

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462559

研究課題名(和文)内リンパ嚢・血管条における内リンパ液制御機構の研究

研究課題名(英文)Endolymph control system of the endolymphatic sac and the stria vascularis

研究代表者

宮下 武憲 (Miyashita, Takenori)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：60363214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：メニエール病には減塩治療が有効であり、Na摂取量を1日3g以下に制限すると、聴力も有意に改善し、眩暈も著明に改善した。血漿アルドステロン濃度も上昇しており、アルドステロンが内耳の内リンパ嚢において内リンパ吸収を促進し、症状改善した可能性が示唆された。基礎研究では、細胞間イオン輸送制御に関するトリセルリンが内リンパ嚢上皮に発現することがわかった。さらに、内リンパ嚢の3Dイメージング法を開発した。

研究成果の概要(英文)：A low-salt diet was an effective treatment for patients with Meniere's disease. This treatment will have a greater effect, when sodium intake is reduced to less than 3 g/day. A low-salt diet may induce an increase in the plasma aldosterone concentration that can activate ion transport and absorbing endolymph in the endolymphatic sac.

We also detected the expression of tricellulin, which is involved in controlling intracellular ion transport, in endolymphatic sac epithelia. Furthermore, we developed a new 3D imaging system for the endolymphatic sac.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳  
内リンパ嚢 イオン輸送 イメージング イオンイメージング 血管条 減塩治療 アルドステ

## 1. 研究開始当初の背景

難病のひとつであるメニエール病の病態は、内耳を満たしている内リンパ液が過剰である内リンパ水腫であるが、健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。内リンパ液が過剰になると、難聴やめまいが生じるため、聴力と平衡感覚の維持には内リンパ液の調節がきわめて重要である。この内リンパ液は、蝸牛の血管条で産生され、内リンパ嚢で吸収されると考えられている。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。すでに、我々は、内リンパ嚢におい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., 2007, Wu & Mori, 1999, Mori et al., 2000, Miyashita et al., 2001、宮下他、2003、Miyashita et al., 2012, Matsubara, Miyashita et al., 2013)。特に、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., 2007)。さらに、Na ポンプの制御因子のひとつである FXD6 が内リンパ嚢上皮細胞に発現し、Na ポンプと多くが共発現していることが確認できた (Miyashita et al., 2012)。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り大変重要である。

臨床からのアプローチとしては、欧米ではメニエール病の治療として減塩治療が一般的であり、減塩治療により、聴力、めまいの改善が認められると報告されており、1日のナトリウム摂取を 2 g/day (食塩 5.1 g/day) 以下に制限することが推奨されてい

る。しかし、メニエール病における減塩治療効果発現のメカニズムについては不明である。減塩治療は高血圧や腎疾患では重要な治療のひとつであり、高血圧や心血管機能、腎機能を改善させる。1日のナトリウム摂取量を 5~6 g/day 以下に制限することが推奨されており、ナトリウム摂取量を 3 g/day (食塩 7.6 g/day) 以下に制限すると、さらに効果が高くなる。この減塩により、血漿アルドステロン濃度が上昇する。また、動物実験ではアルドステロンが内耳の内リンパ嚢に働いて内リンパ吸収を増加させることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

イオン輸送体およびその制御因子について、実際の働きと、どのように制御されているかを調べることで、内リンパ液の制御系を明らかにしていくことを目的とする。我々は基礎研究として、内リンパ嚢をターゲットに研究を進めている。これまで内リンパ嚢上皮細胞において、陽イオン輸送体は様々あることが報告されているが陰イオン輸送体については存在が推定されていたが見つかっていなかった。また、細胞間輸送は細胞のパッチクランプではわからないため、細胞間輸送についても調べることを目的とした。さらに、研究手法として、内リンパ嚢全体をイメージングする方法はなかったため、全体像はわかりにくかった。そのため、全体像の中での細胞や分子の動きをみることができする方法を開発することを目的とした。

