

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791890

研究課題名(和文)メニエール病(内リンパ水腫)の質量分析イメージングを用いた解析

研究課題名(英文)Phosphatidylcholine Species in the endolymphatic hydrops by Mass Microscopy

研究代表者

杉山 健一(Sugiyama, Kenichi)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50402334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：質量顕微鏡法は異なる脂肪酸組成を持つPCの分布を明らかにできる唯一の手法である。マウスの内耳の解析をおこなった。蝸牛と同時に前庭も摘出し前庭の質量顕微鏡を用いた解析を試みた。質量顕微鏡を用いた解析では、凍結切片が適しており、解析可能な切片を作成できるか検討し、耳石器や膨大部稜などを確認した。PC(16:0/18:1)は耳石器にたる神経線維や、膨大部稜の感覚上皮に至る神経線維、PC(16:0/20:4)は耳石器の感覚上皮や膨大部稜の感覚上皮に局在傾向を示した。コルチ器に局在していた、PC(16:0/16:1)は、前庭の感覚上皮には局在傾向が見られずコルチ器と異なる傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：We recently developed a mass microscope consisting of a mass spectrometry imager with high spatial resolution equipped with an atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization and quadrupole ion trap time-of-flight analyzer. Phosphatidylcholine (PC), a phospholipid, is a basic structural component of cell membranes. The distributions of PC species in the inner ear have not been fully understood. In this study, we extended the use of our mass microscope to the mouse inner ear with special attention to the vestibular organ. We clearly localized some PC species in the vestibular organ and cochlea. PC (16:0/20:4) was observed mainly in the vestibular sensory cells and PC (16:0/18:1) was highly localized in the nerve fiber under sensory cells. PC (16:0/16:1) was found primarily in the organ of Corti. These distributional differences may be associated with the cellular architecture of these inner ear regions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳科学

キーワード：脂質 内耳

1. 研究開始当初の背景

1861年にProsper Meniereが突然の高度難聴、めまい症例の剖検例で内耳半規管に血性浸出物があることを初めて報告し、めまいが内耳障害によることを明らかにした。1938年に、山川らがメニエール病の剖検例の報告をし、初めて内リンパ水腫の存在を指摘した。以後、メニエール病の病態は内リンパ水腫であることが認知されている。

しかし、なぜ内リンパ水腫がおこるのかという発症メカニズムについては遺伝要因、解剖学的要因、ウイルス感染、血管障害など多くの要因が言われてはいるがいまだ明らかになってはいない。

我々は、質量分析イメージングを正常なモルモット蝸牛の解析に応用し、リン脂質の一種であるホスファチジルコリン(PC)の脂肪酸組成の違いによる蝸牛管における局在を明らかにし、この手法が内耳研究に有用であることを示した(Takizawa et al.: Specific localization of five phosphatidylcholine species in the cochlea by using mass microscopy. *Audiol Neurootol*.16:315-22.2011.)。

この手法を用いて、内リンパ水腫の解析を目指すものである。

2. 研究の目的

メニエール病を対象とした研究のほとんどはイオンチャネルやタンパク質をターゲットとしたものである。脂質に関するものは少ない。脂質解析では、生化学的手法を用いることが多いが、この際、詳細な位置情報が失われてしまうという欠点がある。質量分析イメージングでは、その欠点を克服でき、質量分析を、組織切片上で直接行うことでその分布を明らかにすることができる手法である。生体分子の分布を知るためには放射性プローブや緑色蛍光蛋白などの抗体を必要とするが、この手法では抗体を必要とせず、同時に多くの生体分子を網羅的に解析できるという特徴がある。内リンパ嚢を経時的に観察し、特異的なバイオマーカーを探索する。

