

令和元年6月2日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10760

研究課題名(和文) ストレスによるIP3受容体を介した内耳障害発生のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of inner ear impairment via Inositol trisphosphate receptor induced by a stress load

研究代表者

長沼 英明 (Naganuma, Hideaki)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00198342

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)：本研究が、内耳におけるInositol trisphosphate receptor type-1 (IP3受容体 type-1)の存在を確認し、また同受容体KOマウスにおいて聴力障害を来すこと、同受容体KOマウスhomo (-/-) では、Boettcher細胞の小胞体が高度に膨化していることを示した初めての報告である。そのBoettcher細胞の小胞体の高度の膨化は、IP3受容体type1の機能の欠損に起因して、異常タンパク質の蓄積(小胞体ストレス)が生じた可能性も考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境ストレスが内耳性難聴を生じさせるメカニズムの一端が解明されたことになる。このことは、メニエール病・突発性難聴などの内耳性難聴が、ストレスと強い関連性があることの解明に貢献したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study was the first report to confirm that the Inositol trisphosphate receptor type-1 (IP3 receptor type1) was observed in the cochlea and the hearing was impaired in IP3 receptor type1 KO mice, furthermore, in the homo (-/-) mice, the endoplasmic reticulum in Boettcher cell was severely swollen. This severely swollen endoplasmic reticulum in Boettcher cell may be induced by accumulation of abnormal protein (ER stress) which may be due to a deficiency in the function of IP3 receptor type 1.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：IP3受容体type1 IP3受容体type1KOマウス Boettcher細胞 小胞体ストレス 蝸牛機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Inositol trisphosphate receptor (IP3 受容体)は小胞体膜状に存在するカルシウムイオンチャネルであり、細胞内カルシウムイオン濃度を調節する(Miyawaki Mikoshiba, 1990<sup>1)</sup>, Michikawa, Mikoshiba, 1999<sup>2)</sup>)。また同チャネルにより細胞質にカルシウム波動が形成され、細胞内情報伝達系が動作して、生理作用が営まれる(Matsu-ura, Mikoshiba, 2006<sup>3)</sup>)。Furuichi, Mikoshiba らにより全塩基配列が決定された(Furuichi, Mikoshiba, 1989<sup>4)</sup>)。また 2010 年に Higo, Mikoshiba ら(Higo, Mikoshiba, 2010<sup>5)</sup>)は IP3 受容体の機能が小胞体ストレスによって破壊され、神経細胞死が誘導されること、また同受容体が小胞体ストレスから神経細胞を守る働きをしていることを初めて報告した。小胞体ストレスは、反復する個体への環境ストレス負荷によっても発生することが知られていた。

## 2. 研究の目的

内耳性難聴・内耳性めまいの発症メカニズムは不明であるが、その代表的疾患である突発性難聴・メニエール病の聴力障害の発症と精神的・肉体的ストレスとの関連性の存在が臨床しばしば想起される。特にメニエール病ではその発症と精神的・肉体的ストレスとの関連性が存在することが報告されている(Soderman 2004<sup>6)</sup>)。個体へのストレス負荷がいかにして内耳性難聴を生じさせるか、そのメカニズムが解明することを目的とする。本研究の成果により、同疾患群の治療に革命的变化が期待できる。

## 3. 研究の方法

1) Inositol trisphosphate receptor (IP3 受容体 type) type1 KO マウス ( 8 週齢 ) の聴覚機能

対象 : IP3 受容体 type1KO マウス ( 8 週齢 )( 理化学研究所、脳科学総合研究センター、発生神経生物研究チーム より供与 )、WT (+/+), hetero (+/-) 。

1. pentobarbital sodium 20mg/KgBW 腹腔内に投与により麻酔。2. ABR 測定は防音室で行い、Click を用い、加算回数は 256 回で、80dB SPL から 5dB SPL 毎に 0dB SPL まで測定し、第 1 波の出現最低音圧を ABR 閾値とした。

