

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11331

研究課題名(和文) AQP11からみた内耳水代謝の解明と新たなメニエール病治療戦略の開発

研究課題名(英文) The function of aquaporin11 in inner ear

研究代表者

小林 泰輔 (KOBAYASHI, TAISUKE)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：30253313

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)：メニエール病には内耳の水代謝異常が関与している。アクアポリン11(AQP11)は内耳に発現する水チャネルで、その機能は明かでない。AQP11の内耳での機能を明らかにするため、AQP11ノックアウト(KO)マウスの聴覚と平衡機能を測定し、形態学的検討を行った。AQP11KOマウスの聴性脳幹反応は、4 kHzでは野生型マウスと比べて約13 dB閾値が高かったが、8 kHz以上では有意差はなかった。形態学的でも内リンパ水腫の所見はなく、血管条やコルチ器に有意な組織学的差異はなかった。本研究の結果、AQP11KOマウスで低音域の難聴をきたしている可能性はあるが、今後さらに検討を行う必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクアポリンは重要な水チャネルで、腎臓や肝臓で重要な役割を果たしている。内耳における機能も注目され、近年、メニエール病の病態(内リンパ水腫)に大きな役割を果たしている可能性を指摘されてる。本研究ではアクアポリンファミリーの一つである、AQP11の内耳における機能を明らかにし、その関与が明らかになれば、メニエール病の根治的治療に迫ることができると考えた。しかし、本研究の結果からはAQP11の機能を明かできなかった。内耳に負荷がかかった場合には、何らかの機能を果たす可能性はあるものの、通常状態では内耳の水代謝にはAQP11は大きな機能は果たしていないと推測された。

研究成果の概要(英文)：Pathogenesis of Meniere disease is endolymphatic hydrops due to failure of water metabolism of inner ear. Aquaporin 11 (AQP11) is one of the aquaporin family. In order to reveal the function of AQP11 in inner ear, audiometric and vestibular function were measured in AQP11 knockout mice.

In auditory brain stem responses using tone-burst, the mean threshold at 4 kHz was 13 dB higher than that of wild mice. However, in higher frequencies, i.e. in 8, 16, 24 kHz, there was no difference between AQP11KO mice and wild mice. In light microscopy observation, there was no findings of endolymphatic hydrops and no pathological findings in stria vasculitis and organ of corti. Although AQP11KO mice may have low tone hearing loss, further study is necessary to reveal role of AQP11 in the metabolism of inner ear.

研究分野：医学、耳鼻咽喉科学

キーワード：メニエール病 内リンパ水腫 アクアポリン

1. 研究開始当初の背景

難治性めまいの1つであるメニエール病の本態は内リンパ水腫であり、これには内耳の水代謝異常が深く関与している。しかし、発病のメカニズムは十分に解明されていないため、根治的治療はなく、対症的治療が主に行われているにすぎない。メニエール病発症にかかわるメカニズムを解明できれば、新たな根治的治療法の開発につながると期待されている。

内耳は内リンパと外リンパで満たされ、内・外リンパの恒常性は、腎臓と同様に多数の水チャネルやホルモン受容体により維持されている。バゾプレッシン (VP) のレセプターである V2 レセプター (V2-R) は内耳にも発現して、アクアポリン (AQP) 2 の発現を引き起こすことが明らかになっている。生体にストレスが負荷されると VP の分泌が増加し、VP は V2-R に結合し AQP2 を発現させることにより内リンパ腔に水を輸送し、内リンパ水腫が増悪、めまいが発症すると考えられている (Kitakahra T et al. *J Neuroendocrinol* 2010)。当教室の西岡らはラット血管条の基底膜に AQP2 が発現することを証明し、血管条における AQPs の局在と水輸送のメカニズムを詳細に検討した (Nishioka R et al. *Hear Res* 2010)。実際、ラットへ VP を持続的に全身投与すると内耳 AQP2 の発現が増加し、内リンパ水腫が発生することが報告されている (Sawada S et al. *Neuroreport*, 2002)。また、AQP4 ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて、聴性脳幹反応 (ABR) で約 12dB の閾値上昇をきたすことが知られている。 (Li J et al. *J Biol Chem* 2001)。内耳においては AQP2 や AQP4 以外にも水輸送にかかわるチャネルが多数存在し、AQP11 をはじめとする多くの AQPs がマウス内耳で発現することが証明されている (Takumida M et al. *Acta Otolaryngologica* 2013)。

