

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09333

研究課題名（和文）内リンパ水腫の分子機構の解明—内リンパ嚢に発現する蛋白質の網羅的解析

研究課題名（英文）Multi-omics analysis on proteins expressed in human endolymphatic sac of Meniere's disease

研究代表者

土井 勝美 (DOI, Katsumi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：40243224

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）：難治性メニエール病患者のヒト内リンパ嚢に発現する蛋白質についてマルチオミックス解析を行い、内リンパ水腫の分子機構の解明を目指した。対照群として聴神経腫瘍患者の内リンパ嚢に発現する蛋白質についても、同様のマルチオミックス解析を行った。ヒト外耳・中耳より採取した極少量の組織からは、900種類（軟骨膜）、700種類（軟骨）、800種類（結合組織）の蛋白質が同定可能であった。また、ヒト内リンパ嚢から881種類の蛋白質の同定に成功した。難治性メニエール病患者と聴神経腫瘍患者の内リンパ嚢では異なる発現を示す蛋白質が多数同定され、現在、それぞれの内リンパ嚢での発現量・発現パターンの比較解析を実施中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトおよび動物内リンパ嚢のマルチオミックス解析は世界初の試みであり、今後の内耳組織に対するプロテオミクス研究の礎・マイルストーンになる画期的な研究と考えられる。ヒト内リンパ嚢に発現する遺伝子・膜蛋白質の解析は、我々が先行研究において新しい知見を報告したのが最初である。現時点でも、ヒトおよび動物の内リンパ嚢に発現する遺伝子・蛋白質に関する質の高い網羅的解析の報告はなく、その観点から、本研究ならびに我々の先行研究は一定の学術的独自性と創造性を有する。

研究成果の概要（英文）：Multi-omics data analysis on proteins expressed in human endolymphatic sac of Meniere's disease and vestibular schwannoma patients was completed. We could identify 881 proteins in human endolymphatic sac. Expression profile of several proteins was quite different between Meniere's disease and vestibular schwannoma. We are now evaluating expression amounts as well as expression patterns and trying to see key-molecules which may cause endolymphatic hydrops and Meniere's disease.

研究分野：耳科学、神経耳科学、分子生物学、分子遺伝学

キーワード：メニエール病 マルチオミックス解析 内リンパ水腫 聴神経腫瘍 内リンパ嚢

1. 研究開始当初の背景

遅発性内リンパ水腫およびその類縁疾患であるメニエール病は、高度の難聴、耳鳴りと回転性めまい発作の反復により、重度のコミュニケーション障害と平衡機能障害をもたらす疾患であり、患者 QOL を大きく低下させる難治性疾患である。両疾患の本態である内リンパ水腫の分子機構は、現在も解明されていない。内リンパ水腫を軽減あるいは消失させる治療法は確立されておらず、有効な治療薬も存在しない。新規治療法開発のためには、内リンパ水腫の分子機構の解明が不可欠である。

内リンパ水腫は、蝸牛血管条と半規管膨大部の暗細胞領域における内リンパ産生と、内リンパ嚢における内リンパ吸収との不均衡により生じると考察されている。内リンパ吸収部位である内リンパ嚢の機能不全が、内リンパ水腫の形成に重要な影響を与えることが推察され、1927 年に Portman G. (フランス) により開発された内リンパ嚢開放手術が、100 年近く経った現在でも、難治性メニエール病および遅発性内リンパ水腫に対して、第一選択の外科治療として施行されている。内リンパ水腫の分子機構を解明する目的で、内リンパ嚢に発現する蛋白質について、ゲノミクス・プロテオミクス・メタボロミクス解析を行い、内リンパの吸収機構に關与する蛋白質を同定し、内リンパ水腫の分子機構の解明を目指すことは、論理的・科学的に妥当であると考えられる。

