

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18768

研究課題名(和文)メニエール病における抗利尿ホルモンによるアクアポリン2の細胞内局在に関する研究

研究課題名(英文)Localization of Aquaporin-2 regulation by vasopressin in Meniere's disease.

研究代表者

上原 奈津美(Natsumi, Uehara)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40570502

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):メニエール病における内リンパ水腫形成の機序に抗利尿ホルモン(VP)とそれに制御されるアクアポリン2(AQP2)が深く関与することが明らかになってきた。本研究では、マウスを用いて蝸牛でのVP制御によるAQP2発現局在の変化と内リンパ水腫形成機序の解明を試みた。免疫染色及びin-situ hybridization法で蝸牛全体にAQP2の弱発現が見られた。抗利尿ホルモン投与で血管条基底細胞側にAQP2の発現が増強しリチウム投与ではその発現減弱の傾向が見られた。さらなる検討が必要だがAQP2は蝸牛全体に発現分布し、抗利尿ホルモンなどの要因で発現局在が変化し内リンパ水腫形成に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メニエール病はめまい発作と難聴を繰返し、徐々に難聴が進行する原因不明の疾患で、生活環境やストレスが発症誘因の一つとされ現時点では根本的治療薬はない。メニエール病の病理組織学的な特徴は内リンパ水腫である。本研究によりストレスホルモンである抗利尿ホルモンの増減が要因で蝸牛内での発現局在が変化し内リンパ水腫形成に関与している可能性が考えられた。内耳の抗利尿ホルモンとAQP2システム解明に一步近づいたと考えられる。今後さらなる検討が進みメニエール病の内リンパ水腫形成の一側面を明らかになれば、そのシステム阻害薬など新たな治療薬の開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文):Previous studies have suggested a close relationship between vasopressin (VP), aquaporin-2 (AQP2) and endolymphatic hydrops in Meniere's disease. In this study, we tried to investigate the localization of AQP2 regulated by vasopressin and elucidate the mechanism of endolymphatic hydrops formation in mice. Immunostaining and in-situ hybridization revealed weak expression of AQP2 in the whole cochlea. Administering of VP increased the expression of AQP2 on the basal cell side of the stria vascularis, while that of lithium decreased the expression of AQP2. Further studies are needed, but it is possible that AQP2 expression is distributed throughout the cochlea and that factors such as VP may change its localization and relate with the formation of endolymphatic hydrops.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：メニエール病 内リンパ水腫 アクアポリン 抗利尿ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メニエール病はめまい発作と難聴を繰返し、徐々に難聴が進行する原因不明の疾患で、生活環境やストレスが発症誘因の一つとされ現時点では根本的治療薬はない。

メニエール病の病理組織学的な特徴は内リンパ水腫である。近年、内リンパ水腫形成の機序に抗利尿ホルモン(VP)とそれによって制御されるアクアポリン2(AQP2)が深く関与することが明らかになってきた。腎臓では、尿の濃縮においてVP依存性にAQP2の細胞内分布が変化しそのメカニズムが報告され尿崩症との関連も確認されている。しかし内耳におけるVPによるAQP2の制御に関してはまだ解明されていない。

2. 研究の目的

これまでの研究で、メニエール病患者でVPが上昇し内耳でのAQP2の発現が亢進していることはわかっているが内耳でのVPとAQP2の制御機構と内リンパ水腫形成のメカニズムはわかっていない。そこで今回の研究では、腎臓でみられるようなVPによるAQP2の細胞内移動と内リンパ水腫形成のメカニズムの解明が必要と考えた。

今回我々はマウスを用いて、抗利尿ホルモンを負荷し、AQP2の細胞内移動とタンパク量の経時的な変化を分子生物学的に検討し内リンパ水腫形成の機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス内耳におけるAQP2の発現

免疫染色

マウスを深麻酔下に腎臓および側頭骨(内耳)を採取した。ホルマリンでの浸漬固定後にEDTAにて脱灰し、凍結切片を作成した。それぞれの凍結切片に対して、一次抗体を抗マウスAQP2抗体、二次抗体を蛍光抗体とし、ポジティブコントロールとしてすでにAQP2の発現が確認されている腎臓でまずAQP2の発現を確認した。つぎに、側頭骨切片で内耳でのAQP2の発現を確認した。

in-situ hybridization法

蛍光免疫染色以外の手段として、in-situ hybridization法を用いてmRNAレベルでのAQP2の発現を同様に確認した。

(2) VP単回投与による内耳血管条のAQP2発現の変化

マウスへ抗利尿ホルモンを腹腔内投与し、AQP2発現を増強することで血管条へのAQP2発現が増強するか確認を行った。抗利尿ホルモンはデスモプレシン酢酸塩水和物注射液を用い、投与量は50 μ g/kgとした。抗利尿ホルモン投与後20分、投与後1時間時点でサクリファイスし、内耳血管条を観察した。

(3) 抗利尿ホルモン慢性投与での内耳血管条および腎臓でのAQP2発現の変化

(2)と同様にデスモプレシン酢酸塩水和物注射液を用い、投与量は50 μ g/kgとし、連続5日間1日一回腹腔内投与を行い、5日目の投与後にサクリファイスし、内耳血管条を観察した。また、腎臓も摘出し、同様に染色を行い、AQP2の発現の変化を確認した。

(4) リチウム慢性投与での内耳血管条および腎臓でのAQP2発現の変化

AQP2発現を抑制するリチウムを投与し、内耳血管条および腎臓でのAQP2発現の変化を確認した。リチウム製剤として塩化リチウムを使用し、0.2mol/Lの濃度に調整した塩化リチウム液を作成した。マウス体重の2%量を腹腔内に連続5日間1日一回腹腔内投与を行い、5日目の薬剤投与後にサクリファイスし、内耳血管条・腎臓を観察した。

