC3-IIとp62の発現量が同時に増加していることが示され、BafA1を用いたオートファジーフラックスアッセイによりLC3-IIとp62は生成促進されていることを見出した。実際に、透過型電子顕微鏡を用いた超微細構造の形態観察において、オートファゴソームは有意に増加していた。さらにこの条件下において、TFEBのROSに応答した核内移行を明らかにし、LC3-II及びp62はTFEBの下流の標的遺伝子として転写レベルでの制御を受けていることを示した。また、ライソゾーム関連酵素 (CathepsinB, CathepsinD) の遺伝子発現が増加し、LysoTrackerによるライソゾーム由来の蛍光強度上昇及び細胞質内でのLAMP1発現増加が見られたことから、TFEBはオートファジーの後期過程におけるライソゾーム機能にも関与することが示唆された。さらに、TFEBをノックダウンした内耳培養細胞では、NaAsO₂曝露後のSA-βgal陽性細胞及びSASPに関連するIL-6、IL-1βの遺伝子発現がさらなる増加を示し、老化表現型がより顕著に認められた。また、TFEBノックダウン細胞では、NaAsO₂曝露から3日後における細胞内ROSが増加していたことから、オートファジー・ライソゾーム系の破綻により損傷ミトコンドリアや折りたたみ不全タンパク質の除去が不完全となり、さらなるROS産生が起きたと推察される。クロロキンによる直接的なライソゾーム活性阻害では、NaAsO₂曝露後のSA-βgal陽性細胞はさらに増加し、一方で、ラパマイシン処理によりmTORC1を阻害してオートファジーを誘導した条件では、SA-βgal陽性細胞が減少した。これらの結果から、酸化ストレスの存在下では、TFEBはオートファジー及びライソゾーム

関連遺伝子群の発現を上昇させ、早期老化に対する保護機能としての役割を果たすことが明らかとなった。

NaAsO₂ 曝露から 24 時間後の老化関連遺伝子に関しては、TFEB のノックダウンによって SASP 関連遺伝子の発現がさらなる増加を示したが、p21 の発現変化は見られなかった。前述のように、p21 は DNA 損傷応答によって発現誘導される因子であるが、TFEB のノックダウンによって p21 の遺伝子発現変化が起こらなかったことから、NaAsO₂ 曝露によって生じた DNA 損傷に対して TFEB は直接的な影響を及ぼさないことが推察された。一方で、SASP は DNA 損傷応答に非依存的な経路によっても誘導されることが知られている^{101,102}。また、SASP に関連する炎症性サイトカインである IL-6 の分泌はさらなる ROS を産生し、間接的に周囲の正常細胞に対して細胞老化を誘導することが報告されている¹⁰³。以上のことから、TFEB は NaAsO₂ 曝露による DNA 損傷に対する直接的な作用を示さないものの、それに引き続く SASP の誘導と副次的な ROS 産生による細胞老化の増強を抑制することが示唆された。

本研究の結果から、内耳培養細胞の早期老化に拮抗するメカニズムとして、オートファジーの誘導のみならず TFEB を介したライソゾームの生合成や酵素発現の調節が行われていることが明らかとなった。近年の報告では、糖尿病性腎症や高脂肪食による肥満モデルマウスにおいて、ROS を介したライソゾーム膜損傷や加水分解酵素の漏出が病態に関与し¹⁰⁴⁻¹⁰⁶、TFEB は損傷したライソゾームに対して選択的オートファジーによる除去と新たなライソゾーム生合成を行うことが知られている¹⁰⁶。本研究の早期老化モデルにおいては、ライソゾーム損傷に関する解析まで至らなかったものの、前述のような TFEB によるライソゾーム修復機構と早期老化の関連を明らかにすることは慢性感音難聴の新たな病態メカニズムの解明に繋がるものと考えられる。

これまで、加齢に伴う慢性疾患に対して、ラパマイシンによる組織のオートファジー誘導が病態を改善させることが示されている¹⁰⁷。加齢性難聴のモデルマウスに対しては、ラパマイシン投与が聴力低下を遅延させる報告が既にあり¹⁰⁸、本研究においてもラパマイシンは NaAsO₂ による内耳培養細胞の早期老化を抑制する効果を認めた。ラ

パマイシンは個体老化及び細胞老化に対して一定の抑制効果を示すが、その機序は mTORC1 を直接阻害することによるものであり、オートファジー誘導のみならず PI3K と Akt を介した細胞増殖調節¹⁰⁹、HIF-1 を介した血管新生作用¹¹⁰ といった異なる経路にも影響するため、生体にとっては負の側面もある。一方 TFEB においては、mTORC1 非依存的に TFEB を活性化する経路¹¹¹ や、TFEB に直接結合して転写活性を上昇させる生理活性物質が報告されているため¹¹²⁻¹¹⁴、オートファジーに対する選択性の高い治療法としての可能性を持つ。本研究の早期老化モデルでは、TFEB を介してオートファジー・ライソゾーム系が活性化されたが、その持続は一過性であったか、または活性が相対的に不十分であったため、処理されなかった余剰の ROS や、損傷ミトコンドリア由来のさらなる ROS 産生により細胞老化が誘導されたことが推察される。よって、TFEB を如何に持続的及び効果的に活性させるか、それによって余剰の ROS に対するクリアランスが起き、老化表現型がより強く抑制されるか、そして TFEB の持続的活性化により何らかの副反応が起きないかなどの検証がこれからの課題となる。TFEB を活性化させる化合物として、二糖類の一種である trehalose¹¹⁵ 及びイソチオシアネート化合物の sulforaphane¹¹⁶ が報告されている。trehalose はライソゾーム内 pH を上げることで緩徐にライソゾーム損傷を誘発し、sulforaphane は細胞内の ROS レベルを緩やかに上昇させることでいずれも TFEB を活性化し、結果的にオートファジー・ライソゾーム系を介した抗酸化作用を発揮することが知られている。これらは TFEB のストレス応答を利用したメカニズムであり、酸化ストレスからの内耳保護における新しいアプローチになると考えられる。今後は内耳細胞特異的な TFEB 欠損マウスや TFEB トランスジェニックマウスの作製、及び TFEB 活性化剤の探索を行い、本研究で得られた知見を基にした聴覚の解析を通じて、加齢性難聴の発症メカニズムの研究を継続していきたい。

第7章 結語

本研究では、内耳培養細胞における早期老化モデルにおいて、**TFEB**が**ROS**に応答した活性化を示し、細胞老化に対して拮抗する役割を持つことを明らかにした。これらの結果から、**TFEB**が加齢性難聴をはじめとする感音難聴の新たな治療標的となる可能性が見出された。

第8章 謝辞

本研究にあたり、終始熱心なご指導を頂いた日本大学医学部生体機能医学系生化学分野 榎島誠教授に謹んで御礼申し上げます。

日本大学医学部生体機能医学系生化学分野 兼任講師 林賢先生には、本研究の立案を始め、研究の方向性や遂行に関して数々の助言を頂き、学会発表や学位論文作成に際しては常に懇切丁寧なご指導を頂きました。ここに感謝の意を表します。

日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 野村泰之准教授には、研究資材の提供をはじめ多くのご支援を頂き、心より御礼申し上げます。

日本歯科大学生命歯学部外科学講座 櫻井健一教授には、大学院進学に際してご助力頂き、その後の研究活動においても度重なるご支援を頂き、厚く御礼申し上げます。

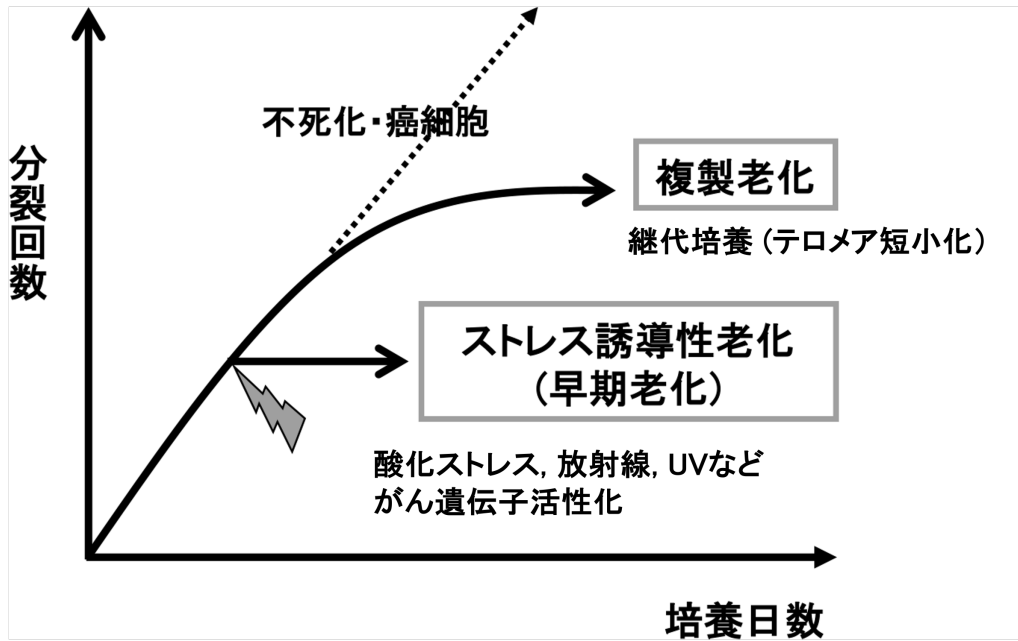
本研究を進めるにあたり、日本大学医学部生化学教室の先生方には、実験手技や結果の解析など基礎からご指導頂きました。また、研究室での日々の議論を通して多くの助言を頂き、深く感謝申し上げます。電子顕微鏡撮影、及び撮影用試料作成におきましては、日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門 地家豊治氏にご協力頂き、心より感謝申し上げます。

日本大学医学部外科学系乳腺内分泌外科学分野 医局員の先生方には、大学院進学と臨床診療の両立に際して常々ご協力を頂きましたことを改めて感謝申し上げます。同じく在学中の大学院生の先生方には、日頃から親身に接して頂き、研究活動において大きな支えとなりましたことを深謝致します。

最後に、本研究ならびに学業全般をこれまで支えてくれた家族、友人に心より感謝致します。

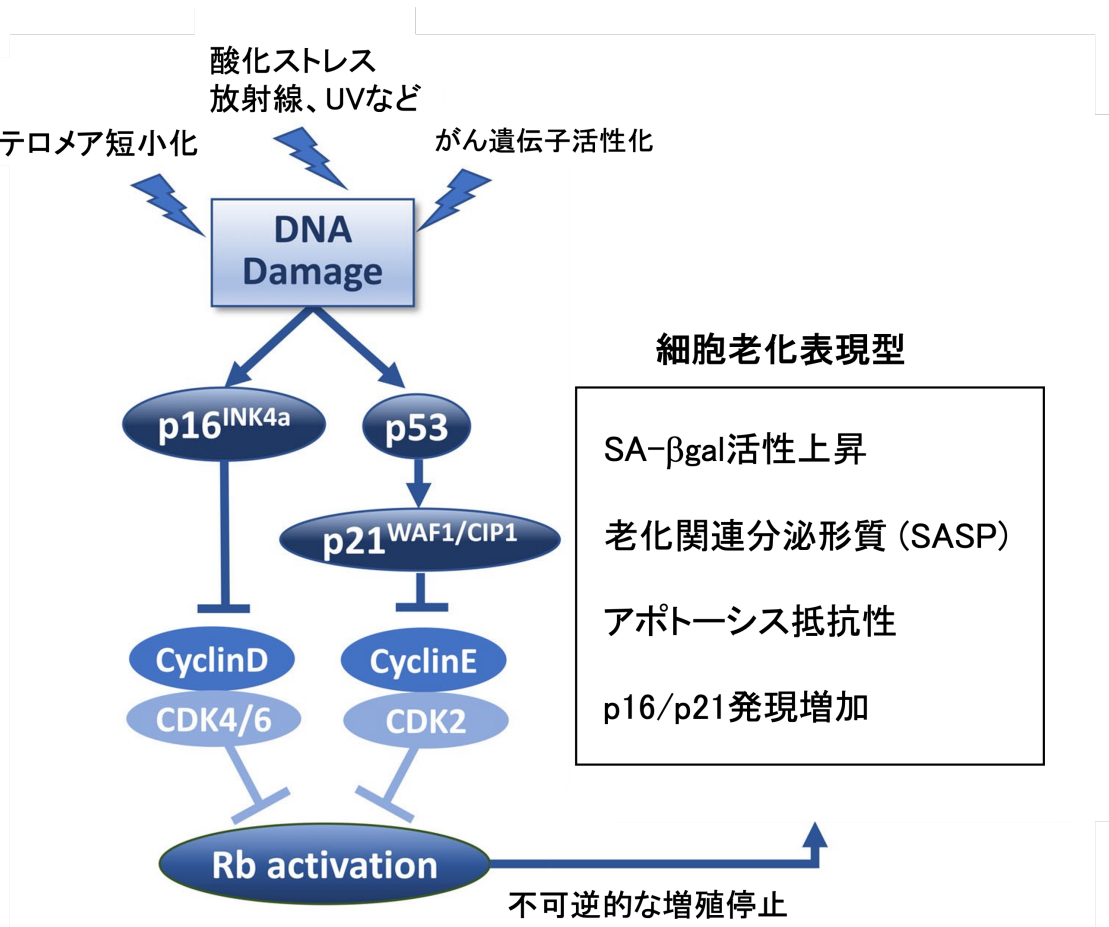
第9章 図

図 1a 複製老化と早期老化



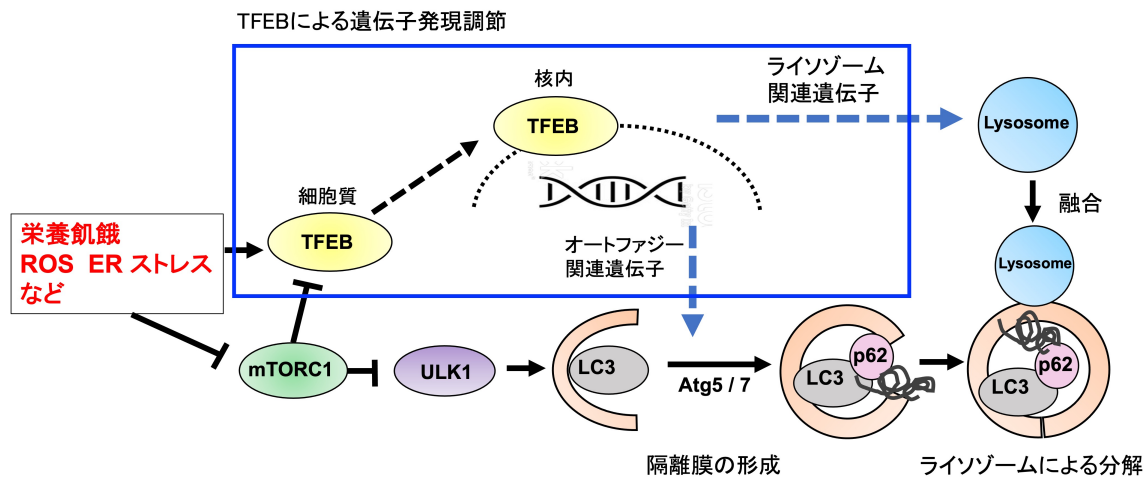
Serrano M et al, *Cell*. 1997;88(5):593-602 を元に改変

図 1b 細胞老化表現型



Misawa T et al, *Geriatr Gerontol Int.* 2020;20(6):539-546 を元に改変

図2 TFEBを介したオートファジー・ライソゾーム経路



Shen HM, Mizushima N. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(2):61-71 を元に改変

