

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591991

研究課題名（和文）ナトリウム利尿ペプチドによる内耳水電解質制御機構の解明

研究課題名（英文）Inner ear fluid metabolism regulated by natriuretic peptide family

研究代表者

鈴木 幹男（SUZUKI MIKIO）

琉球大学・医学研究科・教授

研究者番号：00226557

研究成果の概要（和文）：動物内耳ではナトリウム利尿ペプチド受容体が内耳及び内リンパ嚢上皮にみられた。内耳，全身へ投与しても，生理用量では聴覚，内耳形態に変化がなかった。しかし，CNPノックアウトマウスでは有意に聴力障害が生じていた。ヒト内リンパ嚢ではANP受容体が発現し，臨床例からはBNPが内リンパ水腫形成と関連していることが示唆された。本研究ではナトリウム利尿ペプチドが内耳水・電解質代謝に関与する傍証は得られたが，そのメカニズムには依然多くの不明点がある。

研究成果の概要（英文）：In the present study, natriuretic peptide receptors were observed in spiral ligament and epithelium of endolymphatic sac. Although audiological function and inner ear structure in the guinea pigs with endolymphatic hydrops were not affected by natriuretic peptide infusions to both inner ear and peritoneal cavity, CNP knockout mice displayed significant hearing loss, comparing with controls. ANP receptors were observed in human endolymphatic sac as well as rat endolymphatic sac, and the levels of serum BNP in patients with endolymphatic hydrops were significantly elevated. These observations suggest that natriuretic peptides may be involved in inner ear fluid metabolism. The further studies are needed to confirm the observations.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：ナトリウム利尿ペプチド、メニエール病、内リンパ嚢

1. 研究開始当初の背景

内耳は電解質組成が全く異なる内・外リンパ液を含んでいるため，良好に機能するには

水電解質の恒常性維持が必須である。近年，水代謝に関係する生理活性物質（抗利尿ホルモン，ナトリウム利尿ペプチド，グルココル

チコイドなど)の受容体が内耳・内リンパ嚢に存在し、内耳液代謝に関与していることが明らかになりつつある。本研究組織ではナトリウム利尿ペプチド(ANP family), 抗利尿ホルモン(AVP)の受容体が内耳に存在することを初めて報告し、抗利尿ホルモンが内リンパ水腫形成に関わっていることを報告してきた。我々の研究を受け動物・ヒト内リンパ嚢にAVP受容体, ANP family受容体, 水移動に必要なアクアポリンが存在することが国内外で相次いで報告されている。

2. 研究の目的

上記研究から水代謝に関係する生理活性物質は内耳(血管条, ラセン靭帯, 暗細胞など)や内リンパ嚢で内・外リンパ液代謝に深く関与していると推定される。これら生理活性物質受容体やアクアポリンなどのウォーターチャンネルの存在は判明したが、生理的条件下及び内リンパ水腫形成時にこれらの生理活性物質が内耳や内リンパ嚢でどのように水・電解質を制御しているかについては不明の点が多い。さらにANP familyとアクアポリンの関係について神経系, 腸管ではアクアポリン3・4を調節していることが近年報告されたが、内耳での調節機構に関する報告はみられない。そこで本研究では生理活性物質の中でも特にナトリウム利尿ペプチド(ANP family)による内耳水電解質制御機構を解明することを計画した。

3. 研究の方法

(1)実験1. 内リンパ嚢におけるANP family受容体を有する細胞, アクアポリン産生細胞の局在同定

灌流固定したラットを用いて内リンパ嚢・内耳を含めた側頭骨を採取, 後固定・脱灰後, 薄切する。ANP family受容体, アクアポリン(2, 3, 4)の抗体を用いて免疫染色をおこなう。positive controlには腎臓を用い, negative controlを抗体吸収法に基づき作成する。

(2)実験2. 正常動物へANP family (ANP, BNP, CNP)投与実験を行う。投与方法は経正円窓内耳投与, 腹腔内投与の2つの方法を採用する。経正円窓内耳投与は急性実験で,

腹腔内投与は慢性実験で用いる。急性実験では, ANP family溶解人工外リンパ液と対照液(人工外リンパ液)を内耳に投与し, 投与前, 投与後30分後, 1時間後の蝸電図を測定し, 投与前後の聴力変化を測定する。蝸電図測定後は, 灌流固定・断頭し内耳組織標本を作製し形態変化(内リンパ腔の大きさ, 内リンパ水腫有無, 血管条・ラセン靭帯形態変化など)計測, リン酸バッファー液で灌流し内耳mRNA抽出(ANP family・AVP受容体, アクアポリン遺伝子発現測定)を行う。遺伝子発現はcompetitive PCRを用いて, ANP family投与群と対照群を比較する。慢性実験では, 皮下に持続注入用ミニポンプを埋め込み, 腹腔内に投与する。本投与法はANP familyを全身投与した場合を模擬している。投与期間は10日とする。血清中のANP family濃度を測定し投与が確実に行われているか確認する。急性実験と同じく蝸電図測定後, 内耳標本作製, mRNA抽出を行う。得られたデータから至適投与期間, 投与量を調節する。正常動物で実験を進めるとともに, 内リンパ水腫動物を作成する。内リンパ水腫作成動物の血清ANP family, AVPを測定し, 正常動物との変化を検討する。さらに正常動物と同じ条件で急性実験, 慢性実験を行う。

(3)実験3. メニエール病内リンパ嚢でのANP family受容体, アクアポリンの発現

メニエール病に内リンパ嚢手術を施した際に採取した内リンパ嚢を2つに分け, 一方を免疫染色用に固定し, 他方からはmRNAを抽出しANP family受容体, アクアポリンの遺伝子発現を測定する。

