

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591892
 研究課題名（和文） 外リンパ蛋白の網羅的ディファレンシャル解析による治療ターゲット蛋白の同定
 研究課題名（英文） Identification of therapeutic target protein in the perilymph by comprehensive differential analysis.
 研究代表者
 池園 哲郎 (IKEZONO TETSUO)
 日本医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：80277491

研究成果の概要：

生体内耳のバイオプシーは不可能なので、ヒト内耳疾患の病態はいまだ不明の点が多く、肝や腎など生体バイオプシーが出来る臓器の疾患と比較して決定的にその解明が遅れている。そこで生体内耳の変化を「蛋白病理学的」に把握できる唯一のサンプルである外リンパに着目した。

本研究では、Ettan DIGE システム(高感度で定量的な 2 次元電気泳動蛋白解析装置)を用いて外リンパ蛋白の網羅的ディファレンシャル解析を行い、難聴患者の内耳蛋白の変化・変性の本態を探り、治療のターゲットとする蛋白を同定する事を目的とした。

Ettan DIGE システム等を可動させ、基礎実験を行いながら至適条件設定を行い解析を行った。その結果、現在の所我々がすでに発見し、臨床応用している CTP 蛋白以外の有効な内耳特異的マーカーは発見されていない。この原因として、生命現象にかかわる重要な蛋白で、微量にしか発現していない物を検出するには感度が十分ではない可能性が指摘されている。現在研究を続行中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

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：プロテオーム、蛋白、難聴、内耳

1. 研究開始当初の背景

なぜ「外リンパ」の蛋白解析なのか。ヒト内耳疾患の病態はいまだ不明の点が多く、肝や腎など生体バイオプシーが出来る臓器の疾患と比較して決定的にその解明が遅れている。なぜなら、生体内耳のバイオプシーは不可能であり、内耳で実際にどのような病変が生じているかを病理学的に調べるためには、死後の病理組織標本

をみるしか方法がないからである。我々はこの問題を解決するため、生体内耳の変化を「蛋白病理学的」に把握できる唯一のサンプルである外リンパに着目した。腎臓疾患の診断にもっとも有用なのが尿検査であるのと同じように、内耳組織の炎症、変性などにとまらう変化は当然外リンパ蛋白に反映されると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Ettan DIGE システム(高感度で定量的な2次元電気泳動蛋白解析装置)を用いて外リンパ蛋白の網羅的ディファレンシャル解析を行い、難聴患者の内耳蛋白の変化・変性の本態を探り、治療のターゲットとする蛋白を同定する事を目的とした。

内耳組織のバイオプシーは機能障害をきたすため禁忌であり、ヒト生体内耳組織を用いた研究は、特殊な場合を除き一般に不可能とされてきた。そこで我々は唯一採取可能な内耳サンプルである外リンパに着目した。外リンパは、内耳のホメオスタシスを維持するために不可欠の物質であり、様々な役割を担っていると考えられた。

3. 研究の方法

- ①ヒト外リンパの網羅的蛋白解析
- ②病的な外リンパと正常外リンパとの比較 Ettan DIGE システムによる 2D DIGE 解析
- ③サンプルの調整(前処理)を加える
- ④特異抗体を用いた 2D DIGE 解析ゲルでのウェスタンブロット解析

4. 研究成果

Ettan DIGE システム等を可動させ、基礎実験を行いながら至適条件設定を行い解析を行った。その結果、現在の所我々がすでに発見し、臨床応用している CTP 蛋白以外の有効な内耳特異的マーカーは発見されていない。

この原因として、生命現象にかかわる重要な蛋白で、微量にしか発現していない物を検出するには感度が十分ではない可能性が指摘されている。

現在研究を続行中である。

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 12 件)

- Robertson NG, Cremers CW, Huygen PL, Ikezono T, Krastins B, Kremer H, Kuo SF, Liberman MC, Merchant SN, Miller CE, Nadol JB, Jr, Sarracino DA, Verhagen WI, Morton CC: Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction. *Hum Mol Genet*, 15(7): 1071-85, 2006.
- Mizuta K, Ikezono T, Iwasaki S, Araia M, Hashimoto Y, Pawankar R,

Watanabe T, Shindob S, Mineta H. Ultrastructural co-localization of cochlin and type II collagen in the rat semicircular canal. *Neurosci Lett*. 2008 Mar 21;434(1):104-7.

