

平成 2 7 年 6 月 5 日現在

機関番号：3 2 7 1 3

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：2 4 7 9 1 8 1 3

研究課題名(和文) 7 テスラMRIによるマウス内リンパ水腫の観察および分子生物学的解析

研究課題名(英文) Examination of inner ears of mice using 7T MRI and molecular biologic analysis

研究代表者

中村 学(Nakamura, Manabu)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：6 0 3 8 6 9 6 9

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)：メニエール病の病態に関しては内リンパ水腫と言われているが、その本態は不明である。MRIは、内耳の構造を視覚化して、生理学および薬理学的な評価するのに用いられることができる強力なツールである。今回我々は、内リンパ水腫の可視化を目的にマウスを対象として高磁場MRIによる撮影を行った。7.05 TのMRI装置を用い、内リンパ水腫モデルであるPhexHyp-Duk/Yマウスの内耳の撮影を行った。PhexHyp-Duk/Yマウスにおいて内リンパ水腫の存在を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：Endolymphatic hydrops may be involved in the pathogenesis of Meniere's disease. However, the etiology remains to be clarified. Magnetic resonance imaging (MRI) facilitates visualization of the inner ear structure, and is useful for physiological and pharmacological evaluation. In this study, we conducted high-magnetic-field MRI in mice to visualize endolymphatic hydrops. An endolymphatic hydrop model, PhexHyp-Duk/Y mice, was used, as well as a 7T MRI device. Using the 7.05T MRI device, inner ear imaging was performed. In the PhexHyp-Duk/Y mice, the presence of endolymphatic hydrops was confirmed.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：MRI 内リンパ水腫

1. 研究開始当初の背景

メニエール病は繰り返すめまいが出現し、患者の ADL を著しく下げている。メニエール病の本体は内リンパ水腫であるが、精神的・肉体的疲労、ストレス、睡眠不足などが誘因となり増悪する。なぜリンパ水腫になるか、またなぜ増悪するのかなどの詳細については未だ不明である。

モルモットやヒトにおいて、ガドリニウムを鼓室内投与し内リンパ水腫を MRI で評価した研究が報告されている。しかしながら、ヒトでは実験上に制約があり、またモルモットではマウスと異なり、全ゲノムが解析されておらずプロテオミクスなどの分子生物学的解析に向かない。

Lorenz-Depiereux らは 2004 年にミュータントである Phex^{Hyp-Duk/Y} マウスの内リンパ水腫を病理学的に証明し、内リンパ水腫モデルマウスを確立した。これまでの当該分野においては病理学的な研究が多く同一個体での経時的な内耳の評価はされていない。

マウスはプロテオミクス解析可能であり、またこのマウスにおいての MRI による内耳の撮影の報告はなかった。

2. 研究の目的

MRI を用いることによって Phex^{Hyp-Duk/Y} マウスにおいて同一固体で経時的に内リンパ水腫を観察することが可能であり、内リンパ水腫の確認をはじめの目標とした。また、同マウスの内耳タンパク質を抽出しプロテオミクスの技法を用い、メニエール病の機序となりうるタンパク質を網羅的に解析する事を第二の目標とした。

具体的には

(1)7 テスラの MRI による内リンパ水腫モデルマウス内耳の可視化を行う。

(2)利尿剤であるイソソルビドを投与し内リンパ水腫の変化を経時的に観察する。

(3)プロテオミクスを用い、メニエール病の機序となりうる内耳タンパク質を網羅的に解析する。

上記のことを目標とした。

国内外において Phex^{Hyp-Duk/Y} マウス対し MRI を用いて内リンパ水腫を経時的に観察し研究は涉猟しうる限り無く、今これを推進することで、国際的に高水準の研究を日本から発信することができると考えた。

本研究計画における一番の特色は、MRI で経時的にマウス内耳が観察できることである。これまでの当該分野においては、病理学的な研究が多く同一個体では経時的な評価が不可能であった。

さらに、われわれは耳鼻咽喉科領域におけるプロテオミクスを率先して行った実績があり他研究者よりも優位な状況にあり、二次元電気泳動装置、質量解析器計、解析

ソフトなど充実した機材が用意されているおり、他研究施設と比べてスクリーニングできる規模と速度が格段に優れていた。MRI においても獨協医科大学 生理学(生体制御)にある 7 テスラの MRI が使用可能であり、他施設よりもより微細な撮影が技術的に可能であった。

このことにより予想される結果と意義として、メニエール病における内リンパ水腫発生のメカニズム、および 未知の関連タンパク質が明らかとされる可能性があり、イソバイドの投与によって内リンパ水腫の改善を画像で評価可能となる事が期待される事が考えられた。そのため、他の薬剤での薬効を判定する基盤となる実験になることが予想された。

本研究によって得られるデータはメニエール病の解明のみならず、その他のめまいの発生メカニズムの解明にも大変意義深いものと思われ実行に至った。

3. 研究の方法

(1)MRI

内リンパ水腫モデルマウスである Phex^{Hyp-Duk/Y} マウスを使用、コントロールとしては C57/B6J マウスを用いる。全麻下に外耳道を中心に surface coil を設置し、7.05T 高磁場マイクロイメージング装置を用いて内耳を撮影した。解析ソフト Topspin および ParaVision (Version 5.1) を使用し画像化した。

