

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293346

研究課題名(和文)内リンパ水腫形成への抗利尿ホルモンとアクアポリンの関与に関する研究

研究課題名(英文)Role of Vasopressin-Aquaporin2 System in the Formation of Endolymphatic Hydrops

研究代表者

柿木 章伸 (Kakigi, Akinobu)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命教授

研究者番号：60243820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：メニエール病の病理組織学的特徴は内リンパ水腫である。この内リンパ水腫形成には抗利尿ホルモンと水チャンネルが深く関与している。本研究では、内リンパ産生部位である蝸牛血管条に抗利尿ホルモンで制御されているアクアポリン2が存在することを再確認し、抗利尿ホルモンの2型レセプター作動薬を蝸牛に作用させることにより内リンパ水腫が形成される過程を生体モルモットで観察することに成功した。また、メニエール病治療薬であるイソソルビドを実験的に作成した内リンパ水腫モルモットに作用させることで、内リンパ水腫が軽減する過程を生体モルモットで観察することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Meniere's disease (MD) is histologically characterized by endolymphatic hydrops in the inner ear. The mechanisms underlying overaccumulation of endolymph still remain an enigma. There is considerable evidence that water homeostasis in the inner ear is regulated partly via the vasopressin-aquaporin2 (VP-AQP2) system, suggesting that endolymphatic hydrops, a morphological characteristic of Meniere's disease, may reflect the mal-regulation of the VP-AQP2 system in inner ear fluid.

In this study, we revealed the existence of AQP2 in the stria vascularis. Moreover, administration of vasopressin type2 receptor agonist induced formation of endolymphatic hydrops. We observed this phenomenon using OCT in vivo. Further, we observed the decompression effect of isosorbide on endolymphatic hydrops by OCT in vivo. These results seem to be useful to understand the underlying mechanisms of formation of endolymphatic hydrops.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：メニエール病 抗利尿ホルモン アクアポリン 内リンパ水腫 OCT イソソルビド

1. 研究開始当初の背景

メニエール病の病理組織学的な特徴は内リンパ水腫である。近年、内リンパ水腫形成の機序に抗利尿ホルモン(VP)とそれによって制御されるアクアポリン2(AQP2)が深く関与することが明らかになってきた。しかしながら、腎臓で認められるような抗利尿ホルモンによるアクアポリン2の制御に関する直積的な報告は未だない。また、内リンパ水腫を確認するには組織学的手法によるが、通常の方法では組織作成時にアーチファクトが問題となり、厳密な内リンパ水腫の計測は行えない。

これらに関する研究を行うに当たって、まず、これまで我々が行ってきたメニエール病と抗利尿ホルモンおよびアクアポリンに関する研究の結果を以下に示す。

・メニエール病患者を中心とする内リンパ水腫関連疾患でストレスホルモンである抗利尿ホルモンが異常高値を示すことを報告。(ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2009;71(1):11-3. . Acta Otolaryngol Suppl. 1995;519:219-22.)

・ヒト内リンパ嚢にアクアポリンと抗利尿ホルモン V2 受容体が存在することを報告。(Auris Nasus Larynx. 2009 Apr;36(2):135-9. Laryngoscope. 2007 Apr;117(4):695-8.)

・実験動物(ラット、マウス)の内耳にアクアポリンと抗利尿ホルモン V2 受容体が存在することを報告。(Acta Otolaryngol. 2012 Aug;132(8):807-13. Hear Res. 2010 Feb;260(1-2):11-9. Acta Otolaryngol. 2009 Aug;129(8):812-8. Acta Otolaryngol. 2008 Aug;128(8):832-40. Hear Res. 2003 Jul;181(1-2):15-9.)

・ラットに抗利尿ホルモンを投与すると内耳において AQP2 mRNA の発現が増加することを報告。(Neuroreport. 2002 Jul 2;13(9):1127-9.)

・実験動物(モルモット、ラット)に抗利尿ホルモンを慢性投与すると血管条が浮腫を起こし、内リンパ水腫が形成されることを報告。(Hear Res. 2000 Feb;140(1-2):1-6. Acta Otolaryngol. 2009 Jul;129(7):709-15.)

・内リンパ嚢閉鎖手術を行って作成した内リンパ水腫動物(モルモット)に抗利尿ホルモン受容体拮抗薬を投与することにより内リンパ水腫が軽減されることを報告。(Hear Res. 2006 Aug;218(1-2):89-97. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2005;67(5):282-8. Hear Res. 2003 Aug;182(1-2):9-18.)

