

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591987

研究課題名（和文）内耳水代謝における水チャネルとイオン共輸送体の水ポンプとしての役割に関する研究

研究課題名（英文）The role of water channel of aquaporins and water pump of Na-K-2Cl co-transporter on the water homeostasis of the inner ear.

研究代表者

竹田 泰三（TAKEDA TAIZO）

高知大学・名誉教授

研究者番号：50115763

研究成果の概要（和文）：蝸牛血管条、内リンパ囊でAQP2を含む多くのaquaporin、vasopressin type 2 receptor、及びNKCC1が発現することを分子生物学、組織科学的に示した。Vasopressin, bumetanide, OPC-31260の負荷は血管条の細胞間隙に影響を与えるので、AQP2-vasopressin系とNa-K-Cl共輸送体の水輸送が内耳水代謝に常用な役割を演じることを立証した。

研究成果の概要（英文）：The expressions of many subtypes of aquaporins (AQP) including AQP-2, vasopressin type 2 receptor, and NKCC1 were molecular biologically and immunohistochemically evaluated. Since the application of vasopressin, bumetanide, and OPC-31260 exerted the morphological influence on the intrastrial space, AQP2-vasopressin mediated water transport and water flow through the Na-K-Cl co-transporter might work actively in the inner ear fluid homeostasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、耳鼻咽喉科学

キーワード：aquaporin、イオン共輸送体、血管条、内リンパ囊

1. 研究開始当初の背景

内耳は、特殊なイオン組成を持つ内・外リンパ液からなる液体で主に構成されている。内耳が正常な機能を営むには、これらの液成分の恒常性維持が必要不可欠である。この恒常機構が破綻した代表例がメニエール病組織に見られる内リンパ水腫である。内耳液の恒常機構は、互いに不可分な水・電解質代謝からなるが、水代謝は、その化学的特性や電気的特性が中性のため、研究手段に乏しく、あまり顧みられることがなかった。しかし、1991

年、その構成蛋白であるaquaporin (AQP) 1の発見以来、多くの水チャネル構成蛋白が発見され、急速にその詳細が解明され、水の代謝に水チャネルが重要な役割を演じていることが判明してきた。申請者らは、メニエール病の本態である内リンパ水腫の成因を巡り研究を進めてきたが、メニエール病をはじめとする内リンパ関連疾患でストレスホルモンの1つである血漿 arginine vasopressin (AVP) 値が有意に高いこと (Acta Otolaryngol Suppl (Stockh) 519:219-222,

1995)、メニエール病の発作がしばしばストレスによって誘発される(Acta Otolaryngol Suppl (Stockh) 528:109-112, 1997)ことに着目し、内耳液のホメオスターシスがストレスホルモンによって制御を受けるとの作業仮説に到達した。この作業仮説を検証する過程で、申請者らも内耳液の水代謝機構を解明するには水チャネルを無視しては出来ないこと、さらに、内リンパ水腫の成因を解明するのはAVPとそれによって作動するAQP2による水代謝システム(AVP-AQP2 system)の内耳での動態をよく知らねばならないとの結論に達した。以下、申請者らが検証してきたAVP-AQP2 systemの内耳動態の研究成果を要約する。

1) AQP2、AQP3 と renal-type AVP receptor (V_2 -R)は蝸牛では血管条基底細胞に、内リンパ嚢では intermediate part の上皮細胞に局在することが組織科学的に判明した(43rd Inner Ear Biology Workshop 2007 で発表: Abstract pp. 55, pp.114.)。

2) 血管条基底細胞とギャップ結合でつながっている中間細胞に AQP1 が局在することが免疫電顕で確認された(Hearing Res 181: 15-19, 2003)。よって、血管条では基底細胞と中間細胞が一体となって水の通路になると考えられる。

3) 血管条辺縁細胞の頂部には AQP7 と AQP9 が発現する(44th Inner Ear Biology Workshop 2007 で発表)。

4) 血管条のすべての細胞、内リンパ嚢上皮、前庭感覚上皮に AQP6 が発現(Acta Otolaryngol (in press))。

4) AVP の負荷で、 V_2 -R mRNA は down-regulation し (Neuroreport 8: 2289-2292, 1997, 10: 1205-1207, 1999)、AQP2 mRNA は up-regulation することが判明した(Neuroreport 13:1127-1129, 2002)。