内リンパ水腫に影響するバイオマーカーを探索し、メニエール病の発症メカニズムの解析を試みる。

3. 研究の方法

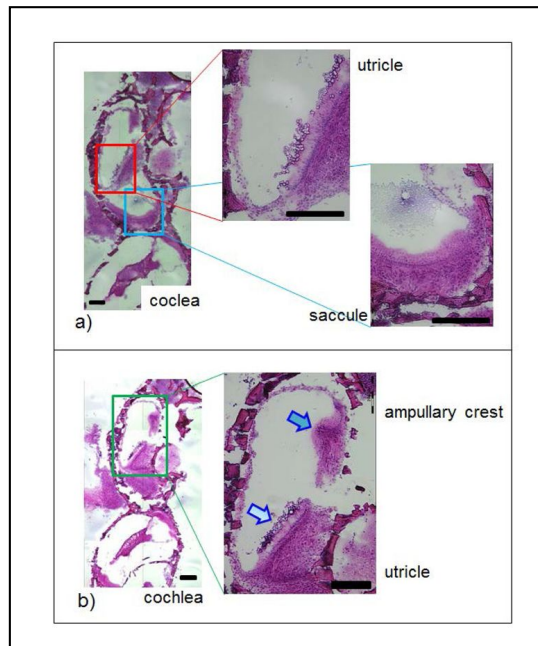
質量分析イメージングでの脂質を含めた生体分子の解析には未固定・未脱灰の組織切片が適している。最適な内耳の組織切片作成と、生体分子のイオン化を促進するマトリックスの組織切片上への塗布条件を最適化する。これにより質量分析イメージングで検出される生体分子の拡大を図る。最適化したマトリックス塗布条件を用いて、内リンパ水腫モデルを質量分析イメージングで解析する。

対象として3週齢オスのDBA2Jマウスを用いた。麻醉薬で鎮痛し断頭、摘出した内耳を2%カルボキシルメチルセルロースNaに包埋し、液体窒素を用いて凍結する。クライオスタットで厚さ15マイクロの切片を作成し導電性のあるスライドガラスに貼り付ける。2,5ジヒドロキシ安息香酸を含んだイオン化補助剤を、切片に均一に噴霧する。これを島津社製の質量顕微鏡で解析した。

質量顕微鏡を用いた解析では、凍結切片が適しており、まず解析可能な切片を作成できるか検討し、耳石器などの確認を行った。

4. 研究成果

HE染色にて、卵形嚢や球形嚢が確認された。さらに、卵形嚢と半規管膨大部が合流し、耳石器と膨大部稜がともに確認された。



引き続き、蝸牛を含めた前庭の質量顕微鏡を用いた解析を試みた。

質量 798.5 の生体分子はPC(16:0/18:1)で、耳石器にいたる神経線維や、膨大部稜の感覚上皮にいたる神経線維に局在した。また、質量 820.5 の生体分子であるPC(16:0/20:4)は耳石器の感覚上皮や膨大部稜の感覚上皮に局在傾向を示した。

