

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791208
 研究課題名（和文）
 内リンパ嚢におけるイオン輸送の制御因子および制御能
 研究課題名（英文）
 Ion transport system in the endolymphatic sac
 研究代表者
 宮下 武憲（MIYASHITA TAKENORI）
 香川大学・医学部・助教・
 研究者番号：60363214

研究成果の概要（和文）：

メニエール病の治療法開発に向けて、内リンパの輸送制御を目的とし、内リンパを吸収しているとされる内リンパ嚢におけるイオン輸送を研究した。Naポンプの制御因子のひとつであるFXVD6に着目し、内リンパ嚢上皮細胞での発現をRT-PCRにてmRNAレベルで確認し、さらに、特異的な抗体を用いて免疫染色することで、内リンパ嚢上皮細胞に、FXVD6が蛋白レベルでも発現することを確認した。さらにFXVD6の多くがNaポンプと共発現していることが確認できた。FXVD6は内リンパ嚢上皮細胞に発現し、Naポンプ活性の調節を通じて内リンパの調節に関与している可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

The endolymphatic sac is believed to absorb the endolymph. This study focused on the ion transport control system in the endolymphatic sac. FXVD6 is a control factor of Na pump, and Na pump in the endolymphatic sac may produce Na⁺ driving force. We confirmed FXVD6 mRNA and protein expression in the endolymphatic sac by RT-PCR and immunohistochemistry. This results suggested that FXVD6 may control the ion transport in the endolymphatic sac.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：

内耳、内リンパ嚢、イオン輸送、メニエール病、イオンチャネル、Na⁺、K⁺-ATPase、イオンイメージング、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

特定疾患のひとつであるメニエール病の

病態は、内リンパ水腫であるが、正常では内リンパ水腫が生じないように内リンパ系が

調節されている。この内リンパ系の調節に内リンパ嚢が重要な役割をしていることが近年の形態学的、薬理学的、生理学的研究により示唆されている。特に、内リンパ嚢を閉塞した動物ではメニエール病の病態である内リンパ水腫が発生することから、内リンパ嚢は内リンパ液の吸収をしていると考えられている。さらに、難治性メニエール病の治療として、内リンパ嚢開放術（ドレナージ術）は、広く行われている手術のひとつである。しかし、実際に内リンパ嚢がどのような働きをしているか、そしてどのように調節されているか、その全貌はいまだ明らかになっていない。内リンパ嚢の機能、およびその制御機構を明らかにすることで、内リンパ水腫をコントロールし、内リンパ水腫を病態とする疾患であるメニエール病の治療法が確立できる可能性に着目した。

2. 研究の目的

すでに、我々の研究室でも、内リンパ嚢機能の一要素として、ナトリウム輸送が内リンパの吸収に重要な働きをしていることを示唆する研究結果を蓄積している (Miyashita et al., 2006; Wu & Mori, 1999; Mori et al., 2000; Miyashita et al., 2001; 宮下他, 2002, 2003)。とくに、内リンパ嚢上皮細胞の Na ポンプが、内リンパ水腫を改善させるのに十分な内リンパ液の輸送能を作り出すことを、シート状の生標本にて測定することに成功した (Miyashita et al., 2001)。よって、この内リンパ液の輸送能を制御することができれば、内リンパ水腫を呈するメニエール病などの根本的な治療が可能である可能性があり、きわめて重要な要素であるが、内リンパ嚢における内リンパ液の吸収を制御する因子に関して直接研究した報告はない。そこで、内リンパ嚢における内リンパ液の吸収にかかわる制御因子を探し出し、その制御能を直接測定する実験系を構築した。内リンパ嚢におけるイオン輸送系を解明するため、内リンパ嚢におけるイオン輸送を担うイオントランスポーターが発現することを確認し、そしてその調節因子を検索することを目的とする。

