

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09896

研究課題名（和文）カルシウム感知受容体による新たな内耳カルシウム調節機構の解明とその応用

研究課題名（英文）The functional analysis of the calcium sensing receptor in the inner ear, and exploration of its application

研究代表者

稲垣 彰 (Inagaki, Akira)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：70405166

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の端緒は、聴覚系は恒常性の維持のために様々なメカニズムが発達しているが、生理学的な重要性にもかかわらずCa²⁺の恒常性維持のメカニズムが十分解明されていないことから、申請者のグループが発見したカルシウム感知受容体の機能の解析を目指した。ダブルノックアウトマウスを用いた表現型解析による機能解析は残念ながら成功しなかったが、本チャンネルの薬理的な制御を目指して薬剤の移行性の検討を行い、薬剤の移行性を明らかにすることができた。これらの結果はさらなる検討の基礎となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴力は社会への参加に必要なコミュニケーションになくしてはならない、必要不可欠な機能である。本研究の成果は、将来的にカルシウムの恒常性異常による聴覚異常に対する介入薬となる可能性がある。カルシウムの恒常性異常による聴覚異常の一つに加齢性難聴が挙げられ、今後高齢化社会を迎えるにあたり、本研究の成果がそれらに対する対応策を講ずるための一助となりえる。

研究成果の概要（英文）：We attempted to clarify its function in the calcium homeostasis in the cochlea by developing knockout mice, those lack calcium sensing receptor to identify its function in the inner ear. However, the elimination of calcium sensing receptor brought lethality in the offspring, therefore we tried to develop double knockout mice to ameliorate its effects in the off-target organs. Unfortunately, the attempt has not succeeded. Therefore, we focused on the pharmacological suppression of the calcium sensing receptor. In the previous project, we injected antagonists to the perilymphatic space in the inner ear directly, which hamper a various analysis due to its surgical invasiveness. To overcome this, we focused on the drug transfer in the targeted tissues, and identified the level of the drug transfer level by using tandem mass spectrometry. These outcomes are anticipated to be a reference for the further analysis in the field in the near future.

研究分野：聴覚

キーワード：カルシウム感知受容体 内耳 聴覚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の端緒は、聴覚系は恒常性の維持のために様々なメカニズムが発達している。とりわけ蝸牛は内リンパ液、外リンパ液の2つの特徴的な体液組成をもつ液体の恒常性が高い時間分解能・ダイナミックレンジを持つ聴覚受容に必要不可欠であることが知られている。カルシウム濃度も例外ではなく、内リンパ液においてカルシウム濃度を極めて低く抑えることは聴力に必要不可欠な恒常性である。

このような生理学的な重要性にもかかわらず Ca^{2+} の恒常性維持のメカニズムが十分解明されていない。 Ca^{2+} 濃度を一定の範囲に制御するためには Ca^{2+} のフィードバックメカニズムが不可欠であり、体液の Ca^{2+} 濃度の恒常性維持にも利用される Ca^{2+} センサーを用いたフィードバックメカニズムを検討したところ、内耳でカルシウム検知受容体 (Calcium sensing receptor) CaSR の発現を示す知見を得た。内耳での CaSR の発現細胞などは十分に解明されておらず、その機能も多くは不明である。そのため、本研究は CaSR の内耳における機能を明らかにすることを目的に検討を行った。

2. 研究の目的

体液の Ca^{2+} 濃度の恒常性維持にも利用される Ca^{2+} センサーを用いたフィードバックメカニズムの候補を検討したところ、内耳での CaSR の機能発現を示す知見を得た。先行研究では、蝸牛に 130 kDa の分子量を持つ CaSR が Western blotting で確認された。免疫組織化学法ではらせん靭帯の1型繊維芽細胞、supralimbal region や limbal region での発現が示唆された。本研究では、これら蝸牛に発現する CaSR の生体内における機能をより詳細に確認することを目的とした。

3. 研究の方法

カルシウム感知受容体 (calcium sensing receptor, CaSR) の内耳における機能解析を目的とした研究であり、そのため、引き続き、遺伝子の機能解析にとって強力な手法であるノックアウトマウスの作成を試みた。CaSR のノックアウトは内耳外に発現する CaSR の機能喪失によりカルシウムの代謝異常が生じ、生命維持が極めて困難で胎生致死となる。そのため、カルシウムの代謝異常をやわらげ胎生致死を回避する方法として、副甲状腺ホルモンを同時に機能喪失させる方法を選択した。