このように、メニエール病の根治的治療を開発していくうえでは、内耳における AQP の機能を解明することが必要である。

2. 研究の目的

AQP11 は 2000 年に発見され、腎臓のみならず精巣、肝臓、脳、小腸に存在することが明らかになっている (Morishita Y et al. *Molecular Cellular Biology* 2005)。AQP11 ノックアウト (KO) マウスは腎尿細管で水代謝異常をきたすため、多発性嚢胞腎を形成し、長期生存できない。当教室においては、ラットの内リンパ嚢や蝸牛血管条に AQP11 の局在を確認している (第 73 回日本めまい平衡医学会、2014 年)。このため、AQP11 は内耳においても内リンパ嚢や蝸牛血管条において内リンパの代謝に大きな影響を及ぼしていると推測されるが、これまでに AQP11 の内耳における機能は明らかにされていない。本研究では AQP11KO マウスにおいて聴力と平衡機能を測定したのちに、内耳組織を採取して、内耳機能とともに内耳形態の変化を明らかにする。これにより AQP11 が内リンパ水腫に形成にどの程度関与しているか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

動物は C57BL/6 マウスを用いた。4~5 週齢のプライエル反射正常な野生型マウスをコントロールとして用いた。AQP11 KO マウスはこれまでの報告を基に (Morishita et al. *Molecular Cellular Biology* 2005) 作成する。以下の実験を行い、野生型マウス 6 匹 (WM 群) と AQP11 KO マウス 5 匹 (KOM 群) で結果の比較を行った。

実験 1: 聴覚機能検査

誘発耳音響放射および聴性脳幹反応の測定

ドミトール・ミダゾラム・ベトルフェール三種混合麻酔薬による全身麻酔後、に両耳の聴性脳幹反応 (ABR) の測定を行った。ABR は音響刺激装置 (DT 社製、RZ6) でクリック音、4、8、16、24 kHz のトーンバーストによる音響刺激を行い、I 波を指標に閾値を求めた。反応は誘発電位測定装置 (日本光電、MEB-9402) で加算、記録した。

実験 2: 平衡機能の測定

前庭誘発筋電位の測定: すでに当教室で行っている方法 (伊藤ら 第 74 回日本めまい平衡医学会、2015 年) により前庭誘発筋電位 (VEMP) を測定した。すなわち、ABR 測定後に、マウスを市販の固定器を改造した自作ホルダーに固定し、1%キシロカイン 10 倍希釈液で局所麻酔後に頸部に小切開を加え、針電極を胸鎖乳突筋に刺入 (関電極)、対極は後頭部正中、接地電極は背部皮下に刺入すした。刺激および記録は誘発電位測定装置 (日本光電、MEB-9402) で行った。刺激音は同側の外耳道から click 音で 100dB より 10dB ステップで音圧を下げ、VEMP の最初の陽性波 (p1) と最初の陰性波 (n1) の閾値および潜時ならびに p1 と n1 のピークの間の振幅を記録した。

実験 3: 光学顕微鏡による内耳の組織学的観察

実験 1、2 終了後、ネンブタール深麻酔下 (0.4ml/10g) にリン酸緩衝液と 4%パラフォルムアルデヒドで経心還流を行った後に頭蓋骨を採取した。実体顕微鏡下で dissection を行い、固定、脱灰後に、パラフィン包埋を行う。次いで、10 μ m の切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色を行い、蝸牛、前庭、クプラおよび内リンパ嚢の形態を光学顕微鏡で観察し、組織像を撮影した。

AQP11 KO マウスで内リンパ水腫の程度や血管条、内リンパ嚢、コルチ器に変化がないかを野生型マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) 聴覚機能検査

図1に ABR 検査の結果を呈示する。クリック音刺激およびトーンバースト刺激における高音域では、WM 群と KOM 群で閾値に有意差が認められなかった。しかし、低音域 (4 kHz) では KOM 群で有意に閾値が高かった。

(2) 前庭機能検査

図2に WM 群の1耳と KOM 群の1耳の cVEMP の例を呈示する。両群とも計測可能であった動物で、有意な差は認められなかった。

(3) 形態学的観察

光学顕微鏡による形態学的研究においても内リンパ水腫の所見はなく (図3)、野生型マウスと比べて血管条やコルチ器に有意な組織学的差異は得られなかった (図4, 5)。また、内リンパ嚢、前庭水管や前庭 (図6, 7, 9) においても WM 群と比較して、明らかな差異や異常所見はなかった。

