

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11330

研究課題名(和文) 内耳(内リンパ嚢、血管条)におけるイオン輸送および制御機構の研究

研究課題名(英文) ion transport and its regulation in the inner ear (endolymphatic sac, stria vascularis)

研究代表者

宮下 武憲 (Miyashita, Takenori)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：60363214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：内リンパ系を調節している内リンパ嚢におけるイオン輸送を詳細に調べることで、内リンパ過多によって生じるメニエール病などの新たな治療法開発を目指して研究を進めている。以前は不可能であった、内リンパ嚢からの微量なmRNA抽出・定量に成功し、さらに3つの部位別に解析することに成功した。減塩食モデル動物の内リンパ嚢中間部では、ナトリウム-カリウムポンプ、上皮性ナトリウムチャンネル、サイアザイド感受性Na-Cl共輸送体すべての発現が有意に多かった。減塩食では、内リンパ嚢、特に中間部においてNa輸送が活性化され、内リンパ吸収が活性化されることで内リンパ水腫が改善する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減塩食・高塩食モデル動物を用いた本研究から、減塩食は内リンパ嚢における内リンパの吸収を促進し、内リンパ水腫を改善する可能性があることが示唆された。内リンパ水腫を病態とするメニエール病の治療の一つとして減塩食が勧められることを、動物モデルでも確認し、これまで臨床研究で想像されていた、内リンパ水腫の調節機構の一つを解明することができた。今後、さらに研究を進めることで、内リンパ水腫を病態とするメニエール病などの疾患の経験的治療の根拠を補強し、新たな治療法開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The endolymphatic sac in the inner ear is thought to absorb endolymph. Endolymphatic sac dysfunction causes an excess of endolymph, a pathological condition in Meniere's disease. A low-salt diet is an effective treatment for Meniere's disease. We succeeded in extracting and quantifying a small amount of mRNA from the endolymphatic sac epithelium and succeeded in analyzing each portion of the endolymphatic sac. The expression of Na⁺/K⁺-ATPase, epithelial Na channel, and thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter were significantly higher in the intermediate portion of the endolymphatic sac in the low-salt diet model animals than high-salt diet model animals. It is suggested that the low-salt diet may improve endolymphatic hydrops by activating endolymphatic absorption through activating Na transport in the endolymphatic sac, especially in the intermediate portion of the endolymphatic sac.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳 イオン輸送 内リンパ嚢 血管条 RT-PCR リアルタイムPCR メニエール病 内リンパ水腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難病のひとつであるメニエール病の病態は、内耳の内リンパが過剰である内リンパ水腫であるが、健常では内リンパ水腫が生じないように内リンパ系が調節されている。内リンパが過剰になると、難聴やめまいが生じるため、聴覚と平衡感覚の維持には内リンパの調節がきわめて重要である。内リンパは内耳の血管条で産生され、内リンパ嚢で吸収されている。難治性メニエール病の治療として、内リンパ嚢開放術(ドレナージ術)が広く行われている。

本研究のターゲットである内リンパ嚢は、近位部、中間部、遠位部と別れており、形態の異なる数種類の細胞が各部位を構成している。これまでは、断面的にしか解析できなかったが、立体的に分子レベルでの解析を可能にするイメージングシステムを開発し、内リンパ嚢全体を分子レベルで部位別にイメージングすることが可能になった。また、臨床研究として、減塩治療をメニエール病患者に行うと血中アルドステロン濃度が上昇するとともに、めまい発作は減少し、聴力は改善する傾向を認めた。そのため、減塩食により血中アルドステロン濃度が上昇し、アルドステロンによって活性化されるイオン輸送体が内リンパ嚢において活性化され、イオン輸送が活性化されることで内リンパ吸収が促進され、内リンパ水腫が改善する可能性が考えられる。これまでに、電気生理学的研究により、内リンパ嚢においてナトリウム輸送が内リンパの吸収に重要な働きをしていること、上皮性ナトリウムチャンネル、非選択性陽イオンチャンネル、ナトリウム-カリウムポンプが働いていることを確認している。

また、これまでに、分子生物学的アプローチとして、laser capture microdissection 法を用いてラット内リンパ嚢上皮細胞から mRNA を抽出し、イオン輸送体が内リンパ嚢に発現しているかどうかなど、発現を調べる定性的な研究は可能であったが、定量的な解析には成功していなかった。もし、内リンパ嚢上皮に特異的な mRNA の定量が可能になれば、モデルラットや、薬剤負荷前後の発現量を比較することで、制御系や機能を推定することが可能になると想定される。また、機能解析方法として、内リンパを吸収する内リンパ嚢上皮、および内リンパを産生する血管条でのイオンイメージングが可能になると各種薬剤への反応が研究できるようになると想定される。

2. 研究の目的

新たに、固定標本からの mRNA の効率良い抽出方法を開発し、laser capture microdissection 法にて純粋な内リンパ嚢上皮細胞由来の mRNA を採取し、存在が推定されるイオン輸送体の内リンパ嚢での発現の有無を明らかにし、さらに、モデル動物の内リンパ嚢上皮細胞のイオン輸送体の発現量変化をリアルタイム PCR にて定量解析することで、内リンパ嚢におけるイオン輸送制御系を明らかにすることを目的とする。内リンパの制御系を明らかにすることで、内リンパをコントロールし、内リンパ水腫を呈する疾患の病態解明、治療法開発を目指す。また、イオンイメージングを用いて、内リンパ嚢での内リンパ吸収とあわせて、血管条での内リンパ分泌機構とその調節機構も同様に解明することを目指す。