図 3

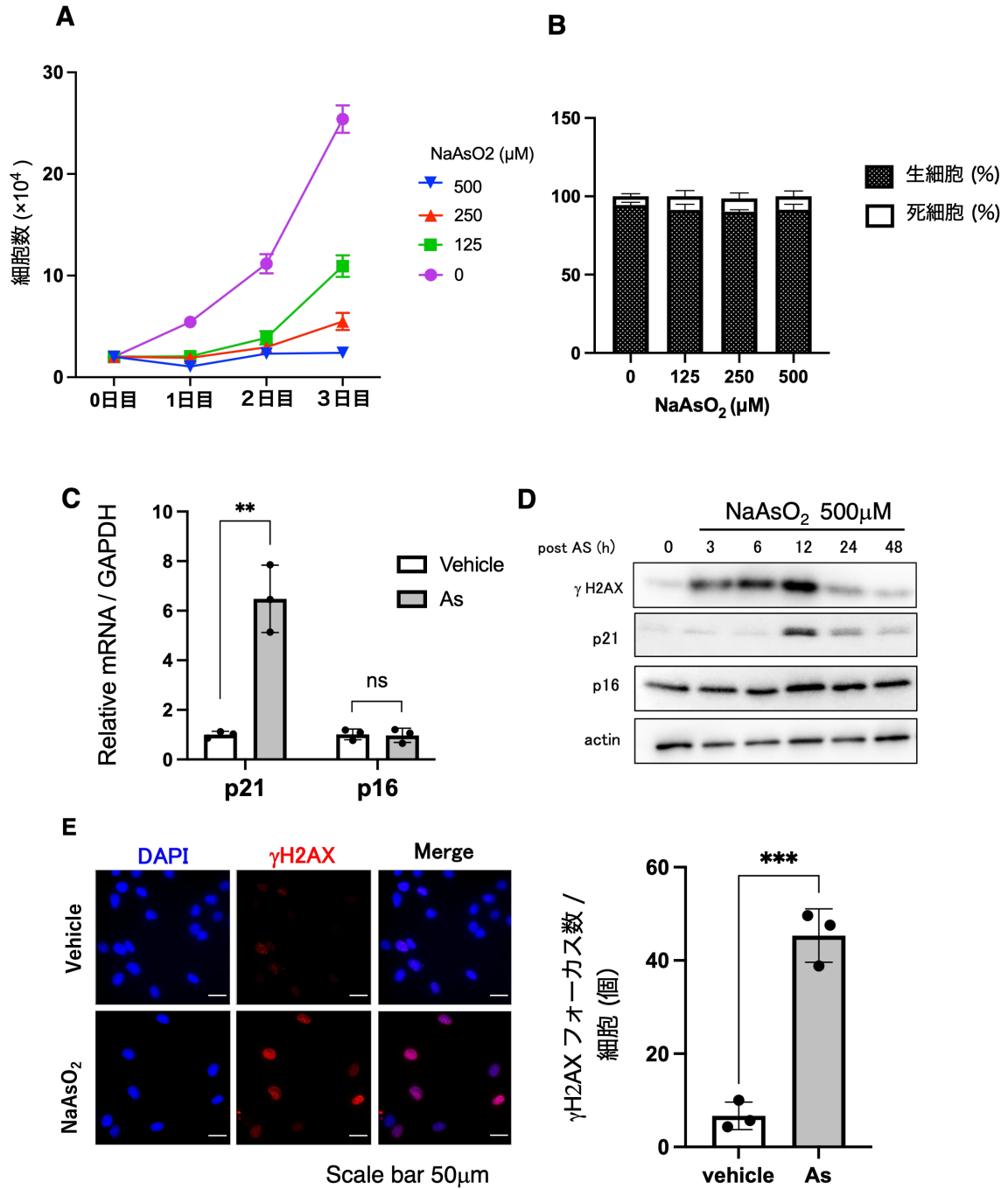


図3 (つづき)

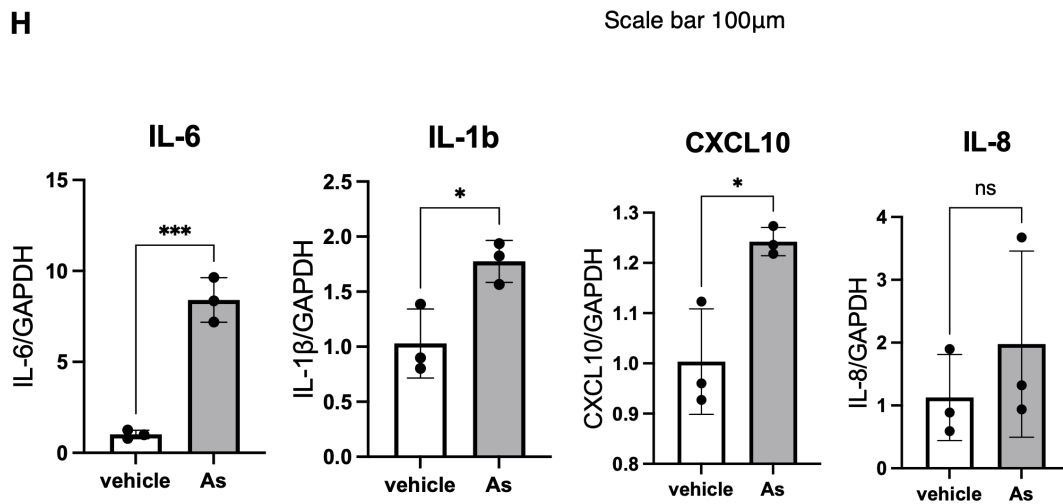
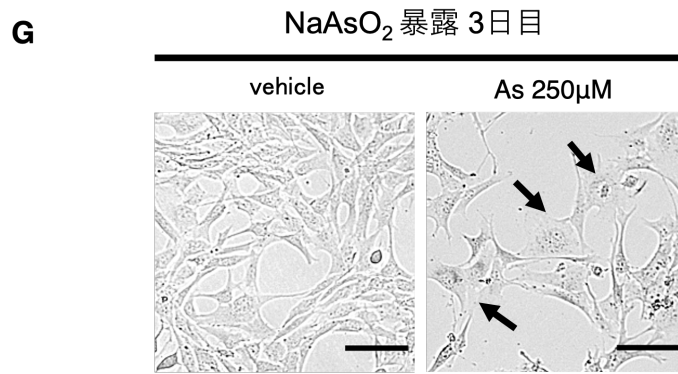
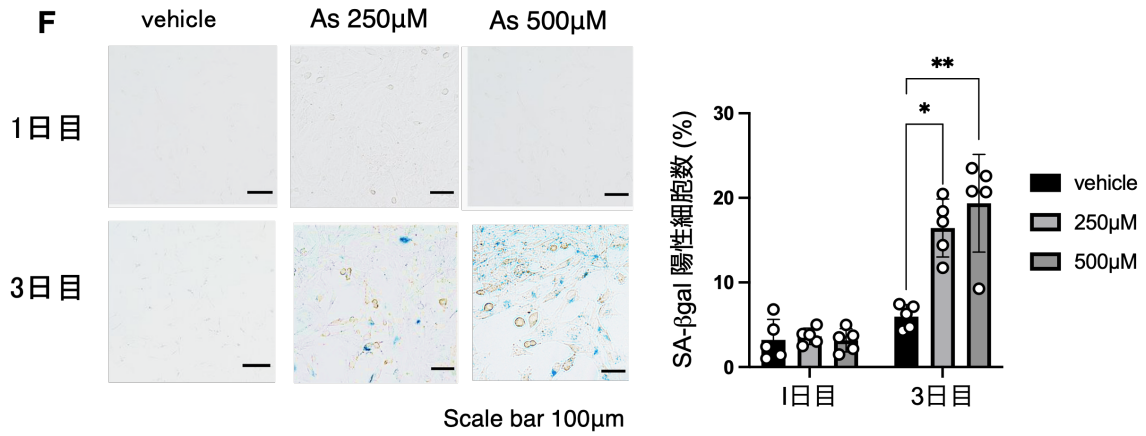


図4

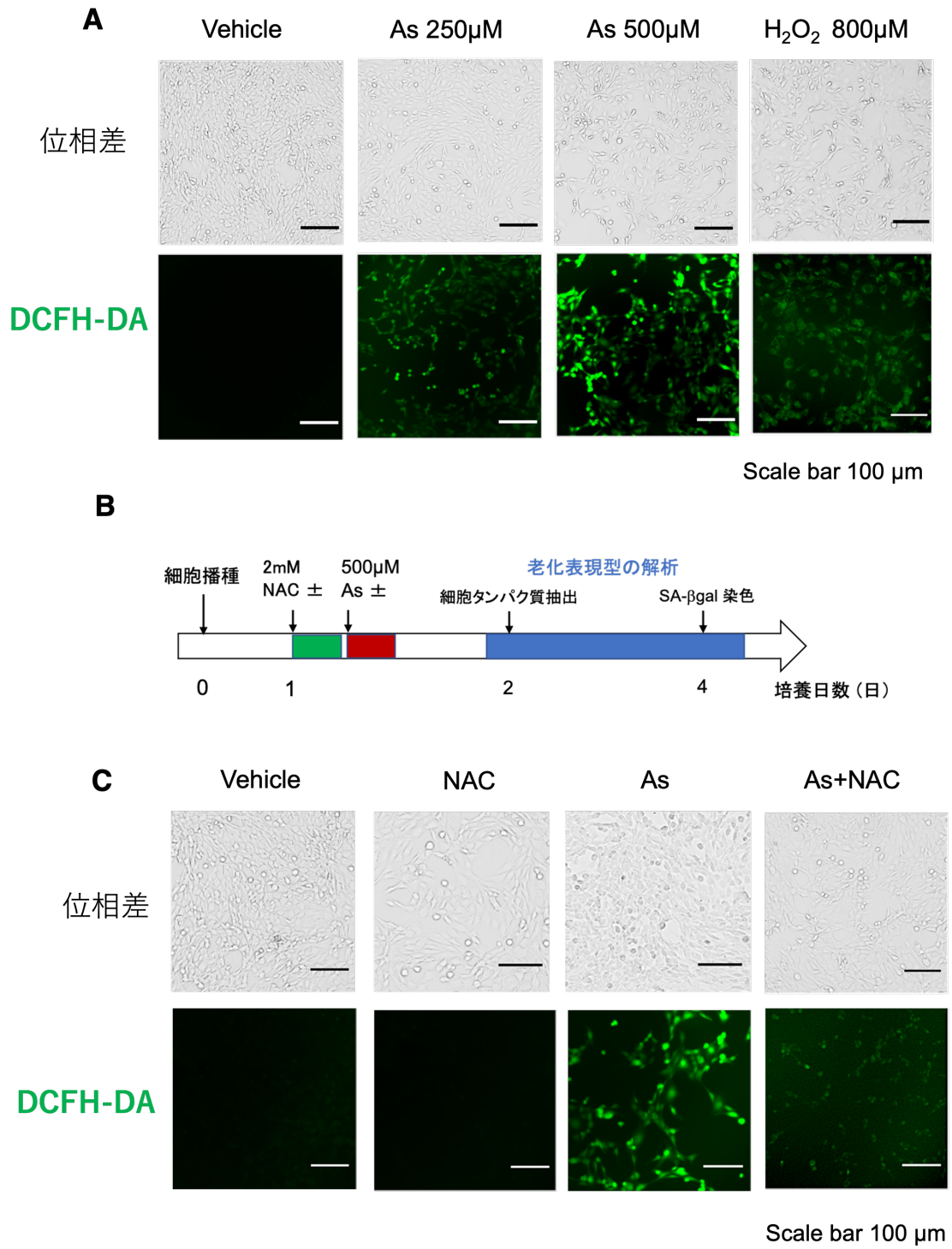


図4 (つづき)

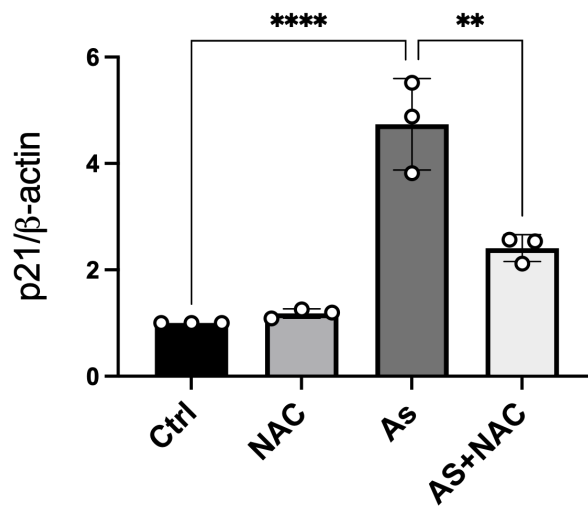
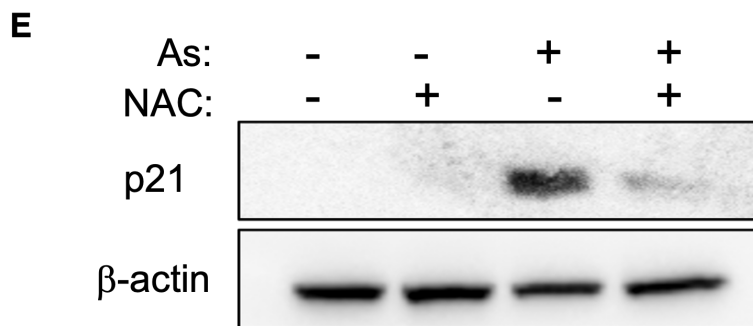
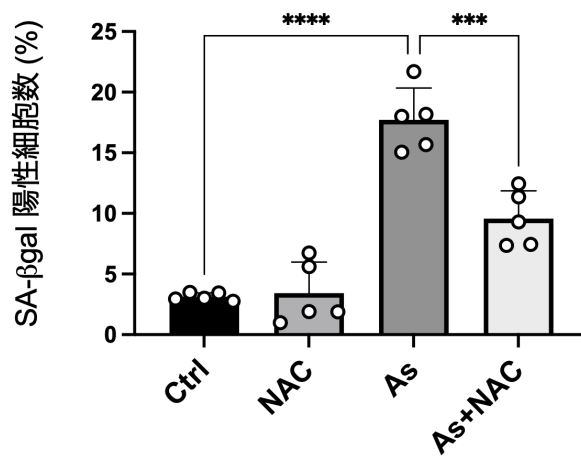
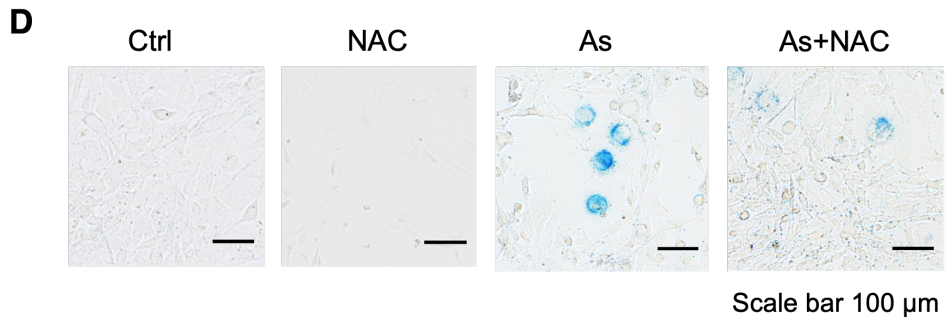