内リンパ水腫の分子機構を解明するための臨床および基礎研究の大きな障壁となっている要因は、以下の 2 点に集約される。1) 内リンパ水腫は、側頭骨内深部に局在する内耳(蝸牛、前庭、半規管および内リンパ嚢)に形成されるため、病巣への直接的なアプローチが容易ではなく、ヒトおよび動物内耳からのサンプル採取は困難である。また、内リンパ水腫の病態そのものを、形態学的に、生理学的に正しく客観的に観察・評価することも容易ではない。2) 内耳組織は骨迷路内に局在する微小な器官であるため、例えばサンプル採取が可能になったとしても、実際の解析に利用できる RNA、DNA、そして蛋白質の量はいずれも極めて微量であり、統計学的処理に耐えうる論理性を有するデータの収集は容易ではない。また、内耳自体が、異なる機能・形態を有する多数の細胞により複雑に構成されているため、解析の標的となる部位から選択的にサンプルを抽出することはさらに困難である。

近年、新規の分子生物学的・分子遺伝学的研究手法の開発は著しく進み、また、研究室レベルでのゲノミクス・プロテオミクス・メタボロミクス解析の本格的導入も現実のものとなった。少数のサンプル、微量なサンプルから、科学的に論理性、客観性を有するデータの解析が可能になった。また、臨床研究でも、ヒト内リンパ水腫を Gd-MRI 撮影で客観的に評価すること、VEMP や vHIT 等の新しい解析システムが導入され、独立した前庭や半規管の機能を選択的に評価することが可能になった。

研究代表者の施設は、難聴およびめまい疾患の診断と治療、特に、難治性メニエール病および遅発性内リンパ水腫に対する外科治療の国内における中心的施設の一つであり、年間 10 名前後の内リンパ嚢手術を施行している。これまでに、学内の倫理委員会への申請・承認を経た上で、すでに 38 名の難治性メニエール病および遅発性内リンパ水腫患者から内リンパ嚢を採取し、凍結保管している。同時に、当施設では年間 5 名前後の聴神経腫瘍患者に対して経耳的聴神経腫瘍摘出術を施行しており、同様に学内の倫理委員会への申請・承認を経た上で、すでに 15 名の聴神経腫瘍患者から内リンパ嚢を採取し、凍結保管している。研究代表者および研究分担者は、先行研究において、ヒト内リンパ嚢およびラット蝸牛(血管条)に発現する RNA および膜蛋白質の

網羅的解析を進め、その成果の一部を報告してきた (Eur J Neurosci 42(3):1984-2002; J Neuroendocrinol 22(11):1157-64; J Neuroendocrinol 20(12):1295-300; ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 67(5):289-93)。

上述の学術的背景を踏まえ、本研究では、難治性メニエール病および遅発性内リンパ水腫患者の内リンパ嚢に発現する蛋白質について、ゲノミクス・プロテオミクス・メタボロミクス解析を行い、内リンパの吸収機構に関する膜蛋白質(イオンチャネル・レセプター・トランスポーター等)を同定し、内リンパ水腫の分子機構の解明を目指す。臨床データ(前庭機能評価、聴覚評価、Gd-MRI 評価)とマルチオミクス解析データの相関解析を行い、内リンパ水腫の形成に関与すると推察される膜蛋白質を抽出する。同定された膜蛋白質に関して、正常および内リンパ水腫モデル動物の内リンパ嚢における蛋白質動態についても解析を進め、同時に、それらの膜蛋白質に作動する薬剤の影響を解析することで、内リンパ水腫に対する新規治療法の確立、新たな創薬医療への展開を図る。

2. 研究の目的

ヒトおよびラット内リンパ嚢のマルチオミクス解析は世界初の試みであり、今後の内耳組織に対するプロテオミクス研究の礎・マイルストーンになる画期的な研究と考えられる。ヒト内リンパ嚢に発現する遺伝子・膜蛋白質の解析は、我々が先行研究において(J Neuroendocrinol 22(11):1157-64; J Neuroendocrinol 20(12):1295-300; ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 67(5):289-93)新しい知見を報告したのが最初である。現時点でも、ヒトおよび動物の内リンパ嚢に発現する遺伝子・蛋白質に関する質の高い網羅的解析の報告はなく、その観点から、本研究ならびに我々の先行研究が一定の学術的独自性と創造性を有することは事実である。