3. 研究の方法

分子生物学的研究

ラットを深麻酔下に還流固定し、ラット内リンパ嚢を摘出。脱灰後に、内リンパ嚢上皮細胞より特異的に mRNA を抽出する方法である、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法 (LCM 法) にて mRNA を抽出した。RT-PCR により、Na ポンプの制御因子のひとつである FXYP6、タイトジャンクションを構成するクローディンについて発現を検索し、ラット内リンパ嚢におけるイオントランス

ポーターおよびその制御因子の発現を確認した。

発現が確認できたクローディンに関しては、ラット内リンパ嚢における局在を確認するため *in situ* hybridization を行い、ラット内リンパ嚢上皮細胞への局在を確認した。次に、蛋白レベルでの発現を検索するため、FXYP6 の特異的抗体により、モルモット内リンパ嚢上皮細胞を免疫染色し、FXYP6 の局在を調べた。

4. 研究成果

これまでに、ナトリウム輸送が内リンパの吸収に重要な働きをしていることが示唆されている。とくに、内リンパ嚢上皮細胞の Na ポンプが、内リンパ水腫を改善させるのに十分な内リンパ液の輸送能を作り出すことを、シート状の生標本にて測定し確認した。そこで、Na ポンプの制御因子のひとつである FXYP6 に着目した。FXYP6 が内リンパ嚢上皮細胞に発現しているとすれば、Na ポンプ活性の調節を通じて内リンパの調節に関与している可能性が示唆される。そこで、FXYP6 の内リンパ嚢上皮細胞での発現を、RT-PCR, *in situ* hybridization にて mRNA レベルで確認し、さらに、特異的な抗体を用いて、免疫染色することで、内リンパ嚢上皮細胞に、FXYP6 が蛋白レベルでも発現することを確認した。さらに、FXYP6 の多くが Na ポンプと共発現していることが確認できた。

さらに、内リンパ嚢上皮における細胞間輸送について検討した。内リンパ嚢上皮細胞間には、タイトジャンクションがあることが電顕による研究でわかっているが、タイトジャンクションを構成するクローディンに関しては調べられていない。そこで、内リンパ嚢上皮細胞におけるクローディン、特にイオン透過性を生み出す組み合わせを構成するクローディンに着目し、発現を検討した。RT-PCR, *in situ* hybridization にて、クローディン 2, 7 の発現が確認できた。これらのことから、内リンパ嚢上皮において、クローディンが細胞間イオン輸送に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

① Kosuke Akiyama, Takenori Miyashita, Ai Matsubara, Ryuhei Inamoto, Terushige Mori, Akira Nishiyama, Nozomu Mori
Expression and localization of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β HSD) in the rat endolymphatic sac
Acta Oto-Laryngologica, 130 (2), 228-232, 2010
査読有

②Ryuhei Inamoto, Takenori Miyashita,
Kosuke Akiyama, Terushige Mori, Nozomu
Mori
Endolymphatic sac is involved in the
regulation of hydrostatic pressure of
cochlear
endolymph
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,
297,
R1610-R1614, 2009 査読有

③Mori Terushige, Miyashita Takenori,
Akiyama Kosuke, Inamoto Ryuhei,
Mori Nozomu
The expression of P2Y 1,2,4, and 6
receptors in
rat endolymphatic sac epithelia
Neuroreport, 20(4), 419-423, 2009 査読
有

④Kosuke Akiyama, Takenori Miyashita,
Terushige Mori, Ryuhei Inamoto, Nozomu
Mori
Expression of thiazide-sensitive
 $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$
cotransporter in the rat
endolymphatic
sac
BBRC, 371, 649-653, 2008 査読有

⑤Kosuke Akiyama, Takenori Miyashita, Ai
Matsubara, Terushige Mori, Ryuhei
Inamoto,
Akira Nishiyama, Nozomu Mori
A new approach for selective rat
endolymphatic sac epithelium
collection
to obtain pure specific RNA
BBRC, 376, 611-614, 2008 査読有