図5

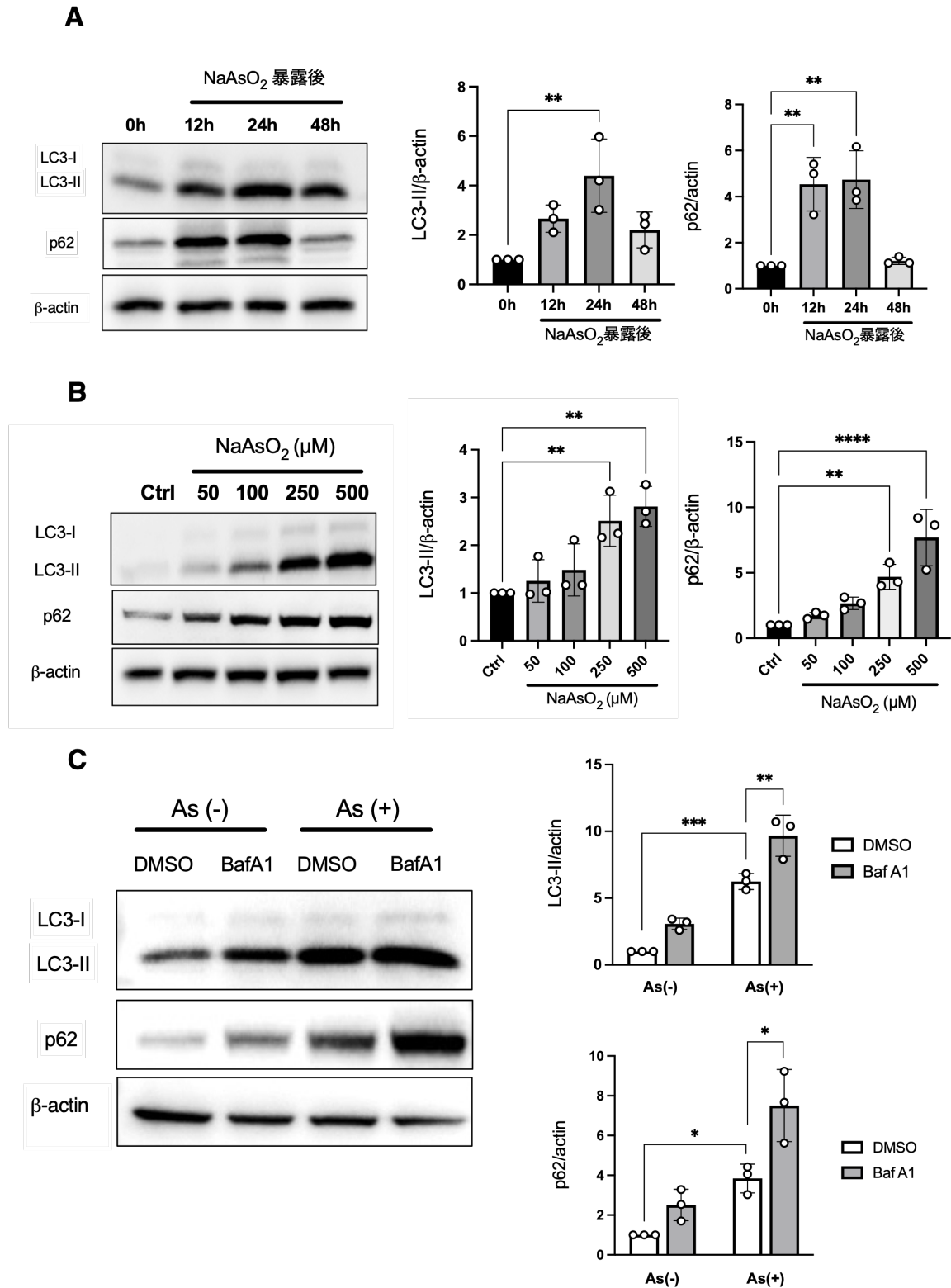
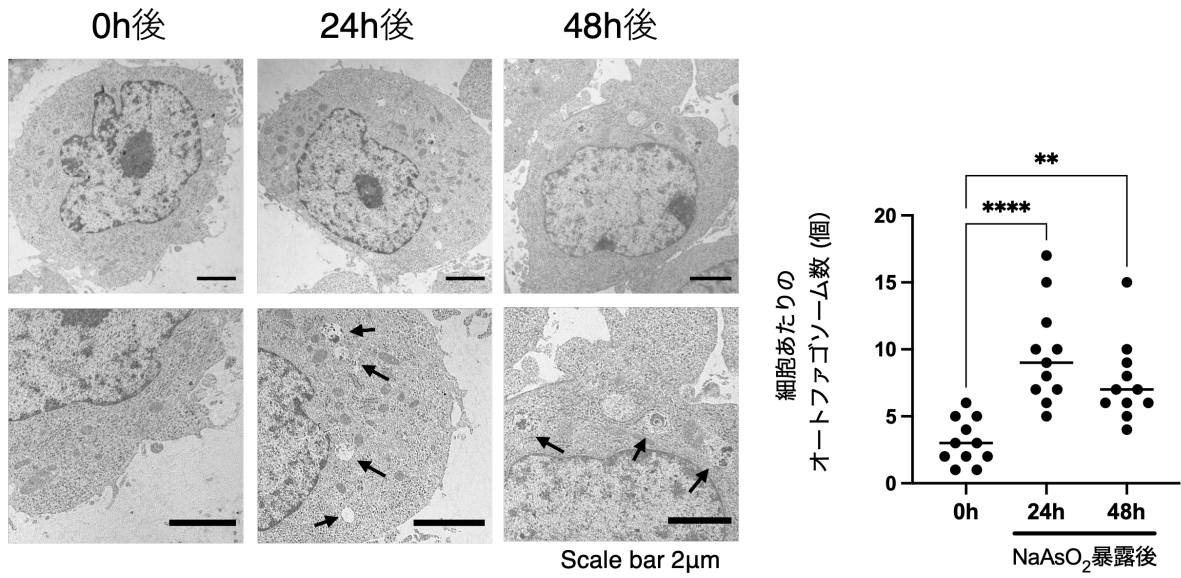
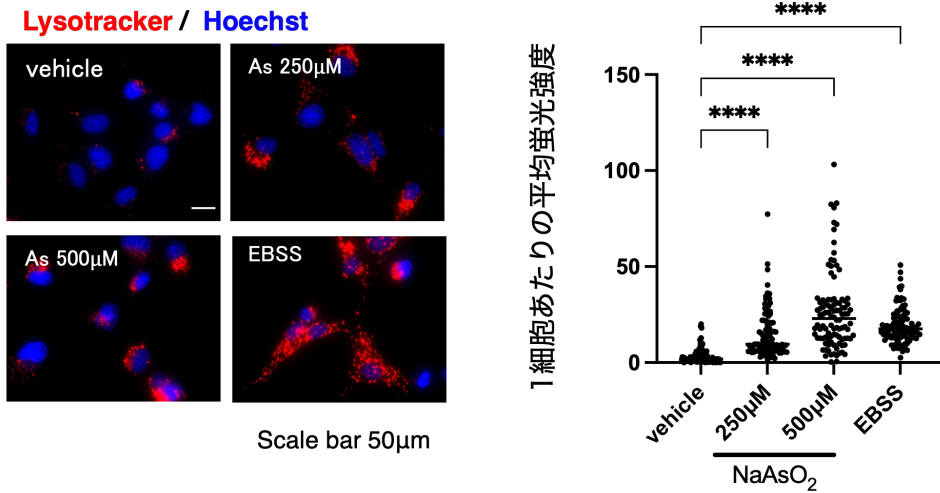


図5 つづき

D



E



F

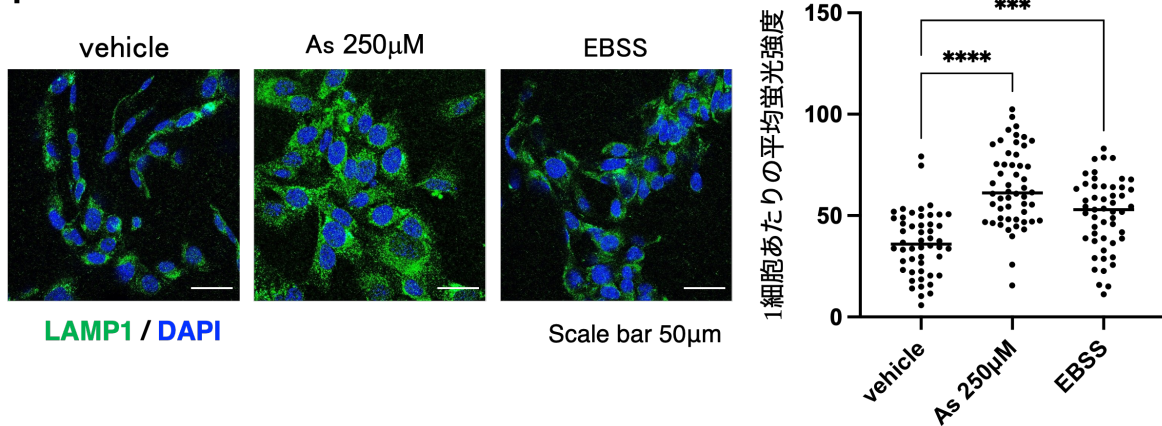


図6

A

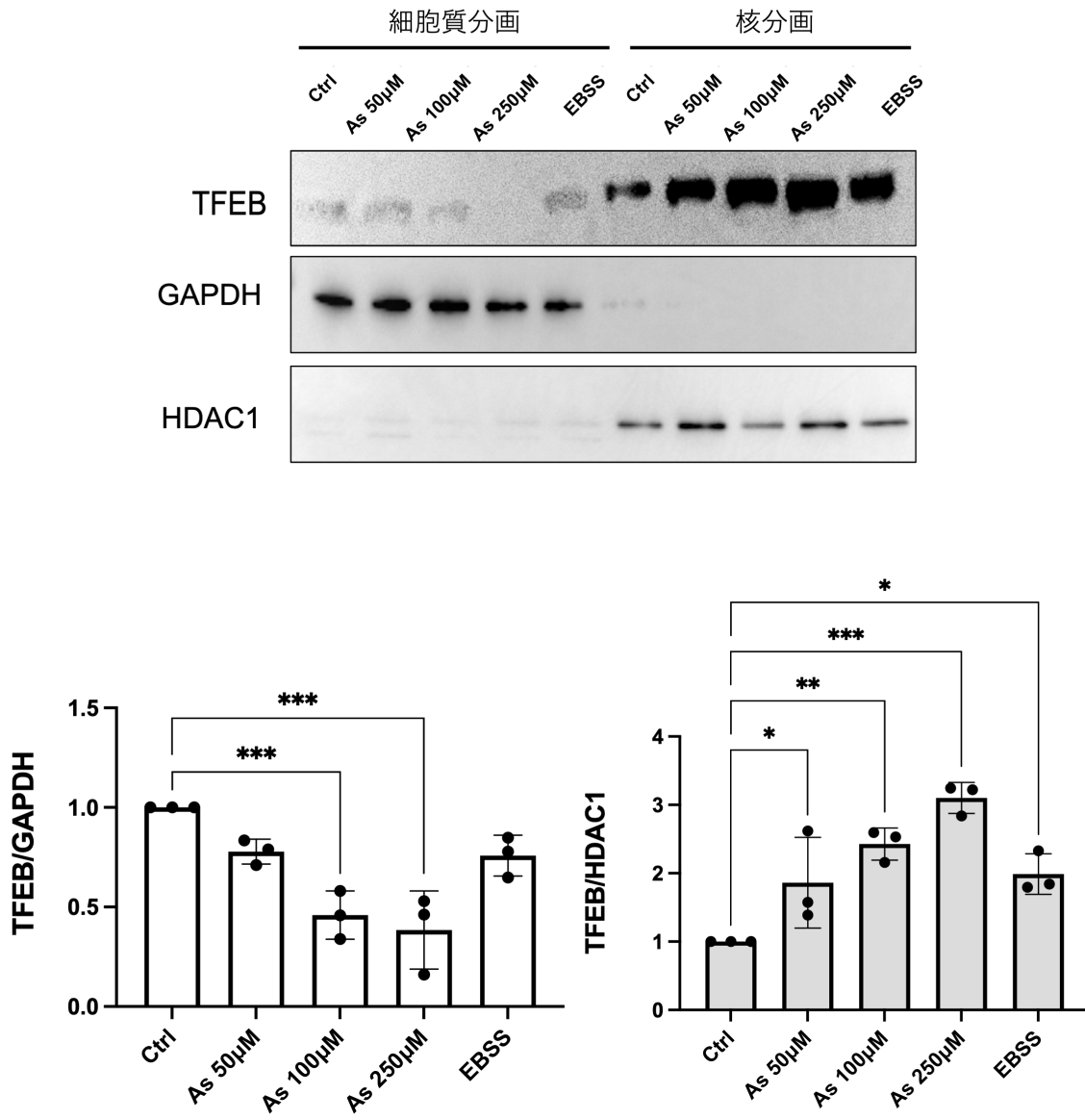
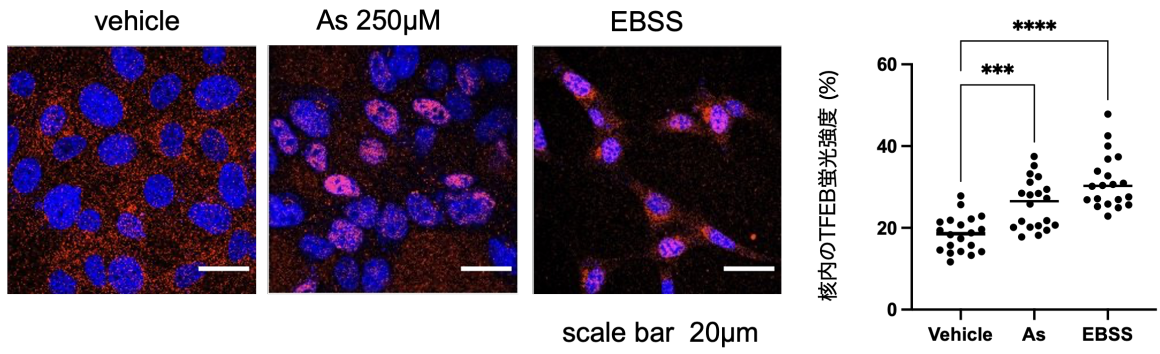
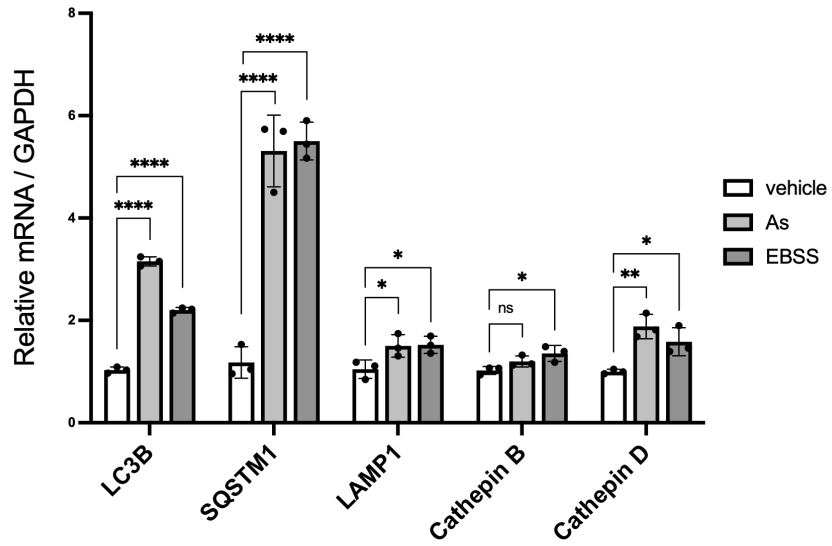