3. 研究の方法

難治性メニエール病および遅発性内リンパ水腫患者の手術時に採取した内リンパ嚢に発現する遺伝子について次世代シーケンサーを用いて全エクソンのエクソーム解析を行う。また内リンパ嚢組織内の脂質・水溶性代謝産物について、質量分析計(ガス・液体クロマトグラフィー質量分析計)を用いて半定量的・網羅的なメタボローム解析を行う。抽出した蛋白質に対してプロテオミクス・メタボロミクス解析を行い、内リンパ嚢に発現する膜蛋白質を網羅的に同定する。研究分担者は、ラット蝸牛に発現する膜蛋白質の網羅的・定量的プロテオミクス解析手法をすでに確立している(Eur J Neurosci 42(3):1984-2002)。対照群として、聴神経腫瘍患者の手術時に採取した内リンパ嚢に発現する遺伝子・膜蛋白質についても、同様のマルチオミクス解析を行う。

平成30年度の解析で得られたマルチオミクスデータと、患者の前庭機能、聴覚機能、そして内リンパ水腫の重症度(Gd-MRI 評価)に関する定量的データとの相関性を解析し、内リンパ水腫の形成に関与する膜蛋白質の同定を行う。まず、内リンパ水腫群の内リンパ嚢に発現する膜蛋白質を対象とし、ゲノム変異、蛋白質の質的・量的異常の有無を解析し、内リンパ水腫の形成に関与する分子を抽出する。同時に、個々の患者の前庭機能評価(フロセミドVOR、フロセミドVEMP、vHIT等)、聴覚機能評価(純音聴力検査、蝸電図検査、グルセロール検査等)、そしてGd-MRI 評価を行い、内リンパ水腫の重症度と相関する膜蛋白質の同定を行う。

内リンパ水腫群および聴神経腫瘍の内リンパ嚢のマルチオミクス解析の結果をもとに、内リンパ嚢に発現する膜蛋白質(イオンチャネル、レセプター、トランスポーター等)をそれぞれ構成分子とするイオン輸送の数理モデルを構築する(in silico モデル化)。内リンパ水腫の形

成に關与する膜蛋白質に關して、正常および内リンパ水腫モデル動物の内リンパ囊における蛋白質動態を解析する。同時に、これらの膜蛋白質に作動する薬劑の影響を解析し、上記の *in silico* モデル上でさまざまなシミュレーションを加えることで、内リンパ水腫の分子機構について考察する。研究代表者および分担者は、蝸牛に発現する膜蛋白質のオミックスを経て、蝸牛内のイオン輸送モデルをすでに構築し、蝸牛内のさまざまな病態および各種薬劑の影響について正確にシミュレーション可能であることをすでに報告した (npj Systems Biology and Applications 3:24; Pflügers Arch - Eur J Physiol 468(10):1637-1649; Proc Natl Acad Sci USA 109(23):9191-9196; Proc Natl Acad Sci USA 105(5):1751-1756)。

4 . 研究成果

本研究では、遅発性内リンパ水腫および難治性メニエール病患者のヒト内リンパ囊に発現する蛋白質について、ゲノミクス・プロテオミクス・メタボロミクス解析を行い、内リンパの吸収機構に關与する蛋白質を同定し、内リンパ水腫の分子機構の解明を目指す。臨床データとマルチオミックス解析データの相関解析を行い、同時に、正常および内リンパ水腫モデル動物の内リンパ囊における蛋白質動態についても解析を進めることで、内リンパ水腫に対する新規治療法の確立、新たな創薬医療への展開を図る。遅発性内リンパ水腫および難治性メニエール病患者のヒト内リンパ囊に対する対照群として、聴神経腫瘍患者の手術時に採取した内リンパ囊に発現する遺伝子・膜蛋白質についても、同様のマルチオミックス解析を行う。