⑥Takenori Miyashita, Hitoshi Tatsumi,
Kimihide Hayakawa, Nozomu Mori, Masahiro
Sokabe
Large Na^+ influx and high Na^+ , K^+ -ATPase
activity in mitochondria-rich epithelial
cells of
the inner ear endolymphatic sac
Pflugers Arch Eur J Physiol, 453, 905-913,
2007
査読有

⑦Kosuke Akiyama, Takenori Miyashita,
Terushige Mori, Nozomu Mori
Expression of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$
cotransporter in the rat endolymphatic sac
BBRC, 364, 913-917, 2007 査読有

[学会発表] (計 24 件)

1. Takenori Miyashita, Yoshihiro Toyama,
Ryuhei Inamoto, Nozomu Mori,
Determining the volume of the elliptical
cone
simulating the vestibular aqueduct in
meniere's disease using multiplanar
reconstruction images :A novel index for
the
vestibular aqueduct evaluation
Association for Research in
Otolaryngology
2010. 2. 8、Disneyland
Hotel (Anaheim, CA, USA)

2. Ai Matsubara, Takenori Miyashita,
Terushige Mori, Ryuhei Inamoto, Nozomu
Mori
RNA expression of claudins in the rat
endolymphatic sac
Association for Research in
Otolaryngology
2010. 2. 8、Disneyland
Hotel (Anaheim, CA, USA)

3. 宮下武憲、稲本隆平、森望
メニエール病の減塩治療における血中浸透
圧変化、血中ホルモン変化と臨床所見
第68回日本めまい平衡医学会、2009. 11. 26
ホテルクレメント徳島 (徳島市)

4. 稲本隆平、宮下武憲、森望
カテコールアミンによる前庭内リンパ圧の
変化
第68回日本めまい平衡医学会、2009. 11. 26
ホテルクレメント徳島 (徳島市)

5. 宮下武憲、秋山貢佐、稲本隆平、
森照茂、森望
内リンパ囊上皮細胞におけるFXVD 6 の発現
第19回日本耳科学会、2009. 10. 10
京王プラザホテル (東京都)

6. 秋山貢佐、宮下武憲、稲本隆平、
森照茂、森望
レーザーキャプチャーマイクロダイセクシ
ョンを用いた選択的内リンパ囊由来RNA抽出
方法
第19回日本耳科学会、2009. 10. 10
京王プラザホテル (東京都)

7. 宮下武憲、稲本隆平、森望
メニエール病の減塩治療ー血中ホルモン変
化と臨床所見ー、第110回日本耳鼻咽喉科
学会、2009. 5. 14、ザプリンスパークタワー
東京(東京都)

8. 秋山貢佐、宮下武憲、松原あい、稲本隆平、森照茂、森望
ラット内リンパ囊における 11β -HSDの発現
第110回日本耳鼻咽喉科学会、2009.5.15
ザプリンスパークタワー東京(東京都)

9. 稲本隆平、宮下武憲、森望
内リンパ囊の内リンパ圧調節作用に関する研究、第110回日本耳鼻咽喉科学会、
2009.5.15
ザプリンスパークタワー東京(東京都)

10. Takenori Miyashita, Hitoshi Tatsumi, Kimihide Hayakawa, Masahiro Sokabe, Nozomu Mori
Na⁺ influx in mitochondria-rich epithelial cells of the inner ear endolymphatic sac
6th Extraordinary International Symposium on Recent Advances
2009.5.9
Lotte Hotel Seoul (Seoul Korea)

11. Takenori Miyashita, Kosuke Akiyama, Ryuhei Inamoto, Terushige Mori, Nozomu Mori
Presence of the FXDY6 in the endolymphatic sac epithelia
32nd Association for Research in Otolaryngology MidWinter Meeting
February 17, 2009
Baltimore Marriott Waterfront (Baltimore, Maryland, USA)