また、臨床面では、減塩治療によるメニエール病の内リンパ水腫改善のメカニズムを明らかにするために、これまでの基礎研究から減塩治療時の内リンパ嚢のイオン輸送に関与すると考えられるホルモンや電解質の変化を調べることを目的として臨床研究を計画し実行した。

### 3. 研究の方法

これまでに開発した、laser capture microdissection 法にて純粋な内リンパ囊上皮細胞由来の mRNA が集められるため、イオン輸送体の発現の有無を調べていくことで、さらにイオン輸送体およびその制御因子の探索も進めた。ラット内リンパ囊上皮細胞に発現しているイオン輸送に関連する因子を検索するため、ラット内リンパ囊を摘出し、イオン輸送体の免疫染色、および、laser capture microdissection 法にて純粋な内リンパ囊上皮細胞由来の mRNA を採取し、イオン輸送体の発現を調べた。まず、陰イオン輸送体の一つである Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) が内リンパ囊に発現しているかどうか調べた。さらに、引き続き細胞間輸送にも着目し、細胞間輸送を担うトリセルリンの発現等を調べた。また、これまでに内リンパ囊全体をイメージングできる方法はなかったが、内リンパ囊に蛍光が発現しているモデルマウスを用いて、内リンパ囊全体を詳細にイメージングできる方法を開発した。

臨床からのアプローチとして、片側性メニエール病確実例のうち、減塩治療後 2 年以上継続して経過観察できた 13 名(男性 6 名,女性 7 名,平均年齢  $52.2 \pm 15.7$  歳)を対象とした。管理栄養士により減塩食指導(ナトリウム摂取量 2 g/day 以下)を行った。めまい反復時もしくは聴力悪化時には、イソソルピド(63 g/day),ジフェニドール塩酸塩(75 mg/day)の内服を併用した。減塩指導前,2 週間後,4 週間後,6 週間後,8 週間後,6 か月後,12 か月後,18 か月後,24 か月後に以下の各検査を行った。起床後は絶飲絶食の状態、朝 9 時から 10 時の間に 30 分間のベッド上安静後に臥位で採血した。血圧,シェロングテスト,標準純音聴力検査,眼振検査,血液検査(アルド

ステロン,コルチゾール,レニン活性,ADH,ACTH などの各種ホルモン濃度と,電解質,血漿浸透圧),24 時間蓄尿検査(電解質:1 日の摂取量算出のため),尿検査(電解質,pH)を施行した。

### 4. 研究成果

分子生物学的アプローチとして、LCM 法を用いてラット内リンパ囊上皮細胞から mRNA を抽出し、細胞間輸送を制御するトリセルリンの発現をしらべると、内リンパ囊上皮細胞の細胞間結合部分に発現していた。免疫染色でも、3 つの細胞が結合する部位に特に強く発現していた。次に、トリセルリンノックアウトマウスを使用して、トリセルリン欠損時の影響を調べた。トリセルリンノックアウトマウスは、聴力には問題があったが、内リンパ囊形態、蝸牛の有毛細胞以外の形態は保たれていた。これらのことから、蝸牛では大きな EP が存在するため、イオンの漏れにより有毛細胞障害が生じるが、内リンパ囊ではトリセルリンのシール機能をほかのタンパク質が代償し機能維持している可能性が考えられた。

さらに、これまでは内リンパ囊は切片として断面的にしか解析できなかったが、立体的に 3D で分子的な解析を可能にするイメージングシステムを開発した。Prox1-GFP 組換えマウスを用い、脱灰過程を調節することで脱灰後も GFP の蛍光が強く維持できることを発見し、内リンパ囊全体を分子レベルで 3D イメージングすることに成功した(Miyashita T, et al. 2015)。また、内リンパ囊に蛍光色素を注入し、イメージングすることにも成功した。今後、さらに内耳での 3D イメージングを発展させる予定である。