図6 (つづき)

B



C



D

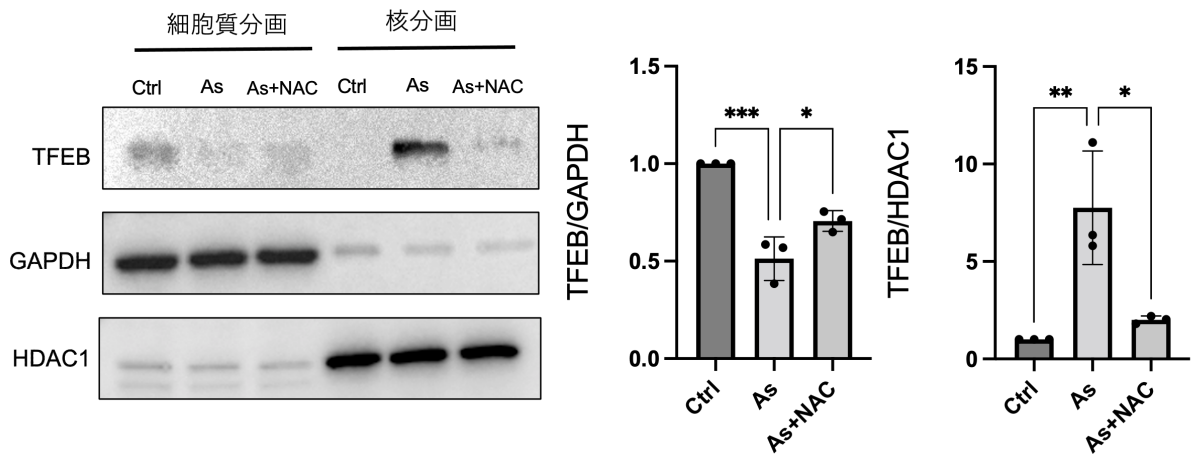


図6 (つづき)

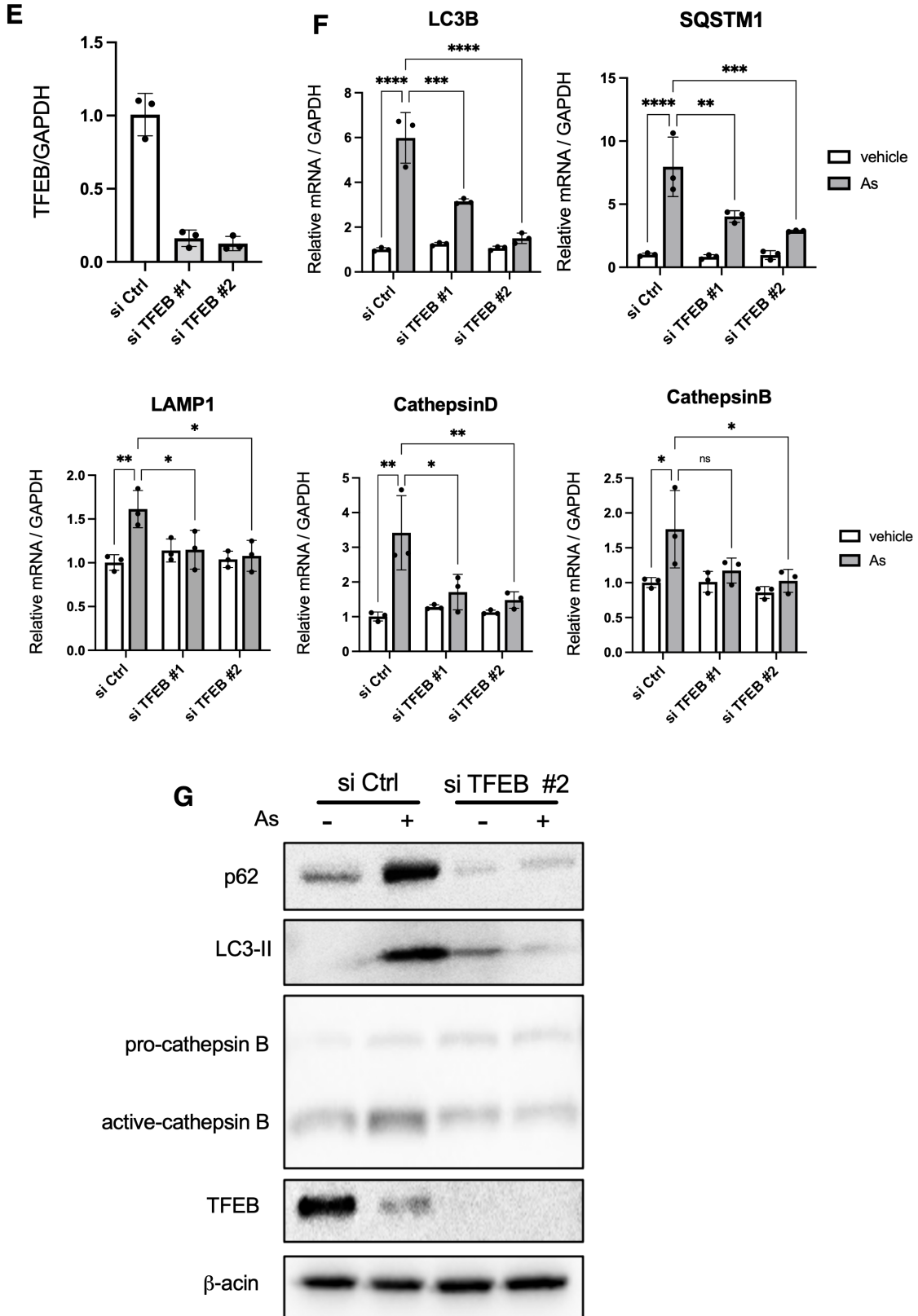


図7

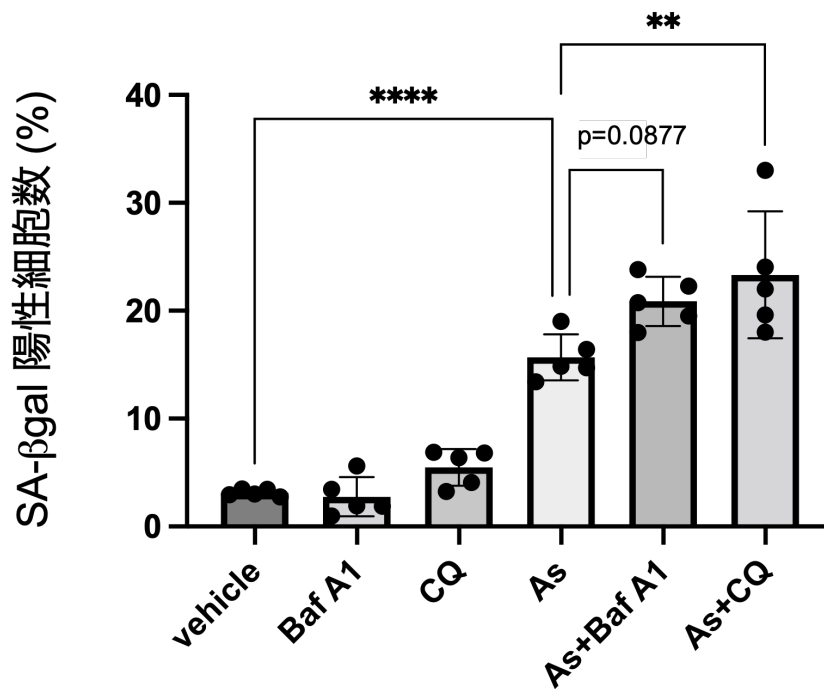
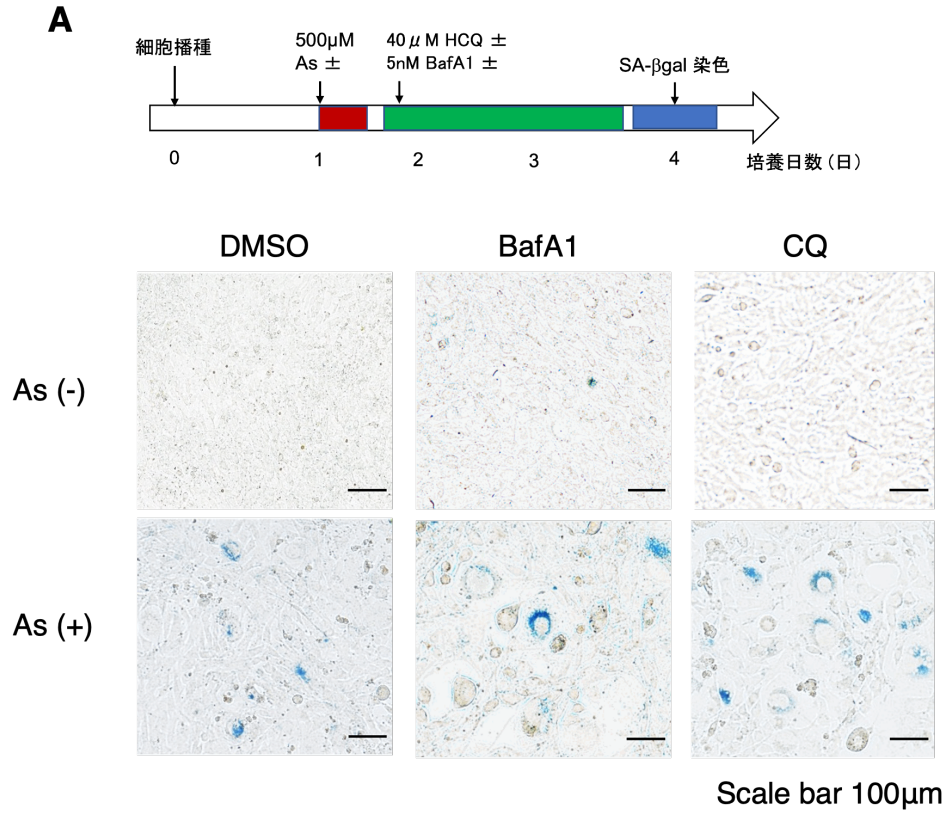


図7 (つづき)

B

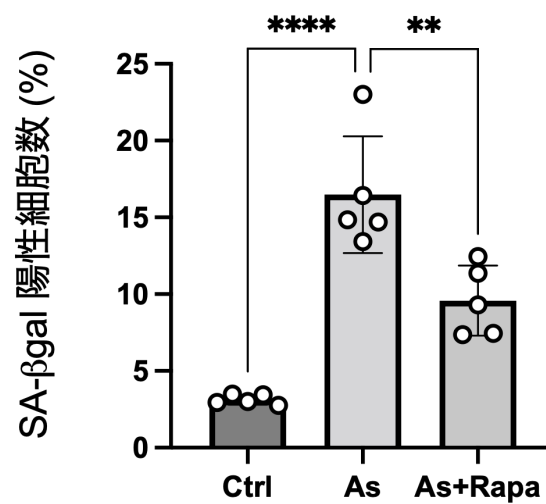
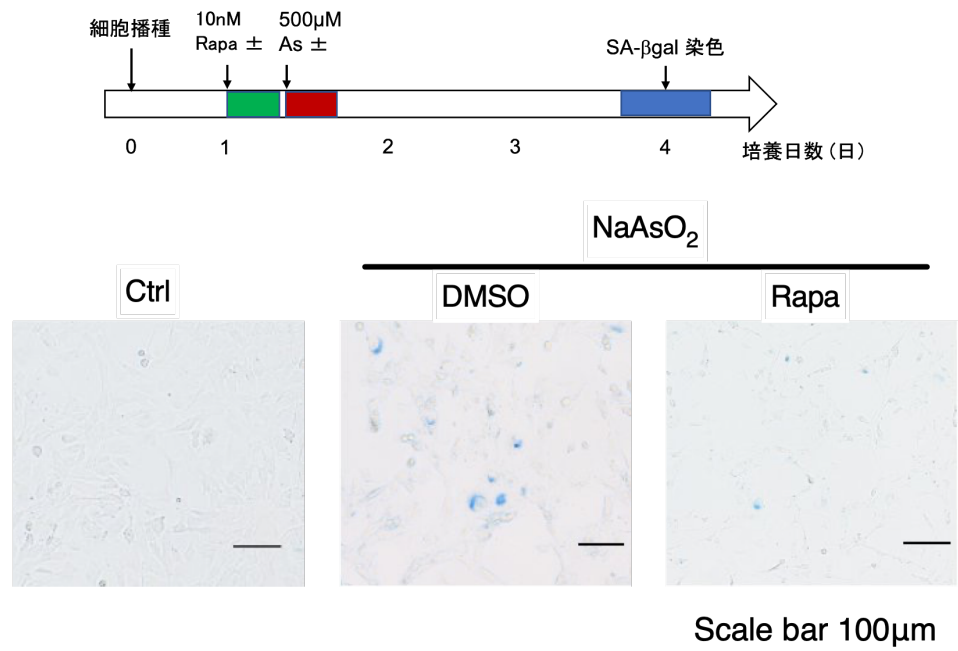
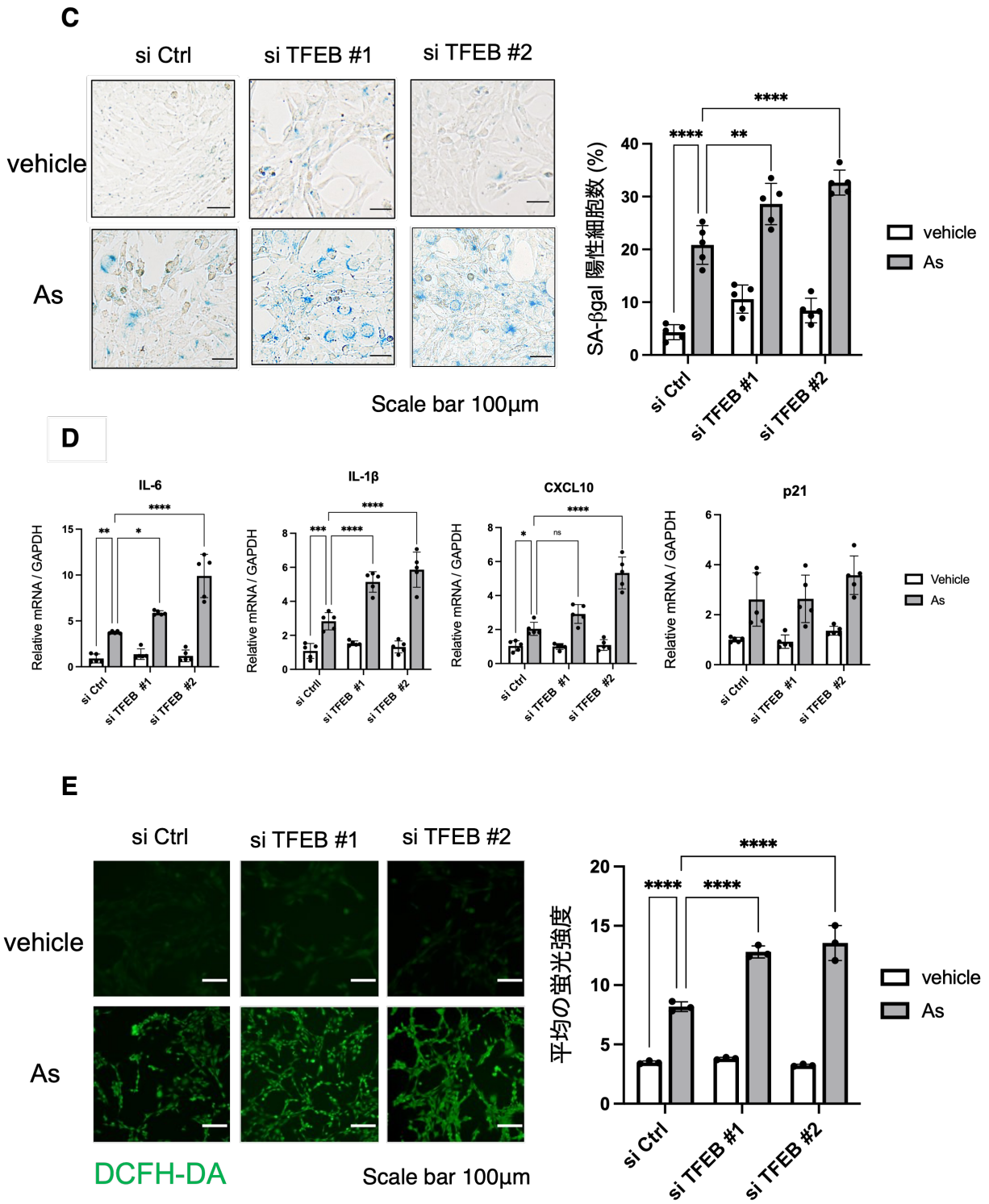