同一のマウスに対しイソソルビドを経口投与し経時的に内耳を MRI にて観察した。

(2)プロテオーム解析

上記マウスのイソソルビド内服群で内リンパ水腫を確認できた個体に対し非内服群および C57BL/6J マウスをコントロールとし、それぞれの内耳タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を IPGstrip に膨潤し、等電点電気泳動を行い SDS-PAGE にて二次元電気泳動を行い蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム(2D DIGE)を用いスポットの発現を確認した。コントロールと比較しタンパク質発現量の異なるスポットをゲルより切り出し、Trypsin にてゲル内消化し、MALDI-TOF mass spectrometer にて質量分析を行った。質量分析器によって得られたデータを解析ソフト Mascot (Matrix Science Ltd.)を用い NCBI protein データベースより検索しタンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

Phex^{Hyp-Duk/Y} マウスは弱い個体であり短命であるため繁殖に技術を要した。麻酔によって死亡することも多くプロテオーム解析まで取りかかることができなかったため今後試みる予定である。

MRI

コントロール (C57/B6J マウス) と内リンパ水腫が撮影された Phex^{Hyp-Duk/Y} マウスの MRI 内耳画像を示す (図 1)。コントロールにおいてガドリニウムが鼓室から前庭窓・蝸牛窓を経由し浸透するため外リンパ腔が造影され内リンパ腔が低信号となっていた。これにより、内リンパ腔 (ES)、外リンパ腔 (PS) および鼓室 (T) が良好に可視化できた (図 1a)。

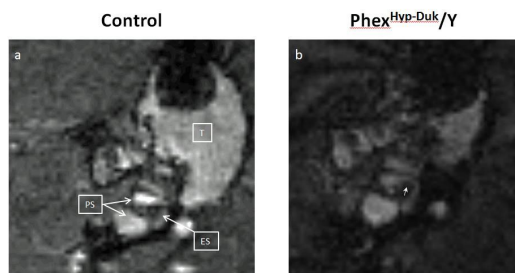


図1 マウスMRI内耳所見

全例ともコントロールと同様に 1-2 時間で造影効果が良好となり、個体差は認められなく、C57BL/6J マウスにおける内耳の描出と同様であった。Phex^{Hyp-Duk/Y} マウスでは、ライスネル膜の前庭階への変位 (矢印) が見られ、これは内リンパ水腫の存在による変位と考えられた (図 1b)。今回の検討では、17 匹の Phex^{Hyp-Duk/Y} マウス中、7 例に内リンパ水腫の存在を認めた。4 例については内リンパ水腫を認めなかった。その他の 6 例は外リンパ腔とともにされていた (図 2)。

メニエール病発作の病態として内リンパ腔の破裂説が有名である。内リンパ水腫が

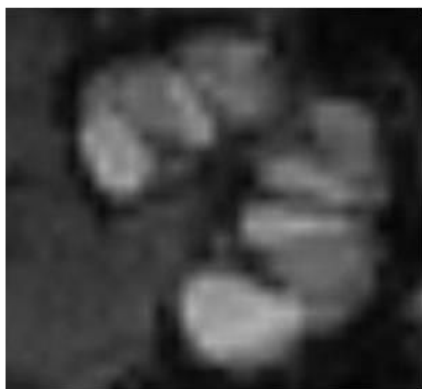


図2 内リンパ腔の造影効果

高度になってライスネル膜の一部が破れると、内リンパ液が前庭階の外リンパ腔に流入する。内リンパ液は高 K⁺ であり、神経を脱分極させる作用があり、内リンパ液が前庭に流入すると、前庭の有毛細胞や前庭神経を興奮させ、患側向きの刺激性眼振が出現する。Phex^{Hyp-Duk/Y} マウスの 6 例は外リンパ腔と内リンパ腔がともに造影されて

おり、ライスネル膜の変異は認めない (図 2)。このことよりライスネル膜の一部が破れているために内リンパ腔にも造影効果が生じており、内リンパ腔の破裂の可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

第 40 回日本磁気共鳴医学会 2012 年 09 月 07 日：国立京都国際会館 (京都府・左京区)

7 テスラ MRI を用いたガドリニウム造影剤鼓室内投与によるマウス内耳の描出
中村学、田中泰彦、深澤雅彦、阿久津征利、肥塚泉、瀬尾芳輝

第 31 回耳鼻科ニューロサイエンス研究会 2013 年 8 月 24 日：ホテルグランヴィア (大阪・府大阪市)

7 テスラ MRI を用いた C57BL/6J マウス内耳の描出
中村学、田中泰彦、阿久津征利、肥塚泉

第 72 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会 2013 年 11 月 13 日～2013 年 11 月 15 日：大阪国際センター (大阪府・大阪市)
ガドリニウム造影剤鼓室内投与を行った 7 テスラ MRI のマウス内耳画像
田中泰彦、中村学、深澤雅彦、阿久津征利、肥塚泉

第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演 2014 年 11 月 05 日～2014 年 11 月 07 日：パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
シンポジウム 耳科領域における画像診断法の最前線 7.05T MRI を用いたマウス内耳の観察
中村学

〔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：
出願年月日：
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

中村 学 (Nakamura, Manabu)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：60386969