臨床面でのアプローチとして、管理栄養士による減塩治療を行い、その効果と、血中ホルモンや電解質の変化、めまいや聴力

との関連を精査するプロジェクトを施行した。減塩治療によるめまいに対する治療効果 (n=13) は Class A: 84%, Class C: 8%, Class D: 8%であった。聴力に対する治療効果 (n=13) は改善: 8%, 不変: 69%, 悪化: 23%であった。次に, 2年間の24時間ナトリウム排泄量(1日のナトリウム摂取量)の平均が3 g/day以下のGroup 1と, 3 g/dayより多いGroup 2の2群に分けて検討した。Group 1 (n=7)の減塩治療によるめまいに対する治療効果は全例めまい消失し, Class A: 100%であった。Group 2 (n=6)ではClass A: 66%, Class C: 17%, Class D: 17%であった。1か月当たりの平均めまい発作回数はGroup 1のほうがGroup 2より減少していたが, 有意差は認めなかった(図1A)。Group 1の聴力に対する治療効果は改善: 14%, 不変: 86%, 悪化: 0%であった。逆に, Group 2では改善: 0%, 不変: 50%, 悪化: 50%であった。聴力に対する治療効果は3 g/day以下の減塩ができていたGroup 1のほうがGroup 2より有意に良い結果であった。また, 血漿アルドステロン濃度は2年間の減塩治療により有意に上昇し, Group 1のほうがGroup 2より血漿アルドステロン濃度が高い傾向を認めた。ADH, レニン活性, コルチゾール, BNP, ACTH, 血漿浸透圧は2年間の減塩治療でも明らかな変化は認めず, 2群間での差もなかった。

減塩治療により, メニエール病患者の84%でめまい発作が消失した。減塩治療後の聴力閾値は, 十分な減塩ができたGroup 1 (Na 3g/day)がGroup 2 (Na > 3 g/day)より有意に良い結果であり, めまい回数もGroup 1がGroup 2より減少する傾向を認めた。したがって, 減塩治療はメニエール病の治療として有効な治療法のひとつであり, 1日のナトリウム摂取量が3 g以下であれば, 聴力改善, めまい発作改善にはより有効であると考えられた。

血漿アルドステロン濃度は減塩により上昇することが報告されており, 本研究でも減塩治療により有意に血漿アルドステロン濃度が上昇した。メニエール病における減塩治療効果発現のひとつの機序として, 減塩治療により血漿アルドステロン濃度が上昇し, 内リンパ嚢における内リンパ吸収を促進し, メニエール病の症状を改善させた可能性が考えられた(Miyashita T, et. al. 2017)。

## 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)

Miyashita T, Inamoto R, Fukuda S, Hoshikawa H, Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A, Mori N.、Hormonal changes following a low-salt diet in patients with Ménière's disease.、*Auris Nasus Larynx*、査読あり、44(1)、2017、52-57

Ryuhei Inamoto, Takenori Miyashita, Ai Matsubara, Hiroshi Hoshikawa, Nozomu Mori、The difference in endolymphatic hydrostatic pressure elevation induced by isoproterenol between the ampulla and the cochlea、*Auris Nasus Larynx*、査読あり、44(3)、2017、282-287

Mori N, Miyashita T, Inamoto R, Matsubara A, Mori T, Akiyama K, Hoshikawa H.、Ion transport its regulation in the endolymphatic sac: suggestions for clinical aspects of Meniere's disease.、*Eur Arch Otorhinolaryngol*、査読あり、274(4)、2017、1813-1820

坂口 博史, 神谷 透, 宮下 武憲, 稲本

隆平, 徳増 玲太郎, 森 望, 月田 早智子, 久 育男, 蝸牛における tricellulin の機能、耳鼻咽喉科ニューロサイエンス、査読なし、30 巻、2016、8-10

Miyashita T, Burford JL, Hong YK, Gevorgyan H, Lam L, Hoshikawa H, Mori N, Peti-Peterdi J, Prox1 expression in the endolymphatic sac revealed by whole-mount fluorescent imaging、Biochem Biophys Res Commun、査読あり、457、2015、19-22

Kamitani T, Sakaguchi H, Tamura A, Miyashita T, Yamazaki Y, Tokumasu R, Inamoto R, Matsubara A, Mori N, Hisa Y, Tsukita S., Deletion of Tricellulin Causes Progressive Hearing Loss Associated with Degeneration of Cochlear Hair Cells.、Sci Rep、査読あり、doi: 10.1038/srep18402.、2015、doi: 10.1038/srep18402.

