

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18805

研究課題名（和文）直線加速度刺激装置を用いたP2X2受容体ノックアウトマウスでの耳石器機能の研究

研究課題名（英文）Otolith function in P2X2 receptor knockout mice using a linear acceleration stimulator.

研究代表者

原田 祥太郎 (Harada, Shotaro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10824740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：P2X2受容体は、陽イオン透過性イオンチャネル内蔵型受容体で内耳に存在し、内耳内リンパ腔の組成イオンであるカリウムイオンの調整に関与している。当研究室では、P2X2受容体のKOマウスを所有しており、このマウスに対して、前庭機能の評価を行った。以前の研究で半規管機能が低下していることを確認しており、今回の実験では、もう一つ存在する前庭器官である耳石器についてその機能評価を行った。P2X2KOマウスとWTでは、耳石器動眼反射に有意な差は認めなかった。この結果からP2X2受容体は半規管機能に影響を及ぼすが、耳石器機能には影響を及ぼさないことが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

P2X2受容体の遺伝子変異は、ヒトでは常染色体優性遺伝の形式をとり、10から20歳代までに中から高音域を中心とした進行性の感音難聴を認め、前庭機能には異常を認めないとされている。P2X2受容体は、陽イオン透過性イオンチャネル内蔵型受容体であり、内耳内のKイオン濃度を調整し、内耳では蝸牛の有毛細胞、ラセン神経節、支持細胞や外有毛細胞の不動毛に存在することが報告されている。以前の当研究室の研究では、P2X2受容体KOマウスでは、半規管機能の低下を認めていた。今回、耳石器機能の評価を行ったが、耳石器機能の異常は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：The P2X2 receptor is a cation-permeable ion channel-embedded receptor located in the inner ear and is involved in the regulation of potassium ion, a composition ion of the endolymphatic cavity of the inner ear. Our laboratory has KO mice for P2X2 receptors, and we evaluated vestibular function in these mice. Since previous studies have confirmed that the semicircular canal function is impaired, in this experiment, we evaluated the function of the otolith, the other vestibular organ that is present.

No significant difference in otolith oculomotor reflex was observed between P2X2KO, WT mice. These results suggest that P2X2 receptors affect semicircular canal function but not otolith function.

研究分野：内耳平衡機能

キーワード：前庭機能 P2X2受容体 内耳

### 1. 研究開始当初の背景

P2X2 受容体の遺伝子変異は、ヒトでは常染色体優性遺伝の形式をとり、非症候群性難聴(DFNA)の一つである DFNA41 と命名されている。DFNA41 患者は、10 から 20 歳代までに中から高音域を中心とした進行性の感音難聴を認める。Blanton らは、DFNA41 患者に対して、ロンベルグ試験、カロリック検査などを行った結果、前庭機能には異常を認めなかったと報告している(Blanton et al. J Med Genet 2002)。

P2X2 受容体は、陽イオン透過性イオンチャンネル内蔵型受容体であり、細胞外のアデノシン三リン酸(ATP)により駆動し、内耳内リンパ腔内の  $K^+$  を内リンパ腔外へ排泄し、内耳内リンパ腔内の  $K^+$  濃度の調節に関わる。内耳では蝸牛の有毛細胞、ラセン神経節、支持細胞や外有毛細胞の不動毛に存在することが報告されている(Julie C.-C.Wamng, et al. NEURO REPORT 2003)。

P2X2 受容体ノックアウトマウスでは、以前から難聴が生じることは報告されていた。難聴の原因として、蝸牛内リンパ腔内の  $K^+$  濃度の上昇により、内リンパ腔内の  $K^+$  の均衡が崩れるため進行性難聴が生じていると推察されている(Yan et al. PNAS 2013)。

我々のグループは P2X2 受容体が以前の報告とは異なり、内耳の前庭(耳石斑を含む前庭終末組織、球形嚢、卵形嚢、外側半規管膨大部)にも存在することを明らかにした。P2X2 受容体が外側半規管膨大部に存在することをうけ、前庭動眼反射検査(vestibulo-ocular reflex; VOR)を用いて半規管機能を評価したところ、P2X2 受容体ノックアウトマウスでは DFNA41 患者とは異なり、半規管機能が低下していることを確認した(Takimoto et al. Neuroscience 2018.)。本研究においては、我々のグループのみが所有する直線加速度刺激装置を用いて P2X2 受容体ノックアウトマウスでの耳石器機能の評価をする。