図7 (つづき)



第 10 章 図説

図 1a 複製老化と早期老化

細胞老化はテロメアの短小化による複製老化と、酸化ストレスや UV、紫外線照射、がん遺伝子活性化などの非致死性的ストレスによって速やかに誘導される早期老化に大別される。

図 1b 細胞老化表現型

複製老化と早期老化は、いずれも DNA 損傷応答により誘導されるという点で共通している。細胞周期阻害因子 p21 はサイクリン E/CDK2 複合体を阻害することで、また、p16 はサイクリン D/CDK4,6 を阻害することで Rb を低リン酸化状態にする。その結果、細胞周期の停止が起こり、細胞は不可逆的な増殖停止に至る。細胞老化においては、このほかに SA-βgal 活性の上昇、SASP、アポトーシス抵抗性などの表現型を示す。 -

図 2 TFEB を介したオートファジー・ライソゾーム経路

栄養飢餓や ROS、ER ストレスを発端とした mTORC1 の抑制と ULK1 の活性化により、Atg タンパク質（主に Atg5 と Atg7）をリン酸化することでオートファゴソームを形成する。オートファゴソームの膜タンパクとして LC3 が同定され、隔離膜の伸長に必須とされる。p62 は LC3 と結合し、ユビキチン化された特異的タンパク質や細胞小器官をオートファゴソームへ誘導したのちに分解を受ける。オートファゴソームは、細胞小器官を隔離した後にライソゾームと融合することでオートリソソームを形成し、加水分解酵素によって分解を行う。これらの一連の過程はオートファジー・ライソゾーム経路と呼ばれている。TFEB は、種々のストレスに応答し、mTOR 依存적もしくは非依存的に活性化され、オートファジー・ライソゾーム関連遺伝子群の発現を調節することで一連の分解機構に対して協調的に作用する。

図3 マウス内耳培養細胞 HEI-OC1 の NaAsO₂ による細胞老化表現型

A. NaAsO₂ 曝露による細胞増殖への影響を検討した。HEI-OC1 細胞を NaAsO₂ (0, 125, 250, 500 μ M) に 60 分間曝露させた後に、NaAsO₂ を含まない培養液に置換し、3 日間各日毎に細胞数を測定した。データは平均値 \pm 標準誤差で示した (1,2,3 日目の各条件において 0 μ M 対 NaAsO₂ 125,250, 500 μ M : ** p <0.01, Tukey test)。

B. NaAsO₂ 曝露による細胞生存率への影響を検討した。NaAsO₂ 曝露後から 3 日後の各濃度 (0, 125, 250, 500 μ M) における HEI-OC1 細胞の細胞生存率をトリパンブルー色素排除法により測定した。位相差顕微鏡観察下で青色のトリパンブルー色素を取り込んだ細胞を死細胞、取り込まなかった細胞を生細胞とし、全細胞数に対する色素陰性細胞数の割合を細胞生存率 (%) とした。

C-H NaAsO₂ 曝露下における老化表現型の評価。HEI-OC1 細胞を NaAsO₂ (500 μ M) に 60 分間曝露させたのち、通常培地に交換し、以下の評価を行った。C) NaAsO₂ 曝露 24 時間後の p16 及び p21 の発現量を RT-PCR により定量した。データは平均値 \pm 標準誤差で示した (** p <0.01, ns: not significant, Student's *t*-test) D) NaAsO₂ 曝露後の p16、p21、 γ H2AX のタンパク質量の時間変化。E) γ H2AX に対する免疫染色を行なった (左図, 赤)。核は DAPI 染色により標識した (左図, 青)。ImageJ を用いて細胞 1 個あたりの核内フォーカス数の平均を算出した。データは平均値 \pm 標準誤差で示した (** p <0.001, Student's *t*-test)。

F) NaAsO₂ 曝露後 1 日目と 3 日目において SA- β ガラクトシダーゼ染色を行なった。代表的な顕微鏡画像を左図に示す。青色に呈色した細胞を陽性として全細胞数に対する陽性細胞数の割合を陽性率 (%) とした。各条件下において合計 200 個以上の細胞を解析し、データは平均値 \pm 標準誤差で示した (* p <0.05, ** p <0.01, Tukey test)。

G) NaAsO₂ 曝露後 3 日目の位相差顕微鏡像。代表的な写真を示す。黒矢印は特徴的な形態変化を示す。H) SASP 関連遺伝子の mRNA 発現量。SASP 関連遺伝子として IL-6、IL-1 β 、CXCL10、IL-8 の mRNA 発現量を RT-PCR により定量した。データは平均値 \pm 標準誤差で示した (* p <0.05, *** p <0.001, ns: not significant, Student's *t*-test)。

図4 マウス内耳培養細胞における酸化ストレス誘導早期老化

A. HEI-OC1 細胞における NaAsO₂ 処理後の細胞内 ROS 産生。HEI-OC1 細胞に対し、図に表示された濃度の NaAsO₂(As) に 60 分間曝露させ、3 日間培養したのち DCFH-DA により細胞内 ROS (緑)の検出を行なった。800μM の過酸化水素を 60 分間処理した HEI-OC1 細胞を陽性コントロールとした。写真は代表的な位相差画像 (上) 及び DCFA-DA 染色像 (下) を示す。

B. HEI-OC1 細胞における老化表現型解析の実験手順を示す。C-E で用いた細胞は全て本実験手順にて作成した。

C. HEI-OC1 細胞における NaAsO₂(As)誘導性 ROS 産生に対する NAC の効果。DCFH-DA を用いて細胞内 ROS を可視化した。写真は代表的な位相差像 (上) 及び DCFA-DA 染色像 (下) を示す。

D. NaAsO₂(As) 曝露後の SA-βgal 活性に対する NAC の効果。グラフは全細胞数に対する陽性細胞数の割合を陽性率 (%) として示す。各条件下で 200 個以上の細胞を解析に使用し、データは平均値±標準誤差で示した (**p < 0.001, ****p < 0.0001, Tukey test) 。

E. NaAsO₂(As) 曝露後の p21 発現に対する NAC の効果。p21 のタンパク質量をウェスタンブロットにより検出した。写真は代表的な検出像、グラフは定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (**p < 0.01, ****p < 0.0001, Tukey test) 。

図5 マウス内耳培養細胞におけるNaAsO₂曝露によるオートファジー・ライソゾーム系の活性化

A. NaAsO₂ 曝露後の LC3-I/II及び p62 タンパク質量の時間変化。

HEI-OC1 細胞に NaAsO₂ (500μM) を 60 分間曝露させ、図に示した時間で培養後、LC3-I/II及び p62 タンパク質の発現量をウェスタンブロットにより解析した。写真は各タンパク質の代表的な検出像、グラフは各タンパク質の定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (**p < 0.01, Tukey test) 。

B. LC3-I/II及び p62 タンパク質量の NaAsO₂ 濃度依存的変化。HEI-OC1 細胞に NaAsO₂ を図に示した濃度で 60 分間曝露し、24 時間培養後の LC3-I/II及び p62 タンパク質量をウェスタンブロットにより解析した。

写真は各タンパク質の代表的な検出像、グラフは各タンパクの定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (**p<0.01, ****p<0.0001, Tukey test)。

C. NaAsO₂ 曝露後の BafA1 によるオートファジーフラックス評価。HEI-OC1 細胞に NaAsO₂ (500μM, 60 分間) を曝露後 24 時間培養し、次に DMSO もしくは BafA1 を 100 nM になるように添加後、さらに 3 時間培養した)。LC3I/II 及び p62 タンパク質の発現量をウェスタンブロットにより解析した。写真は各タンパク質の代表的な検出像、グラフは各タンパクの定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns: not significant, Tukey test)。

D. NaAsO₂ 曝露後の HEI-OC1 細胞における電子顕微鏡像。HEI-OC1 細胞に NaAsO₂ (500μM, 60 分間) を曝露後、図に示した時間で培養後に電子顕微鏡で形態観察を行なった。写真は代表的な電子顕微鏡像を示し、黒矢印は特徴的なオートファゴソーム像を示す。グラフは各条件 10 個の細胞におけるオートファゴソーム数の定量値を表す。

E. NaAsO₂ 曝露後のライソゾーム活性の評価。HEI-OC1 細胞に NaAsO₂ を図に示した濃度で 60 分間曝露し、24 時間培養後にライソゾーム由来の蛍光 (赤) を LysoTracker Red DND-99 により検出した。EBSS で 3 時間培養した HEI-OC1 細胞を陽性コントロールとした。写真は代表的な LysoTracker Red DND-99 の染色像を示す。蛍光顕微鏡下で得た画像に対して、ImageJ で各条件 100 個の細胞について平均蛍光強度を定量した (右図)。データは平均値±標準誤差で示した (****p<0.0001, Tukey test)。

F. NaAsO₂ 曝露後のライソゾーム生合成の評価。HEI-OC1 細胞に NaAsO₂ (250μM) を 60 分間曝露後 24 時間培養し、LAMP1 特異的抗体により免疫染色を行なった (左図, 緑)。核は DAPI 染色で標識した (左図, 青)。蛍光顕微鏡下で得た画像に対して、ImageJ で各条件 50 個の細胞について平均蛍光強度を定量した (右図)。データは平均値±標準誤差で示した (***p<0.001, ****p<0.0001, Tukey test)。

図 6 マウス内耳培養細胞における ROS 依存性 TFEB 活性化及びオートファジー・ライソゾーム経路への関与

A. NaAsO₂ 曝露による TFEB タンパク質の局在変化。HEI-OC1 細胞を図に示された濃度の NaAsO₂ 及び EBSS に 60 分間曝露させた後に通常培地で 3 時間培養し、そこから細胞質と核に分画したタンパク質を抽出した。各分画における TFEB のタンパク質発現量をウェスタンブロットにより検出し、それぞれのバンド濃度を GAPDH のバンド濃度で標準化した値を細胞質分画における各タンパク質の定量値、HDAC1 バンド濃度で標準化した値を核分画における各タンパク質の定量値とした。写真は各タンパク質の代表的な検出像、グラフは TFEB のタンパク質の各分画における定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (**p<0.01, ****p<0.0001, Tukey test)。

B. NaAsO₂ 曝露後の TFEB の細胞内局在。HEI-OC1 細胞を NaAsO₂ (250μM) 及び EBSS に 60 分曝露させた後に通常培地で 3 時間培養し、TFEB に対する蛍光免疫染色を行った。写真は代表的な蛍光顕微鏡画像を示し、グラフは各条件下で 30 個の細胞に対し、細胞全体の蛍光強度に対する核内の蛍光強度比 (%) を示した。画像解析には ImageJ を用い、データは平均値±標準誤差で示した (***p<0.001, ****p<0.0001, Tukey test)。

C. NaAsO₂ 曝露後の HEI-OC1 細胞におけるオートファジー・ライソゾーム関連遺伝子の発現量。HEI-OC1 細胞を NaAsO₂ (250μM) 及び EBSS に 60 分曝露させた後に通常培地で 3 時間培養し、オートファジー・ライソゾーム関連遺伝子の発現量を RT-PCR により解析した。データは平均値±標準誤差で示した (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns: not significant, Tukey test)。

D. NaAsO₂ 曝露による TFEB 核移行に対する NAC の影響。HEI-OC1 細胞に 2mM の NAC を 60 分間前処理した後、NaAsO₂ (250μM) に 60 分間曝露し、通常培地で 3 時間培養したのち、細胞質と核に分画したタンパク質を抽出した。各分画における TFEB のタンパク質発現量をウェスタンブロットにより解析した。各分画の TFEB タンパク量は A と同じ方法で標準化した。写真は各タンパク質の代表的な検出像、グ

ラフは TFEB タンパク量の各画分における定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey test) 。 E-F. NaAsO₂ 曝露後のオートファジー・ライソゾーム遺伝子発現における TFEB KD の影響。コントロール siRNA (siCtrl) あるいは 2 つの異なる TFEB siRNA (siTFEB #1 もしくは siTFEB #2) をトランスフェクションし、E) 48 時間後に HEI-OC1 細胞における TFEB の発現量を RT-PCR にて解析した。F) 48 時間後に NaAsO₂ (250 μ M) を 60 分間曝露し、通常培地で 3 時間培養後にオートファジー・リソゾーム関連遺伝子発現量を RT-PCR にて解析した。データは平均値±標準誤差で示した。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns : not significant, Tukey test) 。

G. NaAsO₂ 曝露後のオートファジー・ライソゾーム関連タンパク質における TFEB KD の影響。siCtrl あるいは siTFEB#2 を HEI-OC1 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に NaAsO₂ (250 μ M) を 60 分間曝露し、通常培地で 24 時間培養後にウェスタンブロットにより LC3-I/II、p62、前駆型 CathepsinB (pro-CathepsinB) 及び活性型 CathepsinB (active-CathepsinB) のタンパク質を検出した。写真は代表的な検出像を示す。

図 7 内耳培養細胞の酸化ストレス誘導性老化表現型における TFEB KD の影響

A. NaAsO₂ 曝露後 SA- β gal 陽性細胞に対する CQ 及び BafA1 の影響。HEI-OC1 細胞に NaAsO₂ (500 μ M, 60 分間) を曝露させ、24 時間後に CQ (40 μ M) 及び BafA1 (5nM) を含む培地に置換し、3 日間培養後に SA- β gal 染色を行った (上図)。各条件下で 200 個以上の細胞を解析に使用し、全細胞数に対する陽性細胞数の割合を陽性率 (%) として示した。写真は代表的な染色像、グラフは SA- β gal 染色の定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, Tukey test) 。

B. NaAsO₂ 曝露後 SA- β gal 陽性細胞に対するラパマイシンの影響。HEI-OC1 細胞をラパマイシン (10nM) を含む培地で 1 時間培養し、次いで NaAsO₂ (500 μ M) を 60 分間曝露させた。3 日間培養後に SA- β gal 染色

を行った（上図）。各条件下で 200 個以上の細胞を解析に使用し、全細胞数に対する陽性細胞数の割合を陽性率 (%) として示した。写真は代表的な染色像、グラフは SA-βgal 染色の定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (**p <0.01, ****p<0.0001, Tukey test)。