4. 研究成果

(1) 免疫蛍光染色

ポジティブコントロールの腎臓では、集合管内腔へのAQP2集積を確認できた。蝸牛では、蝸牛全体に染色され自家蛍光の可能性も考えられた。染色時間を短縮すると先行研究で確認されている血管条の基底細胞ではなく辺縁細胞側でより強い発現を認めた。(図1a,b)

in-situ hybridization法を用いてmRNAレベルでのAQP2の発現

免疫染色同様血管条のみならず、ラセン神経節やライスナー膜、基底膜といった蝸牛全体でAQP2 mRNAへの集積を認めた(図1c)。

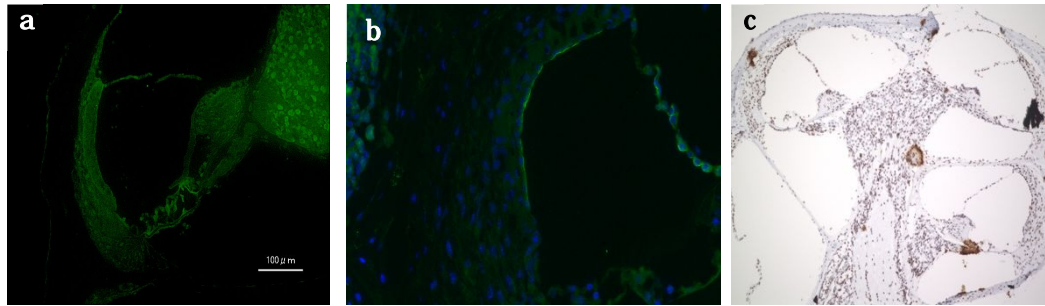


図 1
AQP2 の発現
a. 蝸牛全体的に発現
b. 血管条辺縁細胞側が強く発現
c. in-situ hybridization でも蝸牛全体に発現

(2) 抗利尿ホルモン投与による内耳血管条の AQP2 発現の変化

抗利尿ホルモンの単回投与での AQP2 発現変化はみられなかったため、慢性投与での AQP2 発現の変化を確認した。

(3) 抗利尿ホルモン慢性投与での内耳血管条および腎臓での AQP2 発現の変化

抗利尿ホルモンの慢性投与を行ったマウスでは血管条辺縁細胞の発現は変わらないが基底細胞に線状（黄色矢）に AQP2 発現増強の傾向があった（図 2a,b）。

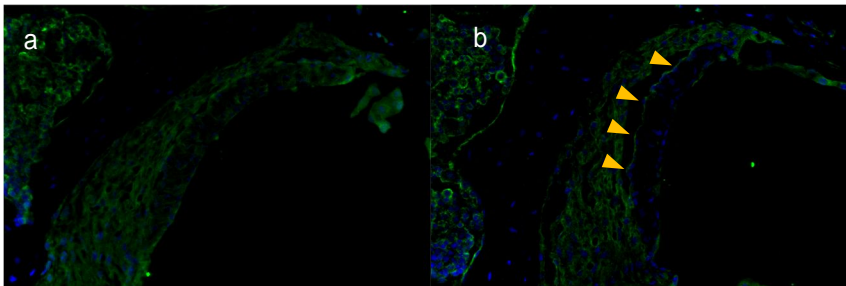


図 2. 抗利尿ホルモン投与での AQP2 発現変化 黄色矢印：血管条基底細胞
a コントロール、b 抗利尿ホルモン慢性投与

(4) リチウム投与での内耳血管条および腎臓での AQP2 発現の変化

コントロールと比較すると、血管条辺縁細胞側の AQP2 の発現に変化はないが、基底細胞側の AQP2 の発現が、塩化リチウム投与した個体では減弱傾向であった（図 3a,b）。

(5) まとめ

免疫染色及び in-situ hybridization 法で蝸牛全体に AQP2 の弱発現が見られた。抗利尿ホルモン投与で血管条基底細胞側に AQP2 の発現が増強しリチウム投与ではその発現減弱の傾向が見られた。当初想定していた細胞内での AQP2 の局在変化までは確認できなかったが、AQP2 は蝸牛全体に発現分布し、抗利尿ホルモンなどの要因で蝸牛内での発現局在が変化し内リンパ水腫形成に関与している可能性が考えられた。

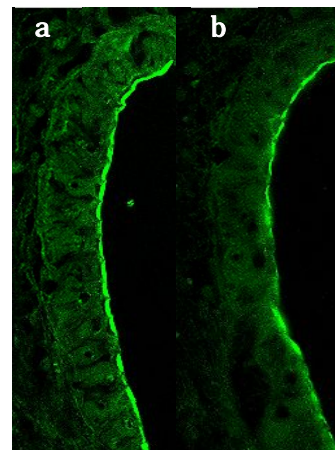


図 3. 塩化リチウム投与での AQP2 発現変化
a コントロール、b 塩化リチウム投与群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Uehara Natsumi, Fujita Takeshi, Yamashita Daisuke, Yokoi Jun, Katsunuma Sayaka, Kakigi Akinobu, Nishio Shin-ya, Nibu Ken-ichi, Usami Shin-ichi	4. 巻 67
2. 論文標題 Genetic background in late-onset sensorineural hearing loss patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 223 ~ 230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-021-00990-2	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0件

〔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
---------	---------