本研究の聴覚機能検査の結果では、低音域のみで KOM 群で有意に閾値が高かった。しかし、クリック音やトーンバーストの高音域では差はなかった。これは低音域の難聴を示唆する所見である。一方、形態学的検討では内リンパ水腫の所見は認められなかった。臨床例では造影 MRI の内耳所見から、臨床症状の発現に先行して内リンパ水腫が形成されていることが報告されている。機能的検査と組織学的検討の差異については、さらなる検討が必要である。

アクアポリンは重要な水チャネルで、腎臓や肝臓で重要な役割を果たしている。内耳における機能も注目され、近年、メニエール病の病態 (内リンパ水腫) に大きな役割を果たしている可能性を指摘されてる。本研究ではアクアポリンファミリーの一つである、AQP11 の内耳における機能を明らかにし、その関与が明らかになれば、メニエール病の根治的治療に迫ることができると考えた。しかし、研究結果からは、AQP11KO マウスでメニエール病によくみられる低音域の難聴をきたす可能性はあるものの、形態学的変化はなく、AQP11 の内耳における機能は明らかでなかった。内耳に負荷がかかった場合には、AQP11 が何らかの機能を果たす可能性はあるものの、通常の内耳の水代謝には AQP11 は大きな機能は果たしていないと推測された。

<引用文献>

1. Nishioka R, Takeda T, Kakigi A, Okada T, Takebayashi S, Taguchi D, Nishimura M, Hyodo M. Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea. *Hearing Research* 260 (2010); 11-19.
2. Miyoshi T, Yamaguchi T, Ogita K, Takata Y, Ishibashi K, Ito H, Kobayashi T, Nakagawa T, Ito J, Omori K, Yamamoto N. Quantitative Analysis of Aquaporin Expression Levels during the Development and Maturation of the Inner Ear. *JARO* 18 (2015); 247-261.
3. Ichikawa R, Takeda T, Kakigi K, Kobayashi T, Hyodo M. Expression of aquaporin (AQP)-10, -11, and -12 in rat stria vascularis. (投稿中)

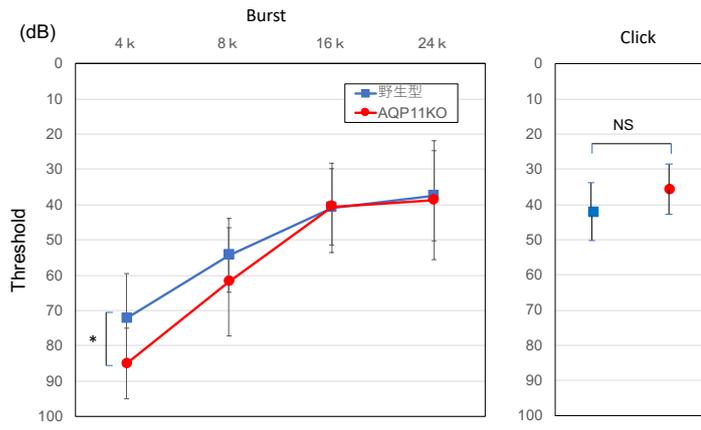
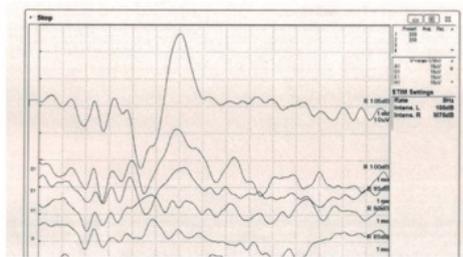
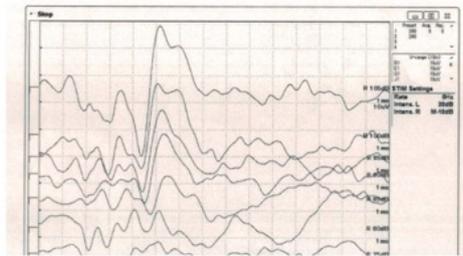


図1 ABR 閾値



野生型マウス



AQP11KO マウス

図2 cVEMP

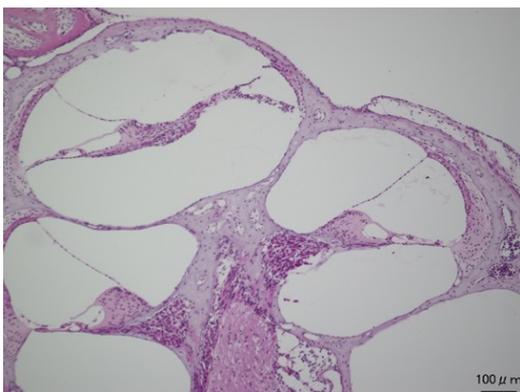


図3 AQP11KO マウスの蝸牛 (弱拡大)