C-E. NaAsO₂ 曝露後の SA-βgal 陽性細胞 (C)、SASP 関連遺伝子及び p21 遺伝子発現 (D)、細胞内 ROS (E) に対する TFEB KD の影響。コントロール siRNA (siCtrl) あるいは 2 つの異なる TFEB siRNA (siTFEB #1 もしくは siTFEB #2) を HEI-OC1 細胞に 48 時間トランスフェクションした。C) NaAsO₂ (250μM) を 60 分間曝露させ、通常培地で 3 日間培養後に SA-βgal 染色を行った。各条件下で 200 個以上の細胞を解析に使用し、全細胞数に対する陽性細胞数の割合を陽性率 (%) として示した。写真は代表的な染色像、グラフは SA-βgal 染色の定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (**p <0.01, ****p<0.0001, Tukey test)。D) NaAsO₂ (250μM) を 60 分間曝露させ、通常培地で 24 時間培養後に RT-PCR により SASP 関連遺伝子及び p21 遺伝子発現を定量した。グラフは各遺伝子発現の定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (*p<0.05, **p <0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, Tukey test)。E) NaAsO₂ (250μM) を 60 分間曝露させ、通常培地で 3 日間培養後に DCFH-DA 染色を行った。各条件でランダムに選択した 5 視野における DCFH-DA の蛍光強度の平均値を蛍光強度とした。左図は代表的な蛍光顕微鏡画像を、右図のグラフは蛍光強度の定量値を表し、データは平均値±標準誤差で示した (****p<0.0001, Tukey test)。

第 11 章 引用文献

1. Divenyi, P. L., Stark, P. B. & Haupt, K. M. Decline of speech understanding and auditory thresholds in the elderly. *J. Acoust. Soc. Am.* **118**, 1089–1100 (2005).
2. Robert Frisina, D. & Frisina, R. D. Speech recognition in noise and presbycusis: Relations to possible neural mechanisms. *Hear. Res.* **106**, 95–104 (1997).
3. Gates, G. A. *et al.* Central auditory dysfunction, cognitive dysfunction, and dementia in older people. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **122**, 161–167 (1996).
4. Livingston, G. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet* **390**, 2673–2734 (2017).
5. Lin, F. R. *et al.* Hearing Loss and Cognition in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neuropsychology* **25**, 763–770 (2011).
6. Bigelow, R. T. *et al.* Association of Hearing Loss with Psychological Distress and Utilization of Mental Health Services among Adults in the United States. *JAMA Netw. Open* **3**, 1–12 (2020).
7. Kim, S. Y., Min, C., Lee, C. H., Park, B. & Choi, H. G. Bidirectional relation between depression and sudden sensorineural hearing loss: Two longitudinal follow-up studies using a national sample cohort. *Sci. Rep.* **10**, 1–8 (2020).
8. Carabellese, C. *et al.* Sensory Impairment and Quality of Life in a Community Elderly Population. *J. Am. Geriatr. Soc.* **41**, 401–407 (1993).

9. 内田 育恵, 杉浦 彩子, 中島 務, 安藤富士子下方 浩史. 全国高齢難聴者数推計と 10 年後の年齢別難聴発症率. *日老医誌* **49**, 222—227 (2012).
10. Fetoni, A. R., Picciotti, P. M., Paludetti, G. & Troiani, D. Pathogenesis of presbycusis in animal models: A review. *Exp. Gerontol.* **46**, 413–425 (2011).
11. Bulğurcu, S., Uçak, I., Yöner, A., Erkul, E. & Çekin, E. Hearing Aid Problems in Elderly Populations. *Ear, Nose Throat J.* **99**, 323–326 (2020).
12. Demeester, K. *et al.* Heritability of audiometric shape parameters and familial aggregation of presbycusis in an elderly Flemish population. *Hear. Res.* **265**, 1–10 (2010).
13. Hendrickx, J. J. *et al.* Familial aggregation of pure tone hearing thresholds in an aging European population. *Otol. Neurotol.* **34**, 838–844 (2013).
14. Kvestad, E., Czajkowski, N., Krog, N. H., Engdahl, B. & Tambs, K. Heritability of hearing loss. *Epidemiology* **23**, 328–331 (2012).
15. Gates, G. A., Cobb, J. L., D’agostino, R. B. & Wolf, P. A. The Relation of Hearing in the Elderly to the Presence of Cardiovascular Disease and Cardiovascular Risk Factors. *Arch. Otolaryngol. Neck Surg.* **119**, 156–161 (1993).
16. Yamasoba, T. *et al.* Current concepts in age-related hearing loss: Epidemiology and mechanistic pathways. *Hear. Res.* **303**, 30–38 (2013).

17. Cruickshanks, K. J. *et al.* Cigarette smoking and hearing loss: The epidemiology of hearing loss study. *J. Am. Med. Assoc.* **279**, 1715–1719 (1998).
18. Dalton, D. S., Cruickshanks, K. J., Klein, R., Klein, B. E. K. & Wiley, T. L. Association of NIDDM and hearing loss. *Diabetes Care* **21**, 1540–1544 (1998).
19. Fetoni, A. R. *et al.* Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: Cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense. *J. Neurosci.* **33**, 4011–4023 (2013).
20. Keithley, E. M. *et al.* Cu/Zn superoxide dismutase and age-related hearing loss. *Hear. Res.* **209**, 76–85 (2005).
21. McFadden, S. L., Ding, D., Reaume, A. G., Flood, D. G. & Salvi, R. J. Age-related cochlear hair cell loss is enhanced in mice lacking copper/zinc superoxide dismutase. *Neurobiol. Aging* **20**, 1–8 (1999).
22. Jang, J. Y., Blum, A., Liu, J. & Finkel, T. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **128**, 3662–3670 (2018).
23. Park, C. B. & Larsson, N. G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* **193**, 809–818 (2011).
24. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
25. Karlseder, J., Smogorzewska, A. & De Lange, T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science (80-.)*. **295**, 2446–2449 (2002).

26. Yu, G. L., Bradley, J. D., Attardi, L. D. & Blackburn, E. H. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* **344**, 126–132 (1990).
27. Celeste, A. *et al.* Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science (80-.)*. **296**, 922–927 (2002).
28. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol. Cell* **14**, 501–513 (2004).
29. Bandyopadhyay, D. *et al.* The human melanocyte: A model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells. *Exp. Gerontol.* **36**, 1265–1275 (2001).
30. Bodnar, A. G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (80-.)*. **279**, 349–352 (1998).
31. Campisi, J. & D’Adda Di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
32. Chen, Q. & Ames, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4130–4134 (1994).
33. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 2540–2551 (1994).

34. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* **88**, 593–602 (1997).
35. Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–195 (2006).
36. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–9367 (1995).
37. Coppé, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* **6**, 20894 (2008).
38. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **5**, 99–118 (2010).
39. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1139–1153 (2014).
40. Yosef, R. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* **7**, 20894 (2016).
41. Di Mitri, D. & Alimonti, A. Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends Cell Biol.* **26**, 215–226 (2016).
42. Faget, D. V., Ren, Q. & Stewart, S. A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 439–453 (2019).

43. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* **134**, 657–667 (2008).
44. von Bartheld, C. S., Bahney, J. & Herculano-Houzel, S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* **524**, 3865–3895 (2016).
45. Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–236 (2011).
46. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
47. Rubinsztein, D. C., Shpilka, T. & Elazar, Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr. Biol.* **22**, 20894 (2012).
48. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 124–131 (2010).
49. Fujimoto, C. *et al.* Autophagy is essential for hearing in mice. *Cell Death Dis.* **8**, 23–25 (2017).
50. Zhou, H. *et al.* Disruption of Atg7-dependent autophagy causes electromotility disturbances, outer hair cell loss, and deafness in mice. *Cell Death Dis.* **11**, 6–8 (2020).
51. Tsuchihashi, N. A. *et al.* Autophagy through 4EBP1 and AMPK regulates oxidative stress-induced premature senescence in auditory cells. *Oncotarget* **6**, 3644–3655 (2015).

52. Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J. & Crespo, J. L. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**, 851–865 (2008).
53. Ganley, I. G. *et al.* ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **284**, 12297–12305 (2009).
54. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720–5728 (2000).
55. Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171**, 603–614 (2005).
56. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
57. Saftig, P. & Klumperman, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 623–635 (2009).
58. Yim, W. W. Y. & Mizushima, N. Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov.* **6**, 106–108 (2020).
59. Shen, H. M. & Mizushima, N. At the end of the autophagic road: An emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 61–71 (2014).
60. Lübke, T., Lobel, P. & Sleat, D. E. Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 625–635 (2009).

61. Sardiello, M. *et al.* A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* (80-.). **325**, 473–477 (2009).
62. Palmieri, M. *et al.* Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3852–3866 (2011).
63. Settembre, C. & Ballabio, A. TFEB regulates autophagy: An integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy* **7**, 1379–1381 (2011).
64. Settembre, C. *et al.* TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* (80-.). **332**, 1429–1433 (2011).
65. Lapierre, L. R. *et al.* The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
66. Decressac, M. *et al.* TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3–4 (2013).
67. Palmieri, M. *et al.* Corrigendum: mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nat. Commun.* **8**, 15793 (2017).
68. Mansueto, G. *et al.* Transcription Factor EB Controls Metabolic Flexibility during Exercise. *Cell Metab.* **25**, 182–196 (2017).
69. Pastore, N. *et al.* TFE 3 regulates whole-body energy metabolism in cooperation with TFEB. *EMBO Mol. Med.* **9**, 605–621 (2017).

70. Wiwatpanit, T. *et al.* Codeficiency of lysosomal mucopolipins 3 and 1 in cochlear hair cells diminishes outer hair cell longevity and accelerates age-related hearing loss. *J. Neurosci.* **38**, 3177–3189 (2018).
71. Marie, A., Larroze-Chicot, P., Cosnier-Pucheu, S. & Gonzalez-Gonzalez, S. Senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) as a model of age-related hearing loss. *Neurosci. Lett.* **656**, 138–143 (2017).
72. Benkafadar, N. *et al.* ROS-Induced Activation of DNA Damage Responses Drives Senescence-Like State in Postmitotic Cochlear Cells: Implication for Hearing Preservation. *Mol. Neurobiol.* **56**, 5950–5969 (2019).
73. Marie, A. *et al.* N-acetylcysteine treatment reduces age-related hearing loss and memory impairment in the senescence- accelerated prone 8 (SAMP8) mouse model. *Aging Dis.* **9**, 664–673 (2018).
74. Menardo, J. *et al.* Oxidative stress, inflammation, and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 Mouse Cochlea. *Antioxidants Redox Signal.* **16**, 263–274 (2012).
75. Okamura, K. & Nohara, K. Long-term arsenite exposure induces premature senescence in B cell lymphoma A20 cells. *Arch. Toxicol.* **90**, 793–803 (2016).
76. Chung, Y. P., Chen, Y. W., Weng, T. I., Yang, R. Sen & Liu, S. H. Arsenic induces human chondrocyte senescence and accelerates rat articular cartilage aging. *Arch. Toxicol.* **94**, 89–101 (2020).

77. Ninomiya, Y. *et al.* Arsenite induces premature senescence via p53/p21 pathway as a result of DNA damage in human malignant glioblastoma cells. *BMB Rep.* **47**, 575–580 (2014).
78. Yamaguchi, Y. *et al.* Arsenic acid inhibits proliferation of skin fibroblasts, and increases cellular senescence through ROS mediated MST1-FOXO signaling pathway. *J. Toxicol. Sci.* **41**, 105–113 (2016).
79. He, T. *et al.* Hearing loss in humans drinking tube well water with high levels of iron in arsenic-polluted area. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).
80. Li, X. *et al.* Oral exposure to arsenic causes hearing loss in young people aged 12-29 years and in young mice. *Sci. Rep.* **7**, 1–8 (2017).
81. Mizoi, M. *et al.* The role of trivalent dimethylated arsenic in dimethylarsinic acid-promoted skin and lung tumorigenesis in mice: Tumor-promoting action through the induction of oxidative stress. *Toxicol. Lett.* **158**, 87–94 (2005).
82. Yamanaka, K. *et al.* Oral exposure of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in mice leads to an increase in 8-oxo-2'-deoxyguanosine level, specifically in the target organs for arsenic carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 66–70 (2001).
83. Jiang, X., Chen, C., Zhao, W. & Zhang, Z. Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in A549 cells: An implication for the paradoxical mechanism. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **36**, 891–902 (2013).
84. Kalinec, G. M., Webster, P., Lim, D. J. & Kalinec, F. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol. Neuro-Otology* **8**, 177–189 (2003).

85. Kalinec, G., Thein, P., Park, C. & Kalinec, F. HEI-OC1 cells as a model for investigating drug cytotoxicity. *Hear. Res.* **335**, 105–117 (2016).
86. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445–544 (2012).
87. Mizushima, N. & Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545 (2007).
88. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* **140**, 313–326 (2010).
89. Wang, R. *et al.* Molecular basis of V-ATPase inhibition by bafilomycin A1. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
90. Collado, M., Blasco, M. A. & Serrano, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* **130**, 223–233 (2007).
91. Nakao, M., Tanaka, H. & Koga, T. Cellular Senescence Variation by Metabolic and Epigenomic Remodeling. *Trends Cell Biol.* **30**, 919–922 (2020).
92. Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V. & Kantidze, O. L. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell* **15**, 999–1017 (2016).
93. Stein, G. H., Drullinger, L. F., Souldard, A. & Dulić, V. Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2109–2117 (1999).

94. Kamogashira, T., Hayashi, K., Fujimoto, C., Iwasaki, S. & Yamasoba, T. Functionally and morphologically damaged mitochondria observed in auditory cells under senescence-inducing stress. *npj Aging Mech. Dis.* **3**, 1–3 (2017).
95. Lin, H. *et al.* Inhibition of DRP-1-Dependent Mitophagy Promotes Cochlea Hair Cell Senescence and Exacerbates Age-Related Hearing Loss. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 5–6 (2019).
96. Sun, H. *et al.* Sodium arsenite-induced learning and memory impairment is associated with endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in rat hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 3–5 (2017).
97. Gong, X., Ivanov, V. N., Davidson, M. M. & Hei, T. K. Tetramethylpyrazine (TMP) protects against sodium arsenite-induced nephrotoxicity by suppressing ROS production, mitochondrial dysfunction, pro-inflammatory signaling pathways and programmed cell death. *Arch. Toxicol.* **89**, 1057–1070 (2015).
98. Zheng, C. Y., Lam, S. K., Li, Y. Y. & Ho, J. C. M. Arsenic trioxide-induced cytotoxicity in small cell lung cancer via altered redox homeostasis and mitochondrial integrity. *Int. J. Oncol.* **46**, 1067–1078 (2015).
99. Pluquet, O., Pourtier, A. & Abbadie, C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **308**, 415–425 (2015).
100. Wiley, C. D. *et al.* Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab.* **23**, 303–314 (2016).

101. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* **30**, 1536–1548 (2011).
102. Ito, T., Teo, Y. V., Evans, S. A., Neretti, N. & Sedivy, J. M. Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep.* **22**, 3480–3492 (2018).
103. Volonte, D. *et al.* Oxidative stress-induced inhibition of Sirt1 by caveolin-1 promotes p53-dependent premature senescence and stimulates the secretion of interleukin 6 (IL-6). *J. Biol. Chem.* **290**, 4202–4214 (2015).
104. Kim, J. *et al.* TFEB–GDF15 axis protects against obesity and insulin resistance as a lysosomal stress response. *Nat. Metab.* **3**, 410–427 (2021).
105. Maejima, I. *et al.* Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* **32**, 2336–2347 (2013).
106. Nakamura, S. *et al.* LC3 lipidation is essential for TFEB activation during the lysosomal damage response to kidney injury. *Nat. Cell Biol.* **22**, 1252–1263 (2020).
107. Wilkinson, J. E. *et al.* Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell* **11**, 675–682 (2012).
108. Fu, X. *et al.* Tuberous sclerosis complex-mediated mTORC1 overactivation promotes age-related hearing loss. *J. Clin. Invest.* **128**, 4938–4955 (2018).