(4)実験4. 内リンパ水腫疾患と内リンパ水腫がない内耳疾患における血中バソプレッシン, ナトリウム利尿ペプチド量の測定

内リンパ水腫疾患(メニエール病, 遅発性内リンパ水腫)と内リンパ水腫がない内耳疾患(突発性難聴, 前庭神経炎, など)で結晶中の水代謝性ペプチドを測定し, その差及び臨床所見との相関を調査する。

4. 研究成果

(1)実験1. 内リンパ嚢におけるANP family受容体を有する細胞, アクアポリン産生細胞の局在同定

ラット側頭骨を脱灰し、ANP family, アクアポリン各種への抗体を用いて免疫多重染色をおこなった。ANP-A, B 受容体が内耳（らせん靭帯）及び内リンパ嚢上皮にみられることが判明した。アクアポリン産生細胞も内リンパ嚢で確認できた。しかし、これらの陽性細胞の相同を調べるために、免疫2重染色をおこなったが十分な結果を得ることができなかった。原因として内耳組織の脱灰過程で抗原性が減弱すること、抗体の特性でアーチファクトが多く生じることが考えられた。そこで特殊刃を持ちいて非脱灰内耳組織標本を作製し同様の研究を進めたが、研究年度中に一定した結果を得ることができなかった。

(2)実験 2. ANP family が内外リンパ液産生・吸収へ与える影響

正常動物へANP family (ANP, BNP, CNP) 投与実験を行った。投与方法は経正円窓内耳投与、腹腔内投与の2つの方法である。経正円窓内耳投与（急性実験）では、ANP family 溶解人工外リンパ液と対照液を内耳に投与し、投与前、投与後30分後、1時間後の蝸電図を測定し、投与前後の聴力変化を測定した。ANP, BNP, CNP のいずれを投与しても、対照液を投与した場合と有意の変化はみられなかった。投与量を増加させると蝸電図では変化がなかったが、内耳血流はやや減少する傾向を示した。しかし、変化を示す用量は臨床用量より一桁多く、この得られた効果についての評価は難しいと考える。蝸電図測定後の内耳組織標本では一部の例で内リンパ水腫形成を認めたが、投与量が多くなると水腫形成が大きくなる傾向を示し、実験操作による人工産物と考えられた。内リンパ水腫動物はモルモットの内リンパ嚢に硝酸銀注入することで作成した。内リンパ嚢処置後1ヶ月間水腫が形成されるまで待ち用いた。内リンパ水腫作成動物でも経正円窓内耳投与を行ったが、蝸電図所見の改善、組織学的変化の改善はみられなかった。このため、事前に検討する予定であった realtime PCR を用いた ANP family・AVP 受容体、アクアポリン遺伝子発現の測定は行わなかった。慢性実験では、皮下に持続注入用ミニポンプを埋め込み、腹腔内に ANP family (ANP,

BNP, CNP) を投与した。10日の慢性投与を行ったが、蝸電図、内耳血流には大きな変化を認めなかった。正常動物と同様に内リンパ水腫動物でも腹腔内投与による慢性実験をおこなった。その結果では内リンパ水腫作成動物では難聴は生じていたが、水腫軽減効果を組織学的に証明できなかった。また京都大学から提供を受けた CNP ノックアウトマウスの聴力検査を行った。同年齢の対照マウスの聴力と比較するとノックアウトマウスでは20dBの聴力悪化を認めた。

(3)実験 3. メニエール病内リンパ嚢での ANP family 受容体、アクアポリンの発現

最終的にメニエール病5症例から手術時に内リンパ嚢採取をおこなった。得られた組織片が小さかったため免疫染色を行うことは中止し、mRNA 抽出をおこなった。5例中4例で mRNA 抽出に成功し、cDNA 作成をおこなった。しかし、得られた cDNA 量が少なかったため、ANP family 受容体の発現のみ検討可能であった。ANP family では既報告のように ANP-C, ANP-B 受容体の遺伝子発現を認めた。

(4)実験 4. 内リンパ水腫疾患と内リンパ水腫がない内耳疾患における血中バソプレッシン、ナトリウム利尿ペプチド量の測定

メニエール病患者を中心とした内リンパ水腫群 (35例)、対照群 (34例) に、バソプレッシン、ナトリウム利尿ペプチド (ANP, BNP) の測定を行った。バソプレッシンについては有意の変化を示す症例は内リンパ水腫群ではごく少数 (10%以下) であり、対照群ではなかった。ANP は内リンパ水腫群では1例で異常値を示したが、他の症例では正常値であった。ANP の平均値も正常範囲内であり、対照群 (異常値例: 0例) と有意の差はなかった。BNP は内リンパ水腫疾患で、35例中12例で上昇しており、対照群 (34例中2例) と比較し異常値を示す症例が有意に多かった。内リンパ水腫群の BNP 測定値の平均は正常範囲内であったが、標準偏差が大きく、症例による差が大きいと推測された。そこで、内リンパ水腫群の中で、異常値を示す症例と正常値の症例の間で、めまい発作頻度、測定時のめまいや聴力変動、グリセロール検査、

蝸电图検査，前庭機能検査結果に差があるかを検討したが，有意の相関を示す項目はなかった。

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)

[学会発表] (計2件)

①鈴木幹男，内リンパ水腫疾患における血中BNP値について，第69回日本めまい平衡医学会総会，2010年11月18日，京都国際会議場

②鈴木幹男，メニエール病における血中ナトリウム利尿ペプチド測定，第67回日本めまい平衡医学会総会，2008年10月30日，秋田市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 幹男 (SUZUKI MIKIO)
琉球大学・医学研究科・教授
研究者番号：00226557

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

我那覇 章 (GANAHA AKIRA)
琉球大学・医学研究科・助教
研究者番号：00347155