2018年度は、予備研究として、1) ヒト外耳・中耳より採取した極少量の組織からマルチオミックス解析が可能かどうかの確認、2) 手術時に採取したヒト内リンパ囊 (難治性メニエール病患者および聴神経腫瘍患者) からマルチオミックス解析が可能かどうかの確認を行った。ヒト外耳・中耳より採取した極少量の組織からは、900種類 (軟骨膜)、700種類 (軟骨)、800種類 (結合組織) の蛋白質が同定可能であった。また、ヒト内リンパ囊 (難治性メニエール病患者および聴神経腫瘍患者) から881種類の蛋白質の同定に成功した。難治性メニエール病患者と聴神経腫瘍患者の内リンパ囊で、異なる発現を示す蛋白質が多数同定された。2019年度は、予備研究と同様の解析方法を用いて、手術時に採取したヒト内リンパ囊 (難治性メニエール病患者5例および聴神経腫瘍患者5例) をサンプルとしてマルチオミックス解析を行った。2022年度は、ヒト内リンパ囊での発現が確認された2738種類の蛋白質について、難治性メニエール病と聴神経腫瘍のそれぞれの内リンパ囊での発現量および発現パターンの比較解析を実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ota T, Nin F, Choi S, Muramatsu S, Sawamura S, Ogata G, Sato M, Doi K, Doi K, Tsuji T, Kawano S, Reichenbach T, Hibino H	4. 巻 472
2. 論文標題 Characterisation of the static offset in the travelling wave in the cochlear basal turn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 625-635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/BF01640316	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 Fujita T, Saito K, Kashiwagi N, Sato M, Seo T, Doi K	4. 巻 46
2. 論文標題 The prevalence loss of vestibular schwannoma among patients treated as sudden sensorineural hearing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 78-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.04.006	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 Seo T, Shiraishi K, Kobayashi T, Fujita T, Saito K, Doi K	4. 巻 9
2. 論文標題 Recent and Frequent Vertigo Attacks Produce Negative Findings on Furosemide-Loading Vestibular Evoked Myogenic Potential Testing in Meniere's Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.00047	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 Fujita T, Kobayashi T, Saito-K, Ikezono T, Doi K	4. 巻 10
2. 論文標題 Vestibule-Middle Ear Dehiscence Tested With Perilymph-Specific Protein Cochlin-Tomoprotein (CTP) Detection Test	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.00047	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 Noda K, Kitahara T, Doi K	4. 巻 12
2. 論文標題 Sound Change Integration Error: An Explanatory Model of Tinnitus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2018.00831	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 Saito K, Fujita T, Osak Y, Koyama H, Shiraishi K, Kobayashi T, Sato M, Seo T, Doi K	4. 巻 47
2. 論文標題 Prevalence of potential candidates for electric-acoustic stimulation implant in a hearing-impaired population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 198-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.04.006	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Doi K
2. 発表標題 VSB surgery for conductive and mixed hearing loss - the most sensitive predictable factor for speech perception with VSB -
3. 学会等名 the 56th Inner Ear Biology Workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Doi K
2. 発表標題 VSB surgery for conductive & mixed HL
3. 学会等名 the 31st Politzer Society Meeting (Spain) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Doi K
2. 発表標題 Preservation of vestibular function after cochlear implantation with round window approach (RWA)
3. 学会等名 the 30th Barony Society Meeting (Sweden) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Doi k
2. 発表標題 3D-CT analysis of the FMT angle to RW/OW after VSB surgery - its correlation to the hearing sensitivity -
3. 学会等名 the 55th Inner Ear Biology Meeting (Germany) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Doi K
2. 発表標題 VSB surgery for conductive & mixed HL
3. 学会等名 the 6th East Asian Symposium on Otology (Korea) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土井 勝美
2. 発表標題 小児の難聴と診断
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会 (招待講演)
4. 発表年 2018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
研究 分担 者	日比野 浩 (HIBINO Hiroshi) (70314317)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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
---------	---------