5) V_2 -receptor の拮抗薬(OPC-31260)は蝸牛、内リンパ嚢での AQP2 mRNA の発現を抑制する(Hearing Res 182: 9-18, 2003)。

6) AVP の慢性投与は内リンパ水腫を形成し(Hearing Res 140: 1-6, 2000)、 V_2 -antagonist の負荷は内耳虚脱を誘発する(Hearing Res 182: 9-18, 2003)。 V_2 -antagonist の負荷は内リンパ水腫の治療に応用可能で、その場合は正円窓経由の負荷が最適である。(Hearing Res 218 :89-97, 2006)。

7) AVP-AQP2 systemの細胞内signal伝達の阻害剤であるlithiumを負荷すると、AQP2 mRNA、AQPタンパクの発現が抑制され、内耳も虚脱する(ORL 67: 282-8, 2005)。

以上の研究成果より、まず、内耳の水代謝は、少なくとも部分的には、AVP-AQP2 system によって制御されているとの結論に達した。そして、従来から考えられている様に水代謝の

主な部位は血管条と内リンパ嚢であることが確認された。現在、血管条では AQP1, 2, 3, 6, 7, 9 の6種、内リンパ嚢では AQP1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 の7種の水チャネル構成蛋白が発現することが予備事件で判明している。特に、血管条での AQP の局在は免疫電顕でほぼ決定された。そこで、内耳 AVP-AQP2 system を解明するには、まず、血管条内でのより詳細な水の動きを検討し、しかる後、血管条をモデルとして、内リンパ嚢の水の動きを検討するのが妥当との考えに至った。

2. 研究の目的

イオンチャネルに対してイオンポンプがあるように、水チャネルが発見されて以来(molecular) water pump の存在が示唆されている(Loo et al., J Physiol 542: 53-60, 2002, Zeuthen et al., Int Review Cytol 215: 259-284)。彼らの考えでは、cotransporter で ion と水が coupling して、イオン勾配、浸透圧勾配に関係なく水が輸送されるとして、Water pump と命名している。詳細な研究は、K/Cl cotransporter に関しては脈絡叢で、 H^+ /glucose に関しては網膜で、Na/glucose cotransporter に関してはアフリカツメガエルノ卵母細胞で、Na-K-Cl cotransporter は眼の毛様体色素上皮でなされているが、内耳に関しては前庭 I 型細胞と血管条が **NKCC1** を経由した水の流入によって細胞容積変化が起こる可能性が記載されているのみである(Rennie et al., Am J Physiol 273: C1972-C1980, 1997, Santi et al., Hearing Res. 12: 151-165, 1983, Takeuchi et al., Hearing Res 113: 99-109, 1997)。本研究の主目的は、血管条、内リンパ嚢の AQP の分布と V_2 -R の局在を解明すると同時に、辺縁細胞基底側の **NKCC1** が AVP-AQP2 system によって調整される血管条の水の通路として機能しているかどうか、機能しているとすればどの程度のものかを検証することである。すなわち、AVP を負荷して血管条の細胞間隙への水の流入を増やした場合、 V_2 -antagonist によって内耳 AVP-AQP2 system を抑制した場合、**NKCC1** を loop 利尿剤で阻害した場合の3つの条件を変え、血管条の細胞間隙への影響を検証し、今まで未解明であった水代謝に関わる現象を理解する足掛かりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) AQP1-12、及び vasopressin type 2 receptor (V_2 -R) と NKCC の局在を RT-PCR 法、免疫組織学的に検討する。用いる動物は rat で、免疫組織学的手法としては、通常免疫蛍光顕微鏡法以外に免疫電顕法も用いた。

2) Guinea pigにAVP負荷,bumetanideの外リンパ灌流による血管条細胞間隙の拡大を電顕組織で観察、定量評価を行った。さらに、VPの拮抗薬であるOPC-31260の前投与が前述した血管条細胞間隙の拡大にいかなる影響を及ぼすかも検討した。