### 2. 研究の目的

我々のグループの研究から P2X2 受容体は、外側半規管膨大部だけではなく、耳石器である卵形嚢、球形嚢にも存在していたことから、耳石器機能の低下も生じていると推察される。本研究では我々のグループのみが所有する直線加速度刺激装置を用いて、P2X2 受容体ノックアウトマウスの耳石器機能の評価をする。

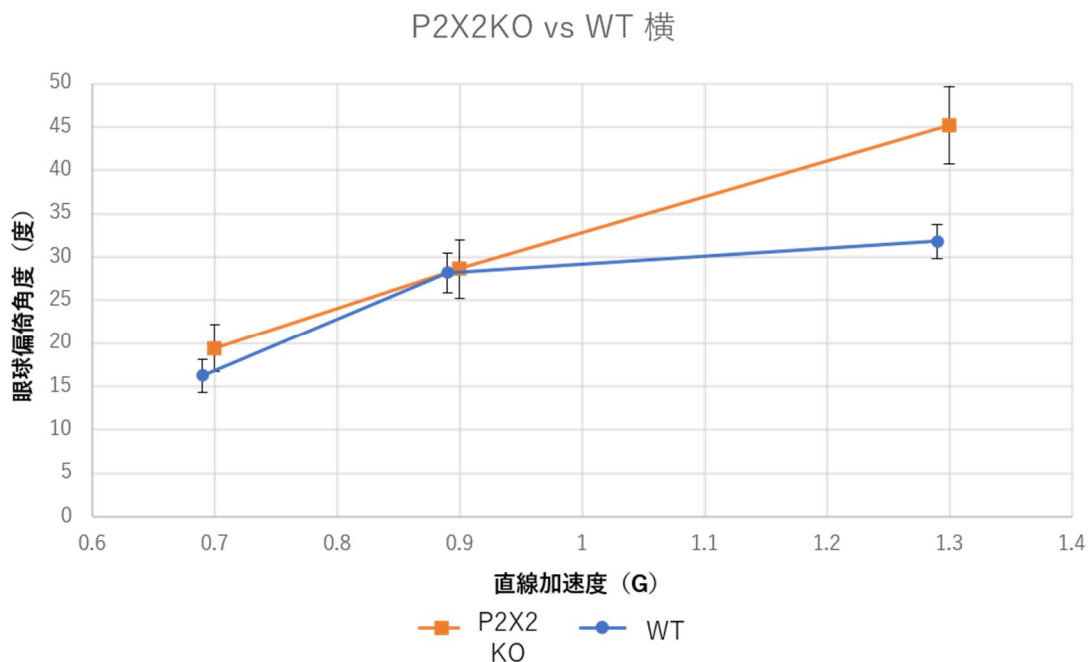
### 3. 研究の方法

前庭機能の評価法について、ヒトやマウスの動作時には相対的に景色が移動するので、網膜上に景色の像を固定するためには空間内で視線の方向を一定に保つ眼球運動が必要であり、この眼球運動は半規管、耳石器を介した反射である前庭動眼反射と視覚を介した反射である視運動性眼球運動から構成される。暗所では視運動性眼球運動は誘発されないため前庭動眼反射のみが誘発される。よって暗所での頭部運動時の眼球運動を解析すれば三半規管、耳石器の機能が評価できる。ヒトやマウスの動作は回転の動きと直線的な動きから構成される。回転の動きは三半規管で感受され半規管動眼反射を誘発し、直線的な動きは耳石器で感受され耳石動眼反射を誘発する。よって暗所での回転刺激時に誘発される眼球運動を計測すれば半規管機能が、直線加速度刺激時に誘発される眼球運動を計測すれば耳石器機能が評価できる。我々のグループでは、マウスの回転刺激装置(Imai T, et al. PLoS ONE 2016)と linear sled を用いた直線加速度刺激装置の両装置を開発し、その解析結果、さらに三次元眼球運動解析装置(Imai T, et al. PLoS