これまで行ってきた研究から、メニエール病の成因に VP-AQP2 系の水代謝が深く関与していることがわかる。これをまとめると以下のごとくとなる。

抗利尿ホルモン(VP)上昇 内耳での AQP2 の発現亢進 内リンパ産生過剰 内リンパ水腫(メニエール病)

今回の研究では、抗利尿ホルモンと水チャネルが内リンパ水腫形成への関与をより詳細に検証するために、VP による AQP2 の細胞内輸送経路と発現量の変化を分子生物学的手法を用いて検討する。さらに、抗利尿ホルモン投与による内リンパ水腫形成の程度をより正確に評価する目的で従来の HE 標本ではなく optical coherence tomography(OCT)を用いて内耳迷路の変化を観察および計測する。OCT に関しては図 1 に示すごとく先行研究にて蝸牛内構造物の描出に成功している。

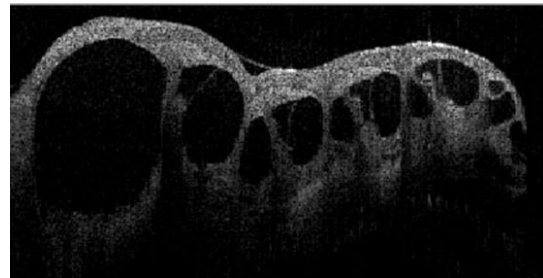


図 1 正常モルモット蝸牛の OCT 画像

2. 研究の目的

メニエール病の病理組織学的な特徴は内リンパ水腫である。この内リンパ水腫形成に抗利尿ホルモン(VP)と水チャネル(アクアポリン)の関与に関して臨床および基礎研究成果を報告してきた。しかしながら、腎臓で認められるような抗利尿ホルモンによるアクアポリン2の制御に関する直積的な報告は未だない。また、内リンパ水腫を確認するには組織学的手法によるが、通常の方法では組織作成時にアーチファクトが問題となり、厳密な内リンパ水腫の計測は行えない。本研究では、これらを踏まえた上で、モルモットを使用し、内リンパ水腫形成にかかわる抗利尿ホルモンとアクアポリンの関連を分子生物学的手法を用いて明らかにすることと、アーチファクトの無い厳密な内リンパ水腫の評価に関する研究を行う。

3. 研究の方法

これまで、ラット、マウスで行ってきた蝸牛血管条における AQP2 蛋白の発現に関する研究をモルモットを用いて行う。

実験 1 モルモットを深麻酔下にホルマリンドで経心灌流後側頭骨を採取、ホルマリンドでの浸漬固定後に EDTA にて脱灰し、凍結切片を作成。一次抗体を抗モルモット AQP2 抗体、二次抗体を蛍光抗体とし内耳血管条の AQP2 の発現を観察する。

実験 2 マウスを深麻酔下にホルマリンド

経心灌流後側頭骨を採取、ホルマリンでの浸漬固定後に EDTA にて脱灰し、凍結切片を作成。一次抗体を抗マウス AQP2 抗体と V2R 抗体、二次抗体を蛍光抗体とし内耳血管条の AQP2 と V2R の発現を観察する。

OCT による内リンパ水腫の観察を行う。

実験 3 モルモットを深麻酔下に後頭開頭、内リンパ嚢を露出後、内リンパ嚢を電気凝固し、内リンパ嚢閉塞術を行う。その後、4 週間飼育し、深麻酔下にホルマリンで経心灌流後側頭骨を採取、ホルマリンでの浸漬固定後に EDTA にて脱灰し OCT にて観察し内リンパ腔の増加率を計測する。

実験 4 モルモットを深麻酔下に後頭開頭、内リンパ嚢を露出後、内リンパ嚢を電気凝固し、内リンパ嚢閉塞術を行う。その後、4 週間飼育し、深麻酔下に生体モルモットで OCT にて蝸牛内部構造を観察する。

実験 5 モルモットを深麻酔下に後頭開頭、内リンパ嚢を露出後、内リンパ嚢を電気凝固し、内リンパ嚢閉塞術を行う。その後、4 週間飼育し、深麻酔下に生体モルモットでメニエール病の治療薬であるイソソルビドを鼓室内に投与し、内リンパ水腫軽減効果を OCT にて観察する。

4. 研究成果

実験 1 モルモットの自家蛍光により、内耳血管条の AQP2 の発現を観察することはできなかった。

実験 2 マウス内耳血管条に AQP2 と V2R の発現を認めた。

実験 3 OCT により蝸牛の骨壁だけでなく、その内部構造、ライスネル膜、らせん靭帯、コルチ器、基板が観察され、HE 標本で見られるのと同様の形態が認められた。HE 標本に比べアーチファクトが認められないことにより、より正確な内リンパ水腫の測定が可能である。さらに、OCT では標本を動かすことにより、任意の断面像を得ることができるのでより詳細な水腫の観察が可能である。