2) IP3 受容体 type1KO マウスの蝸牛形態

対象 : IP3R type1KO マウス ( 理化学研究所、脳科学総合研究センター、発生神経生物研究チーム より供与 )、PND: 13-17 days。WT (+/+), hetero (+/-), homo (-/-)。

深麻酔後に 2.5 glutaraldehyde 0.1M PB pH7.2 の固定液による心還流固定、側頭骨を摘出、蝸牛局所の灌流固定、浸透固定、5% EDTA による脱灰、脱水、水溶性包埋剤 Technovit 7100 (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Germany) による包埋、10 $\mu$ m で薄切、H.E.染色して観察。

3) IP3 受容体 type1KO マウスの蝸牛内同受容体タンパク量 ( Western Blotting 法 )

対象 : IP3R type1KO マウス ( 理化学研究所、脳科学総合研究センター、発生神経生物研究チーム より供与 )、PND: 13-17 days。WT (+/+), hetero (+/-), homo (-/-)。

1. 左右の蝸牛を摘出後、タンパクを抽出し -30 で凍結保存、2. 1 匹分左右 2 耳・総タンパク量 5 $\mu$ g/well に調整し SDS-PAGE 電気泳動・転写、3. 1 次抗体は抗 IP3 受容体 type1 Rat 抗体 (モノクローナル) : 4C11 (同施設より供与) を使用、4. 増強化学発光させ定性的解析。

4) IP3 受容体 type1KO マウスの聴覚に対する Arg-Vasopressin の影響

対象 : IP3 受容体 type1KO マウス ( 8 週齢 )( 理化学研究所、脳科学総合研究センター、発生神

経生物研究チーム より供与 ) WT (+/+), hetero (+/-) 。

Pentobarbital sodium 50 mg /kg BW, ip 、電極を固定、ABR 閾値を測定 (投与前聴力) AVP (Pitressin; Arg-vasopressin, Daiichi-Sankyo, Japan)、0.1 units/g BW, ip、(Control 群では同量の生理食塩水, ip)、1hr 後に ABR 閾値を測定 (投与後聴力)。

ABR 測定は防音室で行い、Click を用い、加算回数は 256 回で、80dB SPL から 5dB SPL 毎に 0dB SPL まで測定し、第 1 波の出現最低音圧を ABR 閾値とした。

#### 5) IP3 受容体 type1KO マウスの Boettcher 細胞の細胞内形態の検討

対象 : IP3R type1KO マウス (理化学研究所、脳科学総合研究センター、発生神経生物研究チーム より供与 ) PND: 13-17 days。WT (+/+), hetero (+/-), homo (-/-)。

2.5% glutaraldehyde in 0.1M PB pH7.2 による心灌流固定、側頭骨の摘出、同固定液による浸漬固定(2h, 4 )、5%EDTA による脱灰(2W, 4°C)、蝸牛軸の平面で半切、同固定液で浸漬固定 (4 日間、4 ) 型どおりの方法で超薄切片作製し TEM により観察。

### 4 . 研究成果

#### 1) Inositol trisphosphate receptor type1 KO マウス ( 8 週齢 ) の聴覚機能

hetero(-/-)マウスの ABR 閾値は WT(+/+)のそれに比して有意に上昇した。この結果から、以前に発表した PND13-17days の hetero(+/-)KO マウスの聴力低下を認めているが、それが成長の遅延に関連した聴力低下の可能性も考えられていたが、成長の遅延に関連した聴力低下でなく、IP3Rtype1(カルシウムイオンチャネル)の分子数の減少に関連した聴力低下であることが確認された。

#### 2) IP3 受容体 type1KO マウスの蝸牛形態

homo(-/-)KO マウスにおいて、Boettcher 細胞と Claudius 細胞の境界が不明瞭などの形態変化が認められた。Boettcher 細胞には IP3Rtype1 が豊富に存在しているため、同細胞の発生に、IP3Rtype1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。ただし hetero(+/-)KO マウスでは明らかな形態異常は認められなかった。