宮下 武憲、James Burford、Young-Kwon Hong、Janos Peti-Peterdi、森 望、マウス内リンパ嚢上皮細胞における Prox1 の発現、耳鼻咽喉科ニューロサイエンス、28、2014、79

松原あい、宮下武憲、稲本隆平、星川 広史、森 望、ラット内リンパ嚢における cystic fibrosis transmembrane conductance regulator の発現、耳鼻咽喉科ニューロサイエンス、査読なし、28、2014、75-78

森 望、宮下武憲、稲本隆平、松原あい、星川広史、特集1 難聴研究の新展開 内リンパ嚢の水・イオン輸送の分子機構、脳 21、査読あり、17(3)、2014、278-283

Ai Matsubara, Takenori Miyashita, Ryuhei Inamoto, Hiroshi Hoshikawa, Nozomu Mori、Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the endolymphatic sac of the rat、Auris

Nasus Larynx、査読あり、41、2014、409-412

[学会発表](計10件)

Takenori Miyashita, James L. Burford, Young-Kwon Hong, Haykanush Gevorgyan, Lisa Lam, Nozomu Mori, Janos Peti-Peterdi、Localization and proliferation of lymphatic vessels in the tympanic membrane in normal state and regeneration、Association for Research in Otolaryngology 37th Annual MidWinter Meeting、San Diego、(USA)、2014

Takenori Miyashita, James L. Burford, Young-Kwon Hong, Haykanush Gevorgyan, Lisa Lam, Hiroshi Hoshikawa, Nozomu Mori, Janos Peti-Peterdi、Whole-mount fluorescent imaging of the endolymphatic sac using prox1-GFP transgenic mice、Inner Ear Biology Workshop、Rome( Italy)、2014  
神谷 透、坂口博史、宮下武憲、稲本隆平、徳増玲太郎、田村 淳、森 望、月田早智子、久 育男、タイトジャンクション蛋白 tricellulin の内耳における機能、第 115 回日本耳鼻咽喉科学会、福岡市、2014

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各種ホルモン濃度変化と臨床所見、第 73 回日本めまい平衡医学会、横浜市、2014

宮下武憲、James Burford, 松原あい、Janos Peti-Peterdi, 森 望、内リンパ嚢上皮細胞における Pannexin1 の発現、第 32 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、大阪市、2014

Takenori Miyashita, James

L.Burford, Young-Kwon Hong, Haykanush Gevorgyan, Lisa Lam, Hiroshi Hoshikawa, Nozomu Mori, Janos Peti-Peterdi、Prox1 Expression in the Endolymphatic Sac revealed by Whole-Mount Fluorescent Imaging of Prox1-GFP Transgenic Mice、7th International symposium meniere's disease & inner ear homeostasis disorders、Rome (Italy)、2015

Ai Matsubara, Miyashita Takenori, Ryuhei Inamoto, Mori Nozomu、Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the endolymphatic sac of the rat、7th International symposium meniere's disease & inner ear homeostasis disorders、Rome (Italy)、10、2015

Mori N, Miyashita T, Matsubara A, Inamoto R、Ion transport in endolymphatic sac epithelial cells on the basis of experimental animal researches.、7th International symposium meniere's disease & inner ear homeostasis disorders、Rome (Italy)、2015

宮下 武憲、稲本 隆平、福田 信二郎、星川 広史、森 望、メニエール病の減塩治療による治療効果 -ナトリウム摂取量、各種ホルモン濃度変化と聴力・めまいの改善-、第116回日本耳鼻咽喉科学会、東京都、2015

Takenori Miyashita, Ryuhei Inamoto, Shinjiro Fukuda, Hiroshi Hoshikawa, and Nozomu Mori、Hormonal change during salt reduced diet in Meniere's disease、ARO 39th MidWinter Meeting、San Diego, (USA)、2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~jibika/index.html>

## 6 . 研究組織

(1) 宮下 武憲 (MIYASHITA Takenori)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：60363214