3. 研究の方法

内リンパ嚢におけるイオン輸送体の研究では、これまでの培養細胞や primary culture での分離細胞を用いた mRNA 解析では、刻々と発現量が変化すると想定されるイオン輸送体の研究には限界があると想定されたため、パラホルムアルデヒドにて瞬時に還流固定した内リンパ嚢標本を用いた実験系を開発した。また、内リンパ嚢の3つの部位別に mRNA を採取するため、laser capture microdissection 法を用いた。比較のため、固定後、もしくは未固定で内リンパ嚢を顕

微鏡下に摘出し、mRNA を採取した。より効率良く、かつ、断片化の少ない mRNA 抽出方法を開発するため、条件を様々に調整して実験を行った。マウス、ラットを用いて、最適な条件を検討した。最適な条件としては、ラットを深麻酔下にパラホルムアルデヒドで還流固定し、側頭骨を採取し、EDTA で脱灰後にクライオスタットで薄切し、laser capture microdissection 法により内リンパ嚢上皮を部位別に採取して mRNA を抽出する方法であり、定量解析にはこの方法を用いた。そして、reverse transcription-quantitative PCR にて mRNA 量を定量して解析した。また、イメージングに際し、まず、内リンパ嚢内腔への薬物投与系を開発し、内リンパ嚢上皮細胞および血管条のイメージングを試みた。

4 . 研究成果

これまでは不可能であった内リンパ嚢上皮細胞からの mRNA の定量が可能になった。さらに、収率が不安定であったため各ステップを詳細に見直し検討し、断片化が少なく、かつ、安定した収率を得られるようになった。

ラット内リンパ嚢から、近位部、中間部、遠位部の部位別に mRNA を抽出し、アルドステロンにより制御されているイオン輸送体であり、ナトリウム輸送に関係する、ナトリウム-カリウムポンプ、上皮性ナトリウムチャンネル、サイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体の発現量を定量比較した。いずれのイオン輸送体も内リンパ嚢中間部に多く発現していた。この結果は、これまでの免疫染色や、電気生理学的実験の結果と一致していた。

次に、ヒトでの臨床研究より、減塩食により血中アルドステロン濃度が生理的に上昇し、アルドステロンにより内リンパ嚢におけるナトリウム輸送にかかわるイオン輸送体が活性化され、内リンパ吸収が活性化され内リンパ水腫が改善すると推定されていることから、アルドステロン濃度が上昇すると想定される減塩食モデルラット、およびアルドステロンが抑制されると想定される高塩食モデルラットを用い、それぞれのモデルラットの、内リンパ嚢におけるイオン輸送体の発現量の違いを調べた。内リンパ嚢上皮全体（近位部、中間部、遠位部）では、減塩食モデルラットでは、ナトリウム-カリウムポンプ、上皮性ナトリウムチャンネル、サイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体すべての発現が多く、上皮性ナトリウムチャンネルの発現は有意に多かった。さらに内リンパ嚢の部位別に調べると、減塩食ラットの中間部では、ナトリウム-カリウムポンプ、上皮性ナトリウムチャンネル、サイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体すべての発現が有意に多かった。減塩食では、内リンパ嚢、特に中間部においてナトリウム輸送が活性化され、内リンパ吸収が活性化されている可能性が示唆された。

イメージングについては、内リンパへの蛍光色素注入方法を開発し、内リンパ嚢上皮の染色、および、血管条の染色が可能になった。パラホルムアルデヒドで固定し、内リンパ嚢上皮細胞、および血管条が染色されていることを確認した。

以上より、内耳の一部である内リンパ嚢、特に中間部には、アルドステロンにより制御されるイオン輸送体が多く発現し、減塩食などにより血中アルドステロン濃度が上昇するとナトリウム-カリウムポンプ、上皮性ナトリウムチャンネル、サイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体の発現が増加し、内リンパ嚢におけるナトリウム輸送が活性化されることで内リンパ吸収が促進され、内リンパ水腫が改善する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nozomu Mori, Takenori Miyashita, Ryuhei Inamoto, Ai Matsubara, Terushige Mori, Kosuke Akiyama, Hiroshi Hoshikawa	4. 巻 274
2. 論文標題 Ion transport its regulation in the endolymphatic sac: suggestions for clinical aspects of Meniere's disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur Arch Otorhinolaryngol	6. 最初と最後の頁 1813-1820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00405-016-4362-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 宮下 武憲、稲本 隆平、福田信二郎、星川 広史、人見 浩史、清元 秀泰、 西山 成、森 望	4. 巻 120
2. 論文標題 メニエール病の減塩治療による各種ホルモン濃度変化	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 1123-1124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsubara A., Miyashita T., Inamoto R., Sakaguchi H., Kamitani T., Mori N., Hoshikawa H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Tricellulin Expression and its Deletion Effects in the Endolymphatic Sac	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of International Advanced Otology	6. 最初と最後の頁 312-316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5152/iao.2018.5473.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takenori Miyashita
2. 発表標題 Ion homeostasis in endolymphatic sac and Meniere's disease
3. 学会等名 International Congress of ORL-HNS 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------