12. Kosuke Akiyama, Takenori Miyashita, Ai Matsubara, Ryuhei Inamoto, Terushige Mori, Akira Nishiyama, Nozomu Mori
11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) expression in the rat endolymphatic sac
32nd Association for Research in Otolaryngology MidWinter Meeting
February 17, 2009
Baltimore Marriott Waterfront (Baltimore, Maryland, USA)

13. Ryuhei Inamoto, Takenori Miyashita, Nozomu Mori
Endolymphatic sac is involved in the regulation of endolymphatic pressure
32nd Association for Research in Otolaryngology MidWinter Meeting
February 17, 2009
Baltimore Marriott Waterfront (Baltimore, Maryland, USA)

14. 稲本隆平、宮下武憲、森望

内リンパ囊の内リンパ圧調節作用に関する研究
日本耳鼻咽喉科学会第34回四国四県地方部会連合学会、2008.12.7、
高知市文化プラザかるぼーと (高知市)

15. 秋山貢佐、宮下武憲、松原あい、稲本隆平、森照茂、森望、西山成
ラット内リンパ囊における 11β -HSDの発現とアルドステロンの関連
日本耳鼻咽喉科学会第34回四国四県地方部会連合学会、2008.12.7、
高知市文化プラザかるぼーと (高知市)

16. 宮下武憲、稲本隆平、森望
メニエール病における減塩治療時の血中ホルモン動態
第18回日本耳科学会、2008.10.17、
神戸国際会議場 (神戸市)

17. 秋山貢佐、宮下武憲、森照茂、稲本隆平、森望
内リンパ囊におけるNa-Cl共輸送体の発現
第18回日本耳科学会、2008.10.17、
神戸国際会議場 (神戸市)

18. 稲本隆平、宮下武憲、森望
カテコールアミンによる蝸牛内リンパ圧の変化
第18回日本耳科学会、2008.10.17、
神戸国際会議場 (神戸市)

19. Miyashita Takenori, Akiyama Kosuke, Inamoto Ryuhei, Mori Terushige, Mori Nozomu
Presence of the FXDY6 in the endolymphatic sac epithelia
45th Inner Ear Biology
September 23, 2008,
Sala S.Francesco (Ferrara Italy)

20. Akiyama Kosuke, Miyashita Takenori, Mori Terushige, Inamoto Ryuhei, Mori Nozomu
Expression of the Na-K-2Cl cotransporter(NKCC-2) in the rat endolymphatic sac
45th Inner Ear Biology
September 23, 2008,
Sala S.Francesco (Ferrara Italy)

21. Inamoto Ryuhei, Miyashita Takenori, Akiyama Kosuke, Mori Terushige, Mori Nozomu
The effect of isoproterenol on the hydrostatic pressure of cochlear

endolymph
45th Inner Ear Biology
September 23, 2008,
Sala S.Francesco (Ferrara Italy)

22. Mori Terushige, Miyashita Takenori,
Akiyama Kosuke, Inamoto Ryuhei, Mori
Nozomu
Expression of P2Y receptors in the rat
endolymphatic sac
45th Inner Ear Biology
September 23, 2008,
Sala S.Francesco (Ferrara Italy)

23. 稲本隆平、宮下武憲、森望
内リンパ囊の内リンパ圧調節における
役割に関する研究
第26回頭頸部自律神経研究会、
2008. 8. 23
ホテルグランヴィア大阪（大阪市）

24. 稲本隆平、宮下武憲、森望
カテコールアミンによる蝸牛内リンパ
圧の変化
日本耳鼻咽喉科学会第34回中国四国地
方部会連合学会、2008. 5. 31、
米子市文化ホール（米子市）

6、研究組織

(1) 研究代表者

宮下 武憲 (MIYASHITA TAKENORI)
香川大学・医学部・助教
研究者番号 60363214