実験 4 4 週齢のモルモットでは、蝸牛骨壁を削らなくても頂回転、さらに解像度は落ちるが第 3 回転でもライスネル膜、らせん靭帯、コルチ器、基板が観察されることがわかった(図 2)。しかし、骨壁による光の散乱のため、摘出標本を脱灰して観察した蝸牛内部構造と比べると明瞭度が劣っていた。さらに蝸牛骨壁を薄く削ることにより、8 週齢モルモットにおいても、少なくとも頂回転ではライスネル膜、らせん靭帯、コルチ器、基板が

観察された。

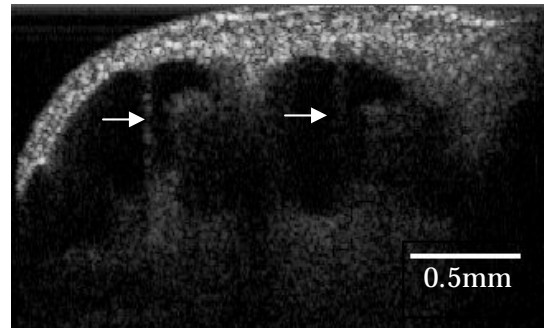


図 2 生体正常蝸牛の OCT 像(4 週齢) 頂回転、第 3 回転において、迷路骨胞、前庭鼓室階隔壁、蝸牛軸、ライスネル膜、コルチ器、ラセン板縁、蝸牛外側壁(ラセン靭帯・血管条を含む)が描出されている。蝸牛骨壁は削っていない。矢印：ライスネル膜

実験 5 イソソルビドを鼓室内に投与すると、著明な内リンパ水腫軽減効果が観察された(図 3)。

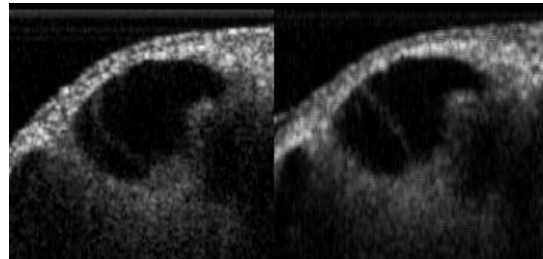


図 3 イソソルビド鼓室内投与による内リンパ水腫軽減効果 左：内リンパ嚢閉塞術後 4 週目 右：イソソルビド鼓室内投与後

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 10 件)

1. 耳科領域における画像診断法の最前線 Optical Coherence Tomography による蝸牛内部構造の観察：柿木 章伸：Equilibrium Research (0385-5716)74 巻 4 号 Page313-317(2015.08)

2. メニエール病：柿木 章伸：医学と薬学 (0389-3898)72 巻 8 号 Page1331-1336(2015.07)

3. メニエール病難治例の診療指針：鈴木 衛(東京医科大学)、池園 哲郎、伊藤 壽一、柿木 章伸、北原 紘、肥塚 泉、將積 日出夫、高橋 克昌、工田 昌也、武田 憲昭、土井 勝美、山下 裕司、青木 光広、宇佐美 真一、高橋 正紘、長沼 英明、渡辺 行雄、厚生労働省難治性疾患等克服研究事業前庭機能異常に関する調査研究班(2011-2013 年

度) : Equilibrium Research (0385-5716)73 巻 2 号 Page80-89(2014.04)

4. 内リンパ水腫と水代謝 基礎から臨床まで 内リンパ水腫形成における抗利尿ホルモンと水チャネルの役割 : 柿木 章伸 : Equilibrium Research (0385-5716)72 巻 4 号 Page274-279(2013.08)

5. Isosorbide- Induced Decompression Effect on the Scala Media: Participation of Plasma Osmolality and Plasma Arginine Vasopressin. Takeda T, Takeda S, Uehara N, Yanagisawa S, Furukawa T, Nibu KI, Kakigi A. Otol Neurotol. 2017 Apr;38(4):599-605.

6. Dehydration effects of a V2 antagonist on endolymphatic hydrops in guinea pigs. Egami N, Kakigi A, Takeda T, Yamasoba T. Hear Res. 2016 Feb;332:151-9.

7. Type 1 allergy-induced endolymphatic hydrops and the suppressive effect of H1-receptor antagonist (olopatadine hydrochloride). Egami N, Kakigi A, Takeda T, Takeda S, Nishioka R, Hyodo M, Yamasoba T. Otol Neurotol. 2014 Mar;35(3):e104-9.