ONE 2016、Acta Otolaryngol 1999) を所有しており、前庭機能を半規管、耳石器と個別に計測することができ、その眼球運動を三次元的に解析できることも我々のグループ独自のものである。

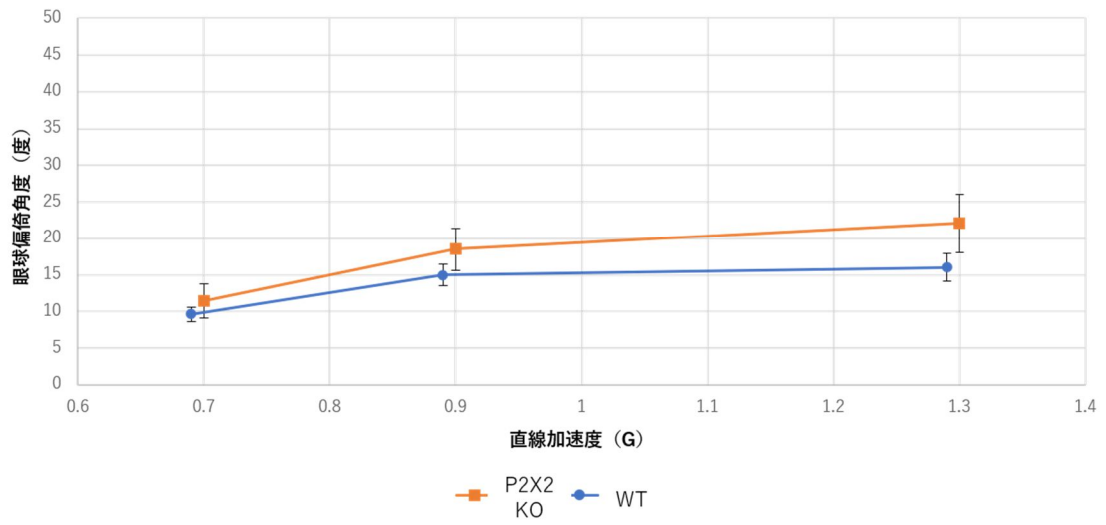
#### 4. 研究成果

P2X2 受容体の K0 マウスに対して、今回前庭機能の評価を行う事とした。当研究室では、以前の研究で P2X2RK0 マウスでは、半規管機能が低下していることを確認した。今回の実験では、前庭器官にもう一つ存在する耳石器についてその機能評価を行った。耳石器の機能評価には、耳石器動眼反射を用い、耳石器への刺激は、直線移動による直線加速度を用いた。直線加速度の刺激方向として、両耳間軸と鼻尾軸に直線加速度が付加されるように直線移動させ、加速度刺激は、3段階で変化させた。耳石器動眼反射の評価法は、我々が開発した、垂直方向の眼球の偏倚角度を用いて行った。比較対象として、WT マウス、P2X3RK0 マウスを用いた。P2X3RK0 マウスを用いた理由として、P2X3 受容体は内耳には存在しておらず、同種の受容体のノックアウトマウスを用いることにより P2X 受容体が内耳においてどのような役割を担っているか確認するためである。P2X2KO マウスと WT、P2X3KO マウスでは、耳石器動眼反射に有意な差は認めなかった。この結果から P2X2 受容体は半規管機能に影響を及ぼすが、耳石器機能には影響を及ぼさないことが推察された。半規管、耳石器受容器を満たしているのは同じ内リンパ液であるが、なぜ半規管機能は低下し、耳石器機能は維持されるか原因は不明である。そのメカニズムに究明については今後の課題である。



直線加速度刺激による耳石器動眼反射では、両耳間方向に刺激を加えた際に有意差は認めなかった。

P2X2KO vs WT 縦



直線加速度刺激による耳石器動眼反射では、鼻尾軸方向に刺激を加えた際に有意差は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田 祥太郎
2. 発表標題 マウスのlinear vestibulo-ocular reflexの三次元解析
3. 学会等名 第79回日本めまい平衡医学学会
4. 発表年 2020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
---------	---------