109. Shaw, R. J. & Cantley, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424–430 (2006).
110. Land, S. C. & Tee, A. R. Hypoxia-inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J. Biol. Chem.* **282**, 20534–20543 (2007).
111. El-Houjeiri, L. *et al.* The Transcription Factors TFEB and TFE3 Link the FLCN-AMPK Signaling Axis to Innate Immune Response and Pathogen Resistance. *Cell Rep.* **26**, 3613-3628.e6 (2019).
112. Song, J. X. *et al.* A novel curcumin analog binds to and activates TFEB in vitro and in vivo independent of MTOR inhibition. *Autophagy* **12**, 1372–1389 (2016).
113. Wang, W. *et al.* Up-regulation of lysosomal TRPML1 channels is essential for lysosomal adaptation to nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E1373–E1381 (2015).
114. Yu, L. *et al.* Small-molecule activation of lysosomal TRP channels ameliorates Duchenne muscular dystrophy in mouse models. *Sci. Adv.* **6**, 1–3 (2020).
115. Jeong, S. J. *et al.* Trehalose causes low-grade lysosomal stress to activate TFEB and the autophagy-lysosome biogenesis response. *Autophagy* 20894 (2021). doi:10.1080/15548627.2021.1896906
116. Li, D. *et al.* Sulforaphane Activates a lysosome-dependent transcriptional program to mitigate oxidative stress. *Autophagy* **17**, 872–887 (2021).

第 12 章 研究業績

鈴木 佑奈

I 発表	①一般発表	100
	②特別発表	なし
II 論文	①原著論文	1 (共 1)
	②症例報告	12 (単 0 / 共 12)
	③総説	1
III 著書		なし

以上

I 発表

① 一般発表

1. 窪田仁美、武井咲月、鈴木佑奈、門傳香織、安達慶太、原由起子、平野智寛、藤崎 滋、櫻井健一：乳癌 Eribulin 投与群における治療効果と好中球・リンパ球比の検討. 示説、第 39 回癌免疫外科研究会、岐阜、2018 年 5 月
2. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、武井咲月、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一、権田憲士：長期内分泌療法が奏効した超高齢者進行乳癌症例治療経過中の Indoleamine 2,3-dioxygenase の発現経過. 示説、第 39 回癌免疫外科研究会、岐阜、2018 年 5 月
3. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一、権田憲士：新規 check point である CDK4・6 阻害薬(Palbociclib)の治療経験について. 示説、第 39 回癌免疫外科研究会、岐阜、2018 年 5 月
4. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、原由起子、櫻井健一：免疫抑制剤使用中に手術を施行した乳癌の 1 例. 示説、第 39 回癌免疫外科研究会、岐阜、2018 年 5 月
5. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：局所進行(T4b)乳癌に対する手術療法の付加と予後の検討. 示説、第 26 回日本乳癌学会学術総会、京都、2018 年 5 月
6. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、櫻井健一：乳腺原発悪性リンパ腫の 2 例. 示説、第 26 回日本乳癌学会学術総会、京都、2018 年 5 月

7. 武井咲月、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、原由起子、鈴木周平、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：長期間の術前内分泌療法により切除可能となった高齢者局所進行乳癌の1例。示説、第26回日本乳癌学会学術総会、京都、2018年5月
8. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、武井咲月、藤崎 滋：術式決定に全自動乳房超音波診断装置(ABUS)が有用であった1例。示説、第26回日本乳癌学会学術総会、京都、2018年5月
9. 窪田仁美、門傳香織、鈴木佑奈、武井咲月、安達慶太、鈴木周平、原由起子、藤崎 滋、櫻井健一：血性乳頭分泌を認めた女性化乳房の一例。示説、第27回日本癌病態治療研究会、千葉、2018年5月
10. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、原由起子、櫻井健一：整容性を意識した乳頭乳輪温存胸筋温存乳房切除術の1例。示説、第27回日本癌病態治療研究会、千葉、2018年5月
11. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋：急速に増大し嚢胞内癌と鑑別が困難であった乳管内乳頭腫の1例。一般口演、日本超音波医学会第91回学術集会、神戸、2018年6月
12. 武井咲月、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、原由起子、鈴木周平、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋：長期術前内分泌療法が奏効した高齢者局所進行乳癌の1例。一般口演、日本超音波医学会第91回学術集会、神戸、2018年6月
13. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、原由起子、櫻井健一：乳腺症経過観察中に乳房用自動超音波画像診断装置にて発見された乳癌の1例。一般口演、日本超音波医学会第91回学術集会、神戸、2018年6月

14. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、小野容子、原由起子、櫻井健一：広がり診断に造影超音波検査が有用であった乳癌の1例。一般口演、日本超音波医学会第91回学術集会、神戸、2018年6月
15. 窪田仁美、門傳香織、鈴木佑奈、武井咲月、安達慶太、原由起子、藤崎 滋、櫻井健一：切除範囲の同定に超音波下での生検マーカが有用であった一例。一般口演、日本超音波医学会第91回学術集会、神戸、2018年6月
16. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、武井咲月、藤崎 滋：全自動乳房超音波診断装置が乳癌の乳頭乳
17. 輪温存手術に有用であった1例。一般口演、日本超音波医学会第91回学術集会、神戸、2018年6月
18. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋：内視鏡補助下乳頭乳輪温存胸筋温存乳房切除術の超音波検査による適応決定について。一般口演、日本超音波医学会第91回学術集会、神戸、2018年6月
19. 櫻井健一、藤崎 滋、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、権田憲士：外側側方切開による内視鏡補助下乳頭乳輪温存胸筋温存乳房切除術の検討。一般口演、第40回日本癌局所療法研究会、東京、2018年6月
20. 武井咲月、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋、権田憲士：長期間の術前内分泌療法により切除可能となった高齢者局所進行

乳癌の 1 例. 一般口演、第 40 回日本癌局所療法研究会、東京、2018 年 6 月

21. 武井咲月、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋、権田憲士：高齢者における全自動乳房超音波診断装置(ABUS)を使用した局在診断. 一般口演、第 40 回日本癌局所療法研究会、東京、2018 年 6 月
22. 平野智寛、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、富田涼一、藤崎 滋、権田憲士：全自動乳房超音波診断装置(ABUS)の Paget 病診断時の問題点について. 一般口演、第 40 回日本癌局所療法研究会、東京、2018 年 6 月
23. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋、権田憲士：術式決定に全自動超音波診断装置(ABUS)が有用であった 1 例. 一般口演、第 40 回日本癌局所療法研究会、東京、2018 年 6 月
24. 櫻井健一、藤崎 滋、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、権田憲士：一般病院で経験した神経内分泌乳癌の 1 例. 一般口演、第 40 回日本癌局所療法研究会、東京、2018 年 6 月
25. 森 聡史、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、小山祐未、原華保里、榎本克久、平野智寛、武井咲月、鈴木佑奈、富田涼一、藤崎 滋、権田憲士、櫻井健一：高齢者に発症しセンチネルリンパ節生検を施行した男性乳癌の 1 例. 一般口演、第 40 回日本癌局所療法研究会、東京、2018 年 6 月
26. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、藤原麻子、

- 原由起子、櫻井健一：年齢を考慮した男性乳癌の治療経験。一般口演、第40回日本癌局所療法研究会、東京、2018年6月
27. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、原由起子、平野智寛、榎本克久、櫻井健一：頸部リンパ節腫脹を契機に発見された高齢者進行乳癌の1例。一般口演、第40回日本癌局所療法研究会、東京、2018年6月
28. 小山祐未、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、森 聡史、原華保里、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋、権田憲士、武井咲月、鈴木佑奈、櫻井健一：高齢者に発症した同時性両側性乳癌の1例。一般口演、第40回日本癌局所療法研究会、東京、2018年6月
29. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋、権田憲士：乳癌術後経過観察に超音波検査が有用であった異時性多発乳癌の1例。一般口演、第40回日本癌局所療法研究会、東京、2018年6月
30. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、鈴木佑奈、武井咲月、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋、権田憲士：急速に増大し葉状腫瘍との鑑別が困難であった骨・軟骨化生を伴う乳癌の1例。一般口演、第43回日本外科系連合学会学術集会、東京、2018年6月
31. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、原由起子、櫻井健一：整容性を意識して工夫した乳癌手術の1症例。示説、第43回日本外科系連合学会学術集会、東京、2018年6月
32. 窪田仁美、鈴木佑奈、武井咲月、原華保里、安達慶太、原由起子、櫻井健一：血清乳頭分泌に対し腺葉区域切除術を施行した女性化

乳房の一例. 示説、第 43 回日本外科系連合学会学術集会、東京、2018 年 6 月

33. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛：検診マンモグラフィで発見された非触知乳癌の一例. 一般口頭発表、第 26 回日本がん検診・診断学会総会、東京、2018 年 9 月
34. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、武井咲月、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛：超音波併用検診が有用であった浸潤性乳管癌の一例. 一般口頭発表、第 26 回日本がん検診・診断学会総会、東京、2018 年 9 月
35. 窪田仁美、櫻井健一、安達慶太、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：乳がん検診で発見され、全自動乳房超音波診断装置(ABUS)が広がり診断に有用であった乳癌の 1 例. 一般口頭発表、第 26 回日本がん検診・診断学会総会、東京、2018 年 9 月
36. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、原由起子、鈴木周平、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：対策型検診で発見され 4 年間で異時性に 3 ヲ所に発生した乳癌症例. 一般口頭発表、第 26 回日本がん検診・診断学会総会、東京、2018 年 9 月
37. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、原由起子、鈴木周平、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：検診で発見された片側性単孔性乳頭異常分泌症に対する超音波所見の検討. 一般口頭発表、第 26 回日本がん検診・診断学会総会、東京、2018 年 9 月
38. 窪田仁美、櫻井健一、藤崎 滋、安達慶太、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一：同種異型皮膚移植時における indoleamin 2,3-dioxygenase の働きについて. 示説、第 77

回日本癌学会学術総会、大阪、2018年9月

39. 櫻井健一、藤崎 滋、安達慶太、鈴木佑奈、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一：超高齢者局所進行乳癌症例に対する Letrozol 治療経過中の Indoleamin 2,3-dioxygenase の発現について. 示説、第 77 回日本癌学会学術総会、大阪、2018年9月
40. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、鈴木佑奈、原由起子、平野智寛、榎本克久、富田涼一、藤崎 滋：Aromatase 阻害剤抵抗性転移性乳癌に対する Paclitaxel+Toremifene の併用効果. 示説、第 56 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2018年10月
41. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：術前化学療法後に乳房温存療法を選択した潜在 ス 性乳癌の 1 例. 示説、第 56 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2018年10月
42. 窪田仁美、安達慶太、鈴木佑奈、原由起子、鈴木周平、藤崎 滋、櫻井健一：Eribulin を投与した乳癌患者の治療効果と好中球・リンパ球比. 示説、第 56 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2018年10月
43. 窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、門傳香織、原由起子、藤崎 滋、櫻井健一：術後断端陽性となった浸潤性小葉癌の検討. 示説、第 56 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2018年10月
44. 櫻井健一、藤崎 滋、安達慶太、鈴木佑奈、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、富田涼一：超高齢者局所進行乳癌に対する内分泌治療経過中の Indoleamine 2,3-dioxygenase の発現. 示説、第 56 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2018年10月

45. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、原由起子、榎本克久、鈴木周平、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：術前診断に難渋した異所性甲状腺腫の 1 例．術前診断に難渋した異所性甲状腺腫の 1 例．示説、第 51 回日本甲状腺外科学会学術集会、横浜、2018 年 10 月
46. 窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、原由起子、藤崎 滋、櫻井健一：著明な乳房肥大を呈し、鑑別診断および術後フォローの決定に難渋した右乳房腫瘤の一例．一般口演、日本超音波医学会第 30 回関東甲信越地方会学術集会、東京、2018 年 10 月
47. 櫻井健一、安達慶太、鈴木佑奈、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：全自動乳房超音波診断装置(ABUS)が広がり診断に有用であった乳癌の 1 例．一般口演、日本超音波医学会第 30 回関東甲信越地方会学術集会、東京、2018 年 10 月
48. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、榎本克久、平野智寛：乳腺超音波検査で検出し得た微小な浸潤性乳管癌の一例．一般口演、日本超音波医学会第 30 回関東甲信越地方会学術集会、東京、2018 年 10 月
49. 櫻井健一、窪田仁美、安達慶太、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：乳癌における oligometastasis 症例に対する治療戦略．一般口演、第 80 回日本臨床外科学会総会、東京、2018 年 11 月
50. 櫻井健一、窪田仁美、安達慶太、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：検診で発見された片側性単孔性乳頭異常分泌症に対する超音波所見の検討．一般口演、第 80 回日本臨床外科学会総会、東京、2018 年 11 月

51. 窪田仁美、門傳香織、鈴木佑奈、武井咲月、安達慶太、櫻井健一、藤崎 滋：術後腫瘍の残存を認め、再手術となった乳癌症例の検討. 示説、第 80 回日本臨床外科学会総会、東京、2018 年 11 月
52. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、武井咲月、原由起子、平野智寛、榎本克久：葉状腫瘍近傍に非浸潤性乳管癌を併発した 1 例. 示説、第 80 回日本臨床外科学会総会、東京、2018 年 11 月
53. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛：トラスツヅマブ投与後に冠動脈狭窄による新機能低下を認めた乳癌の一例. 示説、第 80 回日本臨床外科学会総会、東京、2018 年 11 月
54. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：手術治療を拒否した局所進行甲状腺乳頭癌症例におけるレンバチニブ使用経過と Indoleamine 2,3-dioxygenase の発現について. 要望演題、第 31 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、東京、2018 年 12 月
55. 窪田仁美、門傳香織、鈴木佑奈、安達慶太、鈴木周平、原由起子、櫻井健一：当院における過誤腫の術前所見についての検討. 一般口演、第 15 回日本乳癌学会関東地方会、大宮、2018 年 12 月
56. 鈴木佑奈、窪田仁美、原華保里、森聡史、禹有佳里、渡邊美帆、安達慶太、藤原麻子、鈴木周平、原由起子、平野智寛、榎本克久、櫻井健一：全自動乳房画像診断装置(ABUS)が術式決定に有用であった 1 例. 一般口演、第 555 回日本大学医学会例会(外科系)、東京、2019 年 1 月
57. 森聡史、鈴木佑奈、窪田仁美、原華保里、禹有佳里、渡邊美帆、藤原麻子、安達慶太、鈴木周平、原由起子、平野智寛、榎本克久、櫻