コルチ器に局在していた、質量 754.5 のPC(16:0/16:1)は、前庭の感覚上皮には局在傾向が見られずコルチ器と異なる傾向が認められた。

コルチ器の有毛細胞は運動能を持ち、音波によるわずかな振動を大きく感知するような特性があり、前庭の有毛細胞とは異なるため違うPCで構成されていることが示唆された。

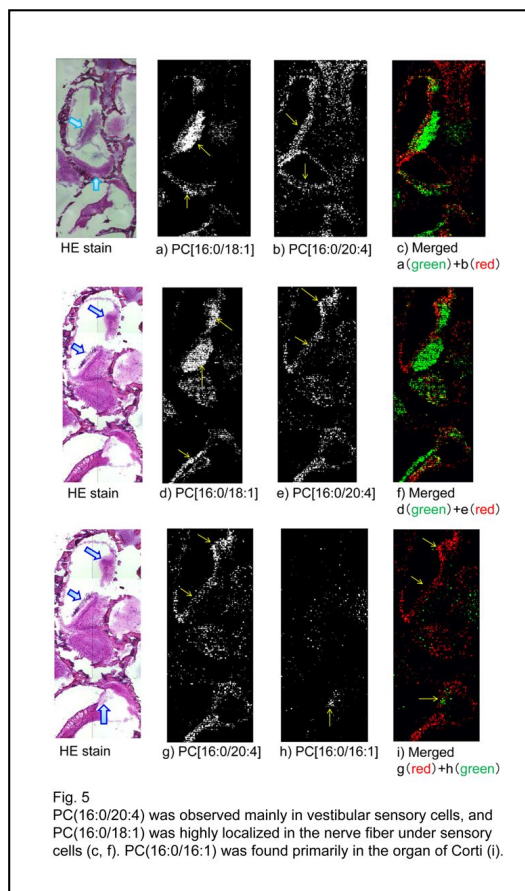


Fig. 5
PC(16:0/20:4) was observed mainly in vestibular sensory cells, and PC(16:0/18:1) was highly localized in the nerve fiber under sensory cells (c, f). PC(16:0/16:1) was found primarily in the organ of Corti (i).

メニエール病の病態を解明するためによく使用される内リンパ水腫作成の手技を教えて頂き、一年の研究期間延長を行ったが、残念ながら実際に作成には至ることができなかった。今回の研究期間ではモデル動物の作成と解析をすることができず、今後の課題となった。

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 3 件)

Takizawa Y, Mizuta K, Hamada N, Yamatodani T, Nakanishi H, Hosokawa K, Takahashi G, Sugiyama K, Mineta H. Relationship between tympanic membrane retraction and habitual sniffing in patients with cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 133(10):1030-1034. 2013.
DOI: 10.3109/00016489.2013.808763.

Yamatodani T, Mizuta K, Hosokawa K, Takizawa Y, Sugiyama K, Nakanishi H, Mineta H. Congenital middle ear cholesteatoma: experience from 26 surgical cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 122(5):316-21.2013.

Kunihiro Mizuta, Yoshinori Takizawa, Kenichi Sugiyama, Seiji Hosokawa, Hiroshi Nakanishi, Maki Arai, Masahiko Adachi, Hiroyuki Mineta. ラット前庭器官の暗細胞における G 蛋白 Gs の電顕的局在 (Ultrastructural Localization of the G-protein Gs in the Dark Cells of Rat Vestibular Organs.) *耳鼻咽喉科臨床 補冊* 136: 58-61. 2013.

{ 学会発表 } (計 5 件)

瀧澤義徳, 水田邦博, 中西啓, 橋本泰幸, 大和谷 崇, 岡村純, 杉山健一, 木村桃子, 鈴木高広, 早坂 孝宏, 瀬藤光利, 峯田周幸. 質量顕微鏡による 5 種類のホスファチジルコリンの蝸牛における局在. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2011 年 5 月 21 日. 京都

杉山健一, 瀧澤義徳, 水田邦博, 大和谷崇, 泉智沙子, 細川久美子, 中西啓, 望月大極, 早坂孝宏, 瀬藤光利, 峯田周幸. 質量顕微鏡による内耳の解析. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2012 年 5 月 10 日. 新潟

Sugiyama K, Hosokawa S, Mochizuki D, Okamura J, Takizawa Y, Takahashi G, Hosokawa K, Yamatodani T, Misawa K, Mineta H: Clinical Study of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue(MALT) Lymphomas of the Head and Neck. American Head & Neck Society 2012 8th International Conference: July 21-25, 2012, Toronto, Ontario, Canada.

Takizawa Y, Mizuta K, Sugiyama K, Hayasaka T, Nakanishi H, Okamura J, Mineta H, Setou M: Phosphatidylcholine species localization in the mouse inner ear by mass microscopy. The 36th Annual mid-winter research meeting of the association for research of otolaryngology: Feb 16-20, 2013, Baltimore, MD, USA.

Takizawa Y, Mizuta K, Yamatodani T, Hosokawa K, Nakanishi H, Takahashi G, Sugiyama K, Okamura J, Mineta H: Relationship between the findings of tympanic membrane and the habit of sniffing among cholesteatoma. The 9th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery: June 3-7, 2012, Nagasaki, Japan.

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山健一（SUGIYAMA Kenichi）
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50402334

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：