具体的には、常法に従い、pGEM-Teasy ベクター (Promega 社) を使用しコンストラクトを作成、Casr および Pth 遺伝子の翻訳域に終止コドンを誘導して、二重遺伝子欠損マウスを作製した。C57BL/6Ncr メスマウス 20 匹から計 200 個の受精卵を回収し、顕微注入に供する。その中から正常発生する約 160 個の胚を、偽妊娠マウス 6 匹に移植することで、約 30 匹の F0 マウスが得られた。これを2セット行なうことで、2-10 匹の変異マウスを得る計画であったが、本法には技術的な困難があった。

このような経過から、同時に以前我々のグループが発表した薬理的な方法による機能低下についても検討を行った。以前の報告では、ラット内耳に CaSR の拮抗薬を注入することで聴力への影響が観察された (Minakata T, Inagaki A et al. Front Mol Neurosci. 2019)。これは内リンパ液で低く抑えられるカルシウムイオンの濃度調節が聴力において強い影響を持つことを示すデータである。機能喪失マウスによる機能解析が困難であると考えられたことから、機能解析を目指した第2の案として薬剤による機能制御を行い、機能解析をする計画を立案、実行した。同時に本案は臨床応用する際に薬剤の投与経路の検討としても、有意義であろうと考えられた。

全身投与ではノックアウトマウス同様、カルシウム恒常性の破綻による生命維持に困難が予想されたことから、標的臓器への局所投与方法として、鼓室内投与を選択することとした。

CaSR 拮抗薬である NPS2143 や Calhex231 は組織毒性が懸念されたことから、先行研究として投与実績が豊富で、かつ CaSR の拮抗薬と同様にベンゼン環を有するステロイド剤 (プレドニゾン) 投与し組織移行性を検討する臨床試験法に基づく臨床研究を立案し、実施した。具体的には、プレドニゾンを鼓室内へと投与し、タンデムマススペック法を用いて各組織へのプレドニゾンの移行濃度の測定を行った。これらの予備実験では組織移行性について良好な結果を示唆する結果が得られ、結果の詳細な解析、統計処理などを行った。

4. 研究成果

機能解析には副甲状腺ホルモンも同時にノックアウトするダブルノックアウトマウスを、

Crisper 技術を用いて作成を試みている。しかし、Crisper 技術を用いた遺伝子操作では、シングルノックアウトでは安定した結果が得られているもののダブルノックアウトマウスの作成には困難があり、現在もまだ、解析に利用可能なマウスは得られなかった。バックアップのための組織内薬剤投与方法では予備実験にて良好な成績が得られ、今後の薬理的なチャネル制御の基盤となる知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Akira Inagaki, Sachiyo Katsumi, Shinji Sekiya, Shingo Murakami	4. 巻 11
2. 論文標題 Intratympanic steroid therapy for Bell's palsy with poor prognostic results	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87551-x	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 稲垣 彰	4. 巻 38
2. 論文標題 診療つれづれ 耳鼻咽喉科の外来手術室、私の工夫	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 225-227
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 稲垣彰	4. 巻 93
2. 論文標題 【手術道具・材料はこう使う!-プロに学ぶ基本とコツ】耳科領域 耳科手術材料	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 892-895
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 稲垣彰	4. 巻 31
2. 論文標題 【聴神経腫瘍における神経耳科学検査の進歩と応用】神経耳科学検査を活用した小聴神経腫瘍の治療戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 250-262
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 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 -