- 井健一：腎悪性腫瘍との鑑別に難渋した後腹膜奇形腫の 1 例．一般口演、第 555 回日本大学医学会例会(外科系)、東京、2019 年 1 月
58. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、原由起子、平野智寛、榎本克久、藤崎 滋、富田涼一、槇島 誠：炎症性腸疾患 model mouse における INF- γ と indoleamine 2,3-dioxygenase 発現について．示説、第 119 回日本外科学会定期学術集会、大阪、2019 年 4 月
59. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、平野智寛、榎本克久、藤崎 滋、富田涼一：炎症性乳癌型再発時の indoleamine 2,3-dioxygenase 発現状態．示説、第 119 回日本外科学会定期学術集会、大阪、2019 年 4 月
60. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：5cm を超える乳癌に対して全自動乳房超音波診断装置が広がり診断に有用であった 1 例．一般口演、日本超音波医学会第 92 回学術集会、東京、2019 年 5 月
61. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、原由起子、榎本克久、平野智寛、藤崎 滋、富田涼一：乳房嚢胞内腫瘍に対する全自動乳房超音波診断装置(ABUS)の使用経験．一般口演、日本超音波医学会第 92 回学術集会、東京、2019 年 5 月
62. 平野智寛、鈴木佑奈、窪田仁美、安達慶太、鈴木周平、原由起子、榎本克久、櫻井健一：立位困難にて発覚した甲状腺乳頭癌の脊椎・肺転移に対し、整形外科領域手術、放射線照射、甲状腺全摘術、頸部リンパ節郭清術及びレンバチニブ投与療法の集学的治療にて 5 年以上の PR を維持している一例．示説、第 31 回日本内分泌外科学会総会、東京、2019 年 6 月

63. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、後藤洋伯、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：乳腺線維腺腫摘出部位近傍より発生した葉状腫瘍の超音波所見について。一般口演、第 41 回日本癌局所療法研究会、岡山、2019 年 6 月
64. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、後藤洋伯、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：急速に増大し乳癌との鑑別が困難であった乳管内乳頭腫の 1 例。一般口演、第 41 回日本癌局所療法研究会、岡山、2019 年 6 月
65. 櫻井健一、藤崎 滋、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、鈴木佑奈、平野智寛、富田涼一：乳房嚢胞内腫瘍に対する全自動乳房超音波診断装置(ABUS)の使用経験。デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
66. 鈴木佑奈、櫻井健一、武井咲月、窪田仁美、安達慶太、鈴木周平、原由起子、平野智寛、榎本克久：トリプルネガティブ乳癌症例における術前化学療法奏功率に影響する因子の検討。デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
67. 原華保里、榎本克久、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、小山祐未、森 聡史、禹有佳里、渡邊美帆、後藤洋伯、藤原麻子、安達慶太、鈴木周平、松本京子、原由起子、村上絵里子、平野智寛、櫻井健一：当科で経験した pCR 症例の臨床学的検討。デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
68. 禹有佳里、榎本克久、鈴木佑奈、窪田仁美、森 聡史、原華保里、渡邊美帆、後藤洋伯、藤原麻子、安達慶太、鈴木周平、原由起子、平野智寛、櫻井健一：術前高容量 Cyclophosphamide が奏功した stageIV 乳癌の治療経験。デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月

69. 鈴木周平、櫻井健一、榎本克久、平野智寛、原由起子、安達慶太、藤原麻子、渡邊美帆、森 聡史、原華保里、窪田仁美、鈴木佑奈：センチネルリンパ節に微小転移を認めた乳癌の術後薬物療法に関する検討. デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
70. 平野智寛、鈴木佑奈、武井咲月、門傳香織、窪田仁美、高木真由子、森 聡史、原華保里、後藤洋伯、禹有佳里、渡邊美帆、藤原麻子、安達慶太、鈴木周平、堀 京子、原由起子、榎本克久、櫻井健一：HER-2 陽性多発転移乳癌に対しホルモン剤併用抗、HER-2 療法が著効し 60 ヶ月以上の長期 PR を維持した一例. デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
71. 安達慶太、鈴木周平、鈴木佑奈、窪田仁美、森 聡史、原華保里、渡邊美帆、藤原麻子、原由起子、平野智寛、榎本克久、櫻井健一：Trastuzumab+Pertuzumab により long SD を得ている HER2 陽性転移・再発乳癌の 1 例. デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
72. 藤原麻子、榎本克久、鈴木佑奈、武井咲月、窪田仁美、原華保里、森 聡史、後藤洋伯、渡邊美帆、安達慶太、鈴木周平、松本京子、原由起子、平野智寛、櫻井健一：EC 逐次 Eribulin 投与で Long SD が得られた症例経験. デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
73. 森 聡史、櫻井健一、鈴木佑奈、窪田仁美、原華保里、渡邊美帆、禹有佳里、藤原麻子、安達慶太、鈴木周平、堀 京子、原由起子、平野智寛、榎本克久：乳腺扁平上皮癌の 1 例. デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
74. 渡邊美帆、榎本克久、鈴木佑奈、窪田仁美、原華保里、森 聡史、

- 後藤洋伯、禹有佳里、安達慶太、藤原麻子、鈴木周平、原由起子、平野智寛、櫻井健一：維持透析患者症例の乳癌治療経験. デジタルポスター、第 27 回日本乳癌学会学術総会、東京、2019 年 7 月
75. 櫻井健一、鈴木周平、平野智寛、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、後藤洋伯、塩味正雄、藤崎 滋、富田涼一：検診で発見された小腫瘍径の乳癌に対する超音波検査の検討. 一般口演、第 60 回日本人間ドック学会学術大会、岡山、2019 年 7 月
76. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：乳腺良性腫瘍摘出後症例の検診における盲点. 一般口演、第 27 回日本がん検診・診断学会総会、新横浜、2019 年 8 月
77. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：介護施設入所中に発見された検診未受診乳癌の治療経験. 一般口演、第 27 回日本がん検診・診断学会総会、新横浜、2019 年 8 月
78. Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Akihiro Kishino, Yuna Suzuki, Yasuyuki Nomura, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa : The cross-talk between exosomal miRNA, apoptosis and autophagy in auditory cell death. The 124th American Academy Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation Virtual Annual Meeting & OTO EXPO, New Orleans, USA, September 15-18, 2019.
79. Ken Hayashi, Yuna Suzuki, Fumiyuki Goto, Akihiro Kishino, Kaoru Ogawa : The effect of hyperexcitability-induced cell death modulated by miRNA let-7b in the auditory-brain. The 12th APSCI (Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants) and Related Sciences, Tokyo, Japan, November 27-30, 2019.

80. 鈴木佑奈、林 賢、榎島 誠：内耳における酸化ストレス誘導性細胞老化モデルの確立。一般口演、第 560 回日本大学医学会例会（生化学分野）、東京、2019 年 11 月
81. Ken Hayashi, Yuna Suzuki, Akihiro Kishino, Fumiyuki Goto, Kaoru Ogawa : The interaction of TRL7 with TRPA1 drives hyperexcitability cell death modulated by miRNA let-7b in auditory cells., 43rd ARO (Association for Research in Otolaryngology) Midwinter meeting, San Jose, USA, January 25-29, 2020.
82. Yuna Suzuki, Ken Hayashi, Yasuyuki Nomura, Takeshi Ohshima, Makoto Makishima : The establishment of oxidative stress-induced premature senescence model in auditory cells. 43rd ARO (Association for Research in Otolaryngology) Midwinter meeting, San Jose, USA, January 25-29, 2020.
83. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：高齢者乳癌治療後に発生した放射線誘発性皮膚血管肉腫。一般口演、第 42 回日本癌局所療法研究会、大阪、2020 年、5 月
84. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：乳腺 Neuroendocrine ductal carcinoma in situ の 1 例。一般口演、第 42 回日本癌局所療法研究会、大阪、2020 年、5 月
85. 安達慶太、櫻井健一、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：術後 8 年目に局所再発をきたした乳癌症例。一般口演、第 42 回日本癌局所療法研究会、大阪、2020 年、5 月

86. 鈴木佑奈：トリプルネガティブ乳癌に対する術前化学療法の治療効果に関する臨床病理学的検討，第 120 回日本外科学会定期学術集会．デジタルポスター、横浜、2020 年 8 月
87. 櫻井健一、鈴木周平、平野智寛、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、藤崎 滋、富田涼一：乳房温存手術を施行した若年者同時性同側性多発癌の 1 例。ポスター、第 28 回日本乳癌学会学術総会、名古屋、2020 年、10 月
88. 平野智寛、鈴木佑奈、窪田仁美、安達慶太、鈴木周平、櫻井健一：乳癌診療における周術期口腔機能管理。ポスター、第 28 回日本乳癌学会学術総会、名古屋、2020 年、10 月
89. 櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、鈴木佑奈、平野智寛、富田涼一、藤崎 滋：骨シンチで濃染し急速に増大した骨・軟骨化生を伴う乳癌の 1 例。一般口演、第 58 回日本癌治療学会学術集会、京都、2020 年、10 月
90. Ken Hayashi, Yuna Suzuki, Fumiyuki Goto, Kaoru Ogawa : The impact of extracellular miRNA let-7b as a top-down signal in the auditory-brain. The 124th American Academy Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation Virtual Annual Meeting & OTO EXPO, September 13-October 25, 2020.
91. 櫻井健一、鈴木周平、平野智寛、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、藤崎 滋、塩味正雄、池田 縁、辻 泰喜：健診における乳腺良性腫瘍摘出後症例の盲点。一般口演、第 61 回日本人間ドック学会学術大会、2020 年、11 月
92. 櫻井健一、鈴木周平、平野智寛、安達慶太、窪田仁美、鈴木佑奈、藤崎 滋、塩味正雄、池田 縁、辻 泰喜：介護施設入所中に発見

された検診未受診高齢者乳癌の治療経験. 一般口演、第 61 回日本人間ドック学会学術大会、2020 年、11 月

93. 櫻井健一、鈴木周平、安達慶太、平野智寛、鈴木あゆみ、坂本彩香、窪田仁美、鈴木佑奈、富田涼一、榎島 誠、藤崎滋：両側乳癌術後両側局所再発症例の経過観察に超音波検査が有用であった 1 例. ポスター、第 46 回日本乳癌甲状腺超音波医学会学術集会、2021 年、5 月
94. 櫻井健一、鈴木周平、安達慶太、平野智寛、鈴木あゆみ、坂本彩香、窪田仁美、鈴木佑奈、富田涼一、榎島 誠、古市基彦、藤崎 滋：長期に Fulvestrant が奏功していると考えられる高齢者局所進行乳癌の 1 例. 第 46 回日本乳癌甲状腺超音波医学会学術集会、2021 年、5 月
95. 櫻井健一、鈴木周平、安達慶太、平野智寛、窪田仁美、鈴木佑奈、富田涼一、榎島 誠、藤崎 滋：Rheumatrex 投与中に発症した高齢者男性乳癌の 1 例. 一般口演、第 42 回癌免疫外科研究会、2021 年、5 月
96. 櫻井健一、鈴木周平、安達慶太、平野智寛、窪田仁美、鈴木佑奈、富田涼一、榎島 誠、藤崎 滋：CDK4/6 阻害剤が長期間奏功している高齢者乳癌多発肺転移症例. 一般口演、第 42 回癌免疫外科研究会、2021 年、5 月
97. 櫻井健一、鈴木周平、安達慶太、平野智寛、鈴木あゆみ、坂本彩香、窪田仁美、鈴木佑奈、富田涼一、榎島 誠、藤崎 滋：術前診断に苦慮した異所性縦隔甲状腺腫の 1 例. 一般口演、第 43 回日本癌局所療法研究会、横浜、2021 年、5 月
98. 櫻井健一、鈴木周平、安達慶太、平野智寛、鈴木あゆみ、坂本彩香、窪田仁美、鈴木佑奈、富田涼一、榎島 誠、藤崎 滋：超高齢者囊

胞内乳癌に対して局所療法を施行した 1 例。一般口演、第 43 回日本癌局所療法研究会、横浜、2021 年、5 月

99. 鈴木佑奈、林 賢、五島 史行、野村 泰之、榎島 誠：TFEB による酸化ストレス誘導性内耳細胞老化の制御。一般口演、第 21 回日本抗加齢医学会総会、京都、2021 年 6 月

100. Ken Hayashi, Yuna Suzuki, Fumiyuki Goto, Yasuyuki Nomura, Sho Kanzaki, Chisato Fujimoto : The effect of exosomal miRNA let-7b to the mismatch negativity as an auditory memory traces in cellular neural network. The 125th American Academy Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO EXPO, Los Angeles, USA, October 3-6, 2021.

② 特別発表
なし

II 論文

①原著論文

1. 平野智寛、櫻井健一、藤崎 茂、窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、鈴木周平、富田涼一：全自動乳房超音波画像診断装置(ABUS)の Paget 病診断時の問題点について. 癌と化学療法、46(2):348-350,2019.

②症例報告

1. 鈴木佑奈、櫻井健一、安達慶太、窪田仁美、鈴木周平、武井咲月、原由起子、榎本克久、平野智寛、槇島 誠：長期内分泌療法が奏功した超高齢者進行乳癌症例治療経過中の Indoleamine 2,3-Dioxygenase の発現経過. 癌と化学療法、45(10):1495-1497、2018.
2. 櫻井健一、藤崎 滋、窪田仁美、鈴木佑奈、原由起子、鈴木周平、安達慶太、富田涼一、榎本克久、平野智寛、嵯峨玲奈、槇島 誠：新規 Checkpoint Inhibitor である Palbociclib の治療経験. 癌と化学療法、45(10):1498-1500、2018.
3. 安達慶太、櫻井健一、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、槇島 誠、越永従道：免疫抑制剤使用中に手術を施行した乳癌の 1 例. 癌と化学療法、45(10):1501-1503、2018.
4. 櫻井健一、藤崎 滋、窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、鈴木周平、平野智寛、富田涼一：一般病院で経験した神経内分泌乳癌の 1 例. 癌と化学療法、45(13):1904-1906、2018.
5. 安達慶太、櫻井健一、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、槇島 誠、越永従道：年齢を考慮した高齢者男性乳癌の治療経験. 癌と化学療法、46(2):309-311、2019.
6. 安達慶太、櫻井健一、窪田仁美、鈴木佑奈、鈴木周平、槇島 誠：

頸部リンパ節腫脹を契機に発見された高齢者進行乳癌の 1 例. 癌と化学療法、46(2):312-314、2019.

7. 森 聡史、櫻井健一、藤崎 滋、窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、鈴木周平、富田涼一：高齢者に発症したセンチネルリンパ節生検を施行した男性乳癌の 1 例. 癌と化学療法、46(2):333-335、2019.
8. 門傳香織、櫻井健一、藤崎 滋、窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、鈴木周平、富田涼一：全自動乳房超音波画像診断装置(ABUS)の高齢者への使用経験. 癌と化学療法、46(2):345-347、2019.
9. 窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、鈴木周平、原由起子、藤崎 滋、榎島 誠、嵯峨玲奈、平野智寛、櫻井健一：乳癌・子宮癌を同時に呈した重複癌の 1 例. 癌と化学療法、46(2):339-341、2019.
10. 小山祐未、櫻井健一、藤崎 滋、窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、鈴木周平、富田涼一：高齢者に発症した同時性両側性乳癌の 1 例. 癌と化学療法、46(2):351-353、2019.
11. 櫻井健一、鈴木周平、平野智寛、窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、後藤洋伯、富田涼一、藤崎 滋：乳腺線維腺腫摘出部位近傍より発生した葉状腫瘍の 1 例. 癌と化学療法、47(1):150-152、2020.
12. 櫻井健一、鈴木周平、平野智寛、窪田仁美、鈴木佑奈、安達慶太、後藤洋伯、富田涼一、藤崎 滋：急速に増大し乳癌との鑑別が困難であった乳管内乳頭腫の 1 例. 癌と化学療法、47(1):153-155、2020.

③総説

Hayashi K, Suzuki Y, Fujimoto C, Kanzaki S. Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy for Genetics of Hearing Impairment. *Genes (Basel)*. 2020;11(11):1331.