#### 3) IP3 受容体 type1KO マウスの蝸牛内同受容体タンパク量( Western Blotting 法)

homo (-/-)では陽性反応が全く認められなかった。WT (+/+)と hetero (+/-)の比較では、hetero (+/-)で IP3 受容体 type1 のタンパク量は有意に減少していることが確認された。

#### 4) IP3 受容体 type1KO マウスの聴覚に対する Arg-Vasopressin の影響

IP3 受容体 type1KO hetero(+/-)マウスでは AVP の投与で有意に聴力は低下することが確認された。このことから、IP3 受容体 type1 が、聴覚機能において重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 5) IP3 受容体 type1KO マウスの Boettcher 細胞の細胞内形態の検討

homo (-/-)群では小胞体が高度に膨化した Boettcher 細胞を高頻度に認め、次いで、hetero (+/-)でも膨化した Boettcher 細胞を認めた。ただし WT (+/+)では膨化はほとんど認められなかった。Boettcher 細胞の小胞体の高度の膨化は、IP3 受容体 type1 の機能の欠損に起因して、異常タンパク質の蓄積 (小胞体ストレス) が生じた可能性も考えられる。同受容体は小胞体ストレスにより機能が低下することが報告されており、これらのことから蝸牛において特に Boettcher 細胞、外らせん溝細胞をはじめとする IP3 受容体 type1 が認められた細胞に小胞体ストレスが負荷さ

れることによって小胞体からのカルシウムイオンの放出機能などを含む同受容体機能が低下し、その結果聴力が低下すること可能性が示唆された。

< 引用文献 >

1. Miyawaki A, Furuichi T, Maeda N, Mikoshiba K: Expressed Cerebellar-type Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, P400, Has Calcium Release Activity in a Fibroblast L Cell Lme. Neuron, Vol. 5, 11-18, July, 1990
2. Michikawa T, Hirota J, Kawano S, Hiraoka M, Yamada M, Furuichi T, Mikoshiba K: Calmodulin Mediates Calcium-Dependent Inactivation of the Cerebellar Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. Neuron, Vol. 23, 799-808, August, 1999
3. Matsu-ura T, Michikawa T, Inoue T, Miyawaki A, Yoshida M, Mikoshiba K: Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. J Cell Biol. 2006 Jun 5;173(5):755-65
4. K Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K: Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. Nature 1989 Nov 2; 342(6245):32-8
5. Higo T, Kozo Hamada K, Hisatsune C, Nukina, N, Hashikawa T, Hattori M, Nakamura T, Mikoshiba K, Mechanism of ER Stress-Induced Brain Damage by IP3 Receptor. Neuron 2010 Dec 9;68(5):865-78.
6. Soderman ACH, Moller J, Sjoback DB, Bergenius J, Hallqvist J: Stress as a trigger of attacks in Meniere's disease. A case-crossover study. Laryngoscope 2004; 1843-1848.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. 査読 有、落合敦、長沼英明：北里大学東病院神経耳科のまとめ —疾患群の推移—。Equilibrium Research 75(2):54-60, 2016.
2. 査読 有、Obata S, Ujihashi Y, Munekata S, Ochiai A, Naganuma H, Kanoh Y: Basic study of the new static stabilometry in the sitting position. Kitasato Med J 2016; 46: 146-155
3. 査読 有、Ochiai A, Naganuma H: Wernicke's encephalopathy with upbeat nystagmus. Equilibrium Res 75 (6): 505-510, 2016

〔学会発表〕(計24件)

- 1.長沼英明：メニエール病の診断と治療、神奈川県地方部会学術集会、2019
- 2.長沼英明，斎藤雄一郎，中川貴之，落合敦，徳増厚二，御子柴克彦：内耳障害とストレスの関連性の解明-IP3受容体type -1 KO マウスのBoettcher細胞の細胞内形態の検討-、第77回日本めまい平衡医学会・学術講演会、2018、(予稿集：Equilibrium Res.77 (5): p 421, 2018)
- 3.長沼英明：メニエール病に対するHydration Therapy (水分摂取療法)ーストレスとの関連性ー第15回阪神めまい・難聴研究会、2017