1. 著者名 Inagaki A, Minakata T, Katsumi S, Murakami S.	4. 巻 30
2. 論文標題 Data for temporal facial nerve recovery in Ramsay Hunt syndrome following intratympanic steroid therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data Brief	6. 最初と最後の頁 105549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2020.105549.	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 Inagaki A, Takahashi M, Murakami S.	4. 巻 46
2. 論文標題 Facial and hearing outcomes in transmastoid nerve decompression for Bell's palsy, with preservation of the ossicular chain.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Otolaryngol	6. 最初と最後の頁 325-331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/coa.13671.	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 Harabuchi Y, Kishibe K, Tateyama K, Morita Y, Yoshida N, Okada M, Kunimoto Y, Watanabe T, Inagaki A, Yoshida T, Imaizumi M, Nakamura T, Matsunobu T, Kobayashi S, Iino Y, Murakami S, Takahashi H, Tono T.	4. 巻 48
2. 論文標題 Clinical characteristics, the diagnostic criteria and management recommendation of otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (OMAAV) proposed by Japan Otolological Society.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 2-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2020.07.004.	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 Inagaki A, Minakata T, Katsumi S, Murakami S	4. 巻 42
2. 論文標題 RESPONSE TO LETTER TO THE EDITOR: "EFFECT OF INTRATYMPANIC DEXAMETHASONE ON BELL'S PALSY: LETTER TO THE EDITOR"	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otol Neurotol	6. 最初と最後の頁 483-484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002972.	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 Inagaki A, Kojima A, Ogawa M, Sakata T, Iwasaki S.	4. 巻 27
2. 論文標題 Imaging manifestations on sequential magnetic resonance imaging in pharyngolaryngeal involvement by varicella zoster virus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurovirol.	6. 最初と最後の頁 186-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13365-021-00953-5.	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 -

1. 著者名 Inagaki A, Minakata T, Katsumi S, Murakami S.	4. 巻 410
2. 論文標題 Concurrent Treatment With Intratympanic Dexamethasone Improves Facial Nerve Recovery in Ramsay Hunt Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of neurological sciences	6. 最初と最後の頁 116678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.116678	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 -

1. 著者名 Inagaki A, Minakata T, Katsumi S, Murakami S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Concurrent Treatment With Intratympanic Dexamethasone for Moderate-Severe Through Severe Bell's Palsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otolology Neurotology	6. 最初と最後の頁 e1018-e1023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002377.	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 -

1. 著者名 Eliezer M, Tran H, Inagaki A, Vérillaud B, Takahashi M, Marie JP, Hautefort C, Herman P, Murakami S, Kania R.	4. 巻 40
2. 論文標題 Clinical and Radiological Characteristics of Malignant Tumors Located to the Cerebellopontine Angle and/or Internal Acoustic Meatus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otolology Neurology	6. 最初と最後の頁 1237-1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002360.	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 該当する

1. 著者名 Minakata T, Inagaki A, Yamamura A, Yamamura H, Sekiya S, Murakami S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Calcium-Sensing Receptor Is Functionally Expressed in the Cochlear Perilymphatic Compartment and Essential for Hearing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci	6. 最初と最後の頁 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2019.00175	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 -

1. 著者名 Mariko Takahashi, Akira Inagaki, Noritaka Aihara, Shingo Murakami	4. 巻 142
2. 論文標題 Acoustic neuromas associated with sudden sensorineural hearing loss.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta oto-laryngologica	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2022.2080862	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 -

1. 著者名 Akira Inagaki, Mariko Takahashi, Shingo Murakami	4. 巻 0
2. 論文標題 Frequency dependent hearing outcomes with or without preservation of intact ossicular articulations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.1001	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 稲垣彰 関谷真二 南方寿哉 高橋真理子 村上信五 岩崎真一
2. 発表標題 顔面神経減荷術
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣彰 村上信五 岩崎真一
2. 発表標題 顔面神経減荷術
3. 学会等名 日本顔面神経学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣彰
2. 発表標題 顔面神経減荷術
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣彰 村上信五 岩崎真一
2. 発表標題 Bell 麻痺に対する経乳突顔面神経減荷術の効果
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣彰
2. 発表標題 神経耳科学検査を活用した小聴神経腫瘍の治療戦略
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 村上, 信五, 蒲谷, 嘉代子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 292
3. 書名 症状から一発診断!耳鼻咽喉科専門医はこう見立てる	

1. 著者名 大森, 孝一, 野中, 学, 小島, 博己	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 448
3. 書名 標準耳鼻咽喉科・頭頸部外科学	

〔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	鶴川 眞也 (Ugawa Shinya) (20326135)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	山村 寿男 (Yamamura Toshio) (80398362)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903)	
研究分担者	関谷 真二 (Shinji Sekiya) (50770591)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	

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