8. Evaluation of the internal structure of normal and pathological Guinea pig cochleae using optical coherence tomography. Kakigi A, Takubo Y, Egami N, Kashio A, Ushio M, Sakamoto T, Yamashita S, Yamasoba T. Audiol Neurootol. 2013;18(5):335-43.

9. Morphological and functional changes in a new animal model of Ménière's disease. Egami N, Kakigi A, Sakamoto T, Takeda T, Hyodo M, Yamasoba T. Lab Invest. 2013 Sep;93(9):1001-11.

10. Localization of aquaporins in the mouse vestibular end organs. Takumida M, Takumida H, Kakigi A, Egami N, Nishioka R, Anniko M. Acta Otolaryngol. 2013 Aug;133(8):804-13.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Kakigi A. Role of Vasopressin-Aquaporin2 System in the Formation of Endolymphatic Hydrops and its Clinical Pictures. the 20th World Congress of The International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies, Seoul, Korea. 2013. 6. 1-5

2. 柿木章伸、山岨達也 . 内リンパ囊閉塞術と抗利尿ホルモン V2 作動薬によるメニエール病モデル動物の DPOAE (第 1 報). 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 . 2013.10.24-25 . 長野

3. 柿木章伸、田久保勇也、江上直也、坂本幸士、山下真司、山岨達也 . Optical

Coherence Tomography による蝸牛内部構造のリアルタイム観察 . 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 . 2013.11.24-26 . 宮崎

4. Egami N, Kakigi A, Takeda T, Yamasoba T. The effects of vasopressin type 2 receptor antagonist (OPC-41061) on endolymphatic hydrops. 37th Association for Research in Otolaryngology Midwinter Meeting, USA, San Diego, California, USA. 2014.2.22-26

5. Kakigi A, Takubo Y, Egami N, Matsumoto Y, Sakamoto T, Yamashita S, Yamasoba T. Evaluation of the Endolymphatic Hydrops of Guinea Pigs Using Optical Coherence Tomography. Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto. 2014. 11.1-4. Kyoto, Japan.

6. 柿木章伸 . Optical Coherence Tomography による蝸牛内部構造の観察 . 第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会 . 2014.11.5-7. 横浜 (シンポジウム)

7. Naoya Egami, Akinobu Kakigi, Taizo Takeda, Tatsuya Yamasoba. The effects of vasopressin type 2 receptor antagonist (OPC-41061) on endolymphatic hydrops. 13th ASIA-OCEANIA ORL-HNS CONGRESS 2015.3.19-22. Taipei, Taiwan

8. Akinobu Kakigi. Does endolymphatic hydrops cause the Meniere's attack? 2015 International Congress of Korean Society of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery. 2015.4.24-26, Seoul, South Korea (symposium)

9. 柿木章伸 . 内リンパ水腫の成因とめまい発作に関する研究 . 第 74 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会 . 2015. 11. 25-27. 岐阜 (ランチョンセミナー)

10. Akinobu Kakigi. Does endolymphatic hydrops cause Meniere's attack? 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2015.12.2-4, Tokyo (Luncheon seminar)

11. Egami N, Kakigi A, Iwasaki S, Takeda T, Yamasoba T. Morphological and functional changes in a new animal model for Meniere's disease. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2015.12.2-4, Tokyo (symposium)

12. 柿木章伸、山岨達也 . 内リンパ囊閉塞術と抗利尿ホルモン V2 作動薬によるメニエール病モデル動物の DPOAE (第 2 報). 第 60 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 2015.12.22-23 東京

13. Akinobu Kakigi. Role of Vasopressin-Aquaporin2 System in the

Formation of Endolymphatic Hydrops. 29th Barany Society Meeting 2016, 2016.6.5-8. Seoul, Korea (symposium)

14. Akinobu Kakigi, Natsumi Uehara, Naoya Egami, Shinji Yamashita, Tatsuya Yamasoba, Ken-chi Nibu. Evaluation of the dehydration effect of isosorbide on the hydropic guinea pig cochleae using optical coherence tomography in vivo. 53rd Workshop Inner Ear Biology 2016.9.17-21 Montpellier, France

15. 柿本章伸・内耳水輸送における抗利尿ホルモンと水チャネルについて．第75回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会．2016.11.24-28. 大阪（シンポジウム）〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿本章伸 (KAKIGI AKINOBU)

神戸大学・医学部医学研究科・特命教授

研究者番号：60243820

(2) 連携研究者

山下真司 (YAMASHITA SHINJI)

東京大学 先端科学技術センター・教授

研究者番号：40239968

坂本幸士 (SAKAMOTO TAKASHI)

東京大学 医学部附属病院・講師

研究者番号：50323548

江上直也 (EGAMI NAOYA)

東京大学 医学部附属病院・講師

研究者番号：10505895