4. 長沼英明：内耳性めまいの原因と治療、東京都耳鼻咽喉科医会学術講演会・講習会、日本専門医機構・診療領域別（耳鼻咽喉科領域）講習、2017
5. 長沼英明：メニエール病に対するHydration Therapy（水分摂取療法）-ストレスとの関連性-、第13回 栃木県めまい・難聴研究会、2017
6. 長沼英明、齋藤雄一郎、御子柴克彦：内耳障害とストレスの関連性の解明-IP3受容体type1KOマウスの蝸牛内同受容体タンパク量-、第27回日本耳科学会総会学術講演会 2017、(予稿集：Otology Japan.27 (4): p 380, 2017)
7. 長沼英明、齋藤雄一郎、中川貴之、落合敦、徳増厚二、御子柴克彦：内耳障害とストレスの関連性の解明-IP3受容体type1KOマウスの聴覚に対するVasopressinの影響-、第76回日本めまい平衡医学会・学術講演会、2017、(予稿集：Equilibrium Res.76 (5): p 469, 2017)
8. 長沼英明：メニエール病に対するHydration Therapy（水分摂取療法）とその基礎医学的背景、第15回埼玉県めまい・難聴研究会、2016
9. 長沼英明、齋藤雄一郎、御子柴克彦：内耳障害とストレスの関連性の解明—Inositol trisphosphate receptor type 1KOマウスの蝸牛形態—、第51回日本聴覚医学会・学術講演会、2016、(予稿集：Audiology Japan Vol 59 No.5: p 611-612, 2016)
10. 長沼英明、齋藤雄一郎、中川貴之、落合敦、徳増厚二、御子柴克彦：内耳障害とストレスの関連性の解明—Inositol trisphosphate receptor type 1KOマウス(8週齢)の聴覚機能—、第75回日本めまい平衡医学会・学術講演会、2016、(予稿集：Equilibrium Res.75 (5): p 410, 2016)
11. 長沼英明：内耳障害とストレスの関連性-Inositol trisphosphate receptor-1 (IP3R1) と内耳におけるその局在-、東京埼玉神経耳科研究会、2015
12. 長沼英明、齋藤雄一郎、河原克雅、岡本牧人、徳増厚二、御子柴克彦：内耳障害とストレスの関連性の解明—Inositol trisphosphate receptor type 1 ノックアウトマウスの聴覚機能—、第74回日本めまい平衡医学会・学術講演会、2015、(予稿集：Equilibrium Res.74 (5): p 435, 2015)

〔図書〕(計2件)

1. 長沼英明：(学術書)[分担執筆]、II章 めまいと顔面神経麻痺のこと、医師・医療者から説明しておきたいこと、難治性メニエール病に対する生活指導、耳鼻咽喉科・頭頸部外科 増刊号 Vol.90 No.5 患者・家族への説明ガイド 正しく伝え、納得を引き出し、判断を促すために、インフォームド・コンセントにはコツがある！、医学書院 2018/4/30：96-97
2. 長沼英明：(学術書)[分担執筆]、VII章 A 末梢前庭系疾患、3. 内耳炎、「イラスト」めまいの検査 改訂第3版、Illustrated Neurotology、[編集]一般社団法人 日本めまい平衡医学会、診断と治療社、2018/6/20：104-105

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

1. 研究分担者氏名：御子柴 克彦

ローマ字氏名：Mikoshiha Katsuhiko

所属研究機関名：独立行政法人理化学研究所

部局名：脳科学総合研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号（8桁）: 30051840

2. 研究分担者氏名：河原 克雅

ローマ字氏名：Kawahara Katsumasa

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：名誉教授

研究者番号（8桁）: 70134525

3. 研究分担者氏名：阪上 洋行

ローマ字氏名：Sakagami Hiroyuki

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）: 90261528

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。