4. 研究成果

1) AQP-1は中間細胞に、AQP-2,と-3は基底細胞に、AQP-7, -9 と-11は辺縁細胞の管腔側に発現することが明らかになった。また、AQP-4, -5は血管条に発現しないことが判明した。なお、AQP-6は血管条のすべての細胞に瀰漫性に発現するが、膜タンパクでないので血管条の細胞膜を通しての水代謝には関与しないものと考えられた。また、V2-Rは基底細胞に発現した。

2) 内リンパ嚢にも血管条と同様にAQP-1, -2, -3, -4, -8, -9, -11及び、vasopressin type 2 receptorとNKCC1, 2が発現することが分かった。

3) 免疫電顕でAQP-2とV2-Rが血管条基底細胞の外側に、AQP-3が内側に、AQP-1は中間細胞の細胞膜に、AQP-7と-9は辺縁細胞頂部に局在することが確認できた。

3) 以前の我々の報告と同様、bumetanideでNKCC1を阻害すると血管条の細胞間隙に水の貯留が認められるが、同様の現象がVPを負荷しても認められ、VPのantagonistを前負荷するとVPやbumetanideで生じる血管条の細胞間隙が消失することが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6件)

- ① Taguchi D, Takeda T, Kakigi A, Okada T, Nishioka R, Kitano H. Expression and immune-localization of Aquaporin-6 (Aqp6) in the rat inner ear. Acta Otolaryngol 査読有、128, 2008, 832-840
- ② Kakigi A, Nishimura M, Takeda T, Taguchi D, Nishimura R. Expression of Aquaporin1, 3, and 4, NKCC1, and NKCC2 in the Human Endolymphatic Sac. Auris Nasus Larynx. 査読有. 36, 2009, 135-139.
- ③ Taizo Takeda, Setsuko Takeda, Akinobu Kakigi, Rie Nishioka, Daizo Taguchi, Masahiko Nishimura, Hiroaki Nakatani.

Hormonal Aspects of Ménière's Disease on the Basis of Clinical and Experimental Studies. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 査読無, 71 (Suppl 1) 2010, 1-9.

- ④ Nishimura M, Kakigi A, Takeda T, Okada T, Doi K. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 査読無, 71 (Suppl 1), 2010, 10-15.
- ⑤ Nishioka R, Takeda T, Kakigi A, Okada T, Takebayashi S, Nishimura M, Taguchi D, Hyodo M. Expression of Aquaporins and Vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea. Hear Res. 査読有, 260, 2010, 11-19.
- ⑥ Nishimura M, Kakigi A, Takeda T, Okada T, Doi K. Time course changes of vasopressin-induced enlargement of the rat intrastrial space and the effects of a vasopressin type 2 antagonist. Acta Otolaryngol 査読有, 129, 2009, 709-15

[学会発表] (計 2件)

- ① Nishimura M, Kakigi A, Takeda T, Takeda S, Nishioka R, Doi K. Expression of aquaporins, vasopressin type 2 receptor, and Na⁺-K⁺-Cl cotransporters in the rat endolymphatic sac. 45th Inner Ear Biology Workshop. Sept 22, 2008, Ferrara, Italy.
- ② Kakigi A, Nishimura M, Takeda T, Taguchi D, Nishioka R. Expression of aquaporin1, 2, 3, and 4, NKCC1, and NKCC2 in the human endolymphatic sac. 45th Inner Ear Biology Workshop Sept 23rd, 2008, Ferrara, Italy.

[図書] (計 1件)

- ① Takeda T, et al. Springer, Handbook of Experimental Pharmacology 190, Aquaporins (ed. by Beit E). Aquaporins as potential drug targets for Meniere's disease and its related diseases, 2009, 171-184

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 泰三 (TAKEDA TAIZO)

高知大学・名誉教授

研究者番号: 50115763

(2)研究分担者

西岡 利恵 (NISHIOKA RIE)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：20398051

柿木 章伸 (KAKIGI AKINOBU)
東京大学・医学部・講師
研究者番号：60243820
(H20.4～H22.3末)