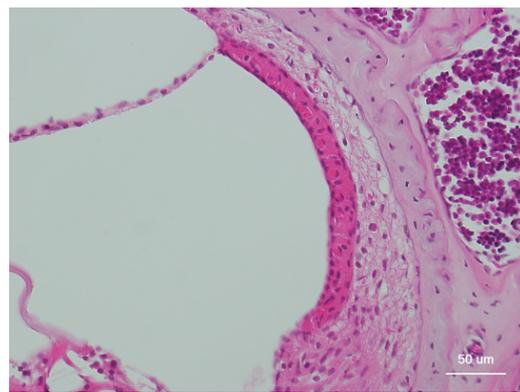


図4 AQP11KO マウスの血管条

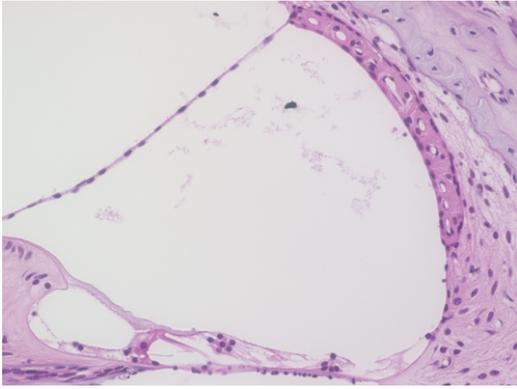


図5 AQP11KO マウスのコルチ器

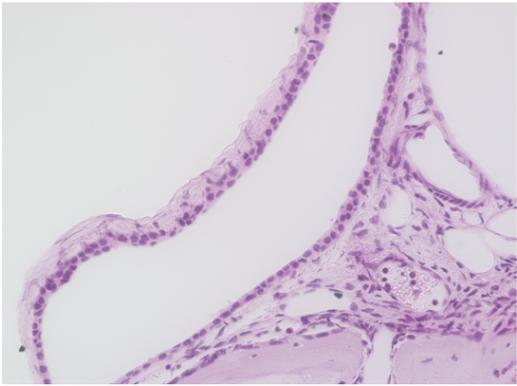


図6 AQP11KO マウスの内リンパ嚢

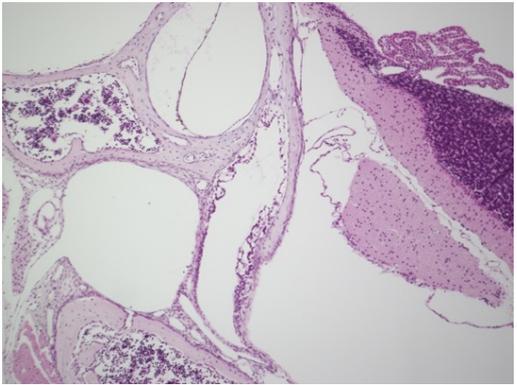


図7 AQP11KO マウスの内リンパ嚢

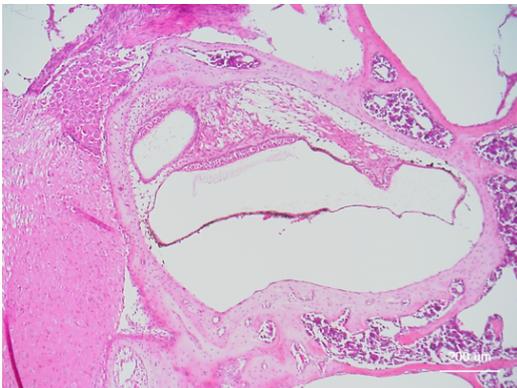


図8 AQP11KO マウスの前庭

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林泰輔
2. 発表標題 音響刺激が重心動揺に与える影響
3. 学会等名 第78回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi T
2. 発表標題 Postoperative recurrence of perilymphatic fistulae
3. 学会等名 XXX Barany Society Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小森 正博 (Komori Masahiro) (30565742)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師 (16401)	
研究分担者	石橋 賢一 (Ishibashi Kenji) (80223022)	明治薬科大学・薬学部・教授 (32684)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	伊藤 広明 (Ito Hiroaki) (80646018)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	