- Shindo S, Ikezono T, Ishizaki M, Sekiguchi S, Mizuta K, Li L, Takumida M, Pawankar R, Yagi T. Spatiotemporal expression of cochlin in the inner ear of rats during postnatal development. *Neurosci Lett*. 2008 Oct 24;444(2):148-52. 2008
- Shojaku H, Watanabe Y, Yagi T, Takahashi M, Takeda T, Ikezono T, Ito J, Kubo T, Suzuki M, Takumida M, Takeda N, Furuya N, Yamashita H; Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan. Changes in the characteristics of definite Meniere's disease over time in Japan: a long-term survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan, formerly the Meniere's Disease Research Committee of Japan. *Acta Otolaryngol*. 2009 Feb;129(2):155-60.
- Ikezono T, Shindo S, Sekiguchi S, Charuk Hanprasertpong, Li L, Pawankar R, Morizane T, Baba S, Koizumi Y, Sekine K, Watanabe A, Komatsuzaki A, Murakami S, Kobayashi T, Miura M, Yagi T. Cochlin-tomoprotein (CTP), a novel perilymph-specific protein and a potential marker for the diagnosis of perilymphatic fistula. *Audiol Neurotol* 2009;14:338-344
- Sekine K, Ikezono T, Matsumura T, Shindo S, Watanabe A, Li L, Pawankar R, Nishino T, Yagi T. Expression of cochlin mRNA splice variants in the inner ear. *Audiol Neurotol*. 2009 (in press)
- 池園哲郎: 耳鼻咽喉科救急医療マニュアル 救急疾患の診断と治療 外リンパ瘻. *JOHNS*, 2006; 22(3): 345-350.
- トピックス「COCH 遺伝子と cochlin 蛋白-外リンパ瘻の診断における有用性」日本耳鼻咽喉科学会専門医通信 2007; 90: 14-15.
- 池園哲郎: 診断におけるコクリンの意義と検査精度・診断精度 *ENTONI* 2008; 94:

51-56.

・池園哲郎：専門講座 外リンパ瘻 日本耳鼻咽喉科学会会報，2008;111(10):676-679.

・低音障害型感音難聴 JOHNS 2009; 25(6): 895-898

[学会発表] (計 21 件)

・Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe, Saito A, Yagi T: Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. The 11th Japan-Korea joint meeting of Otorhinolaryngology-Head and neck surgery (Busan, Korea), 2006. 4.

・池園哲郎：臨床セミナー 外リンパ瘻。第 107 回日本耳鼻咽喉科学会。2006. 5.

・池園哲郎、新藤 晋、李 麗淑、関根久遠、斎藤明彦、八木 聰明：前庭における Cochlin 発現。第 65 回めまい平衡医学会。2006. 11.

・関根久遠、池園哲郎、李麗淑、新藤 晋、八木聰明：Cochlin mRNA の解析。第 65 回めまい平衡医学会。2006. 11.

・池園哲郎、新藤 晋、相田瑞恵、李麗淑、関根久遠、稲井俊太、八木聰明：アブミ骨奇形に伴う小児の変動性難聴。第 16 回日本耳科学会。2006. 10.

・新藤 晋、池園哲郎、稲井俊太、八木聰明：迷路気腫を伴った術後性外リンパ瘻の一例。第 16 回日本耳科学会。2006. 10.

・荒井真木、水田邦博、池園哲郎、橋本泰幸、岩崎聡、渡邊高弘、峯田周幸：Cochlin と Collagen type II のラット半規管での局在。第 16 回日本耳科学会。2006. 10.

・関根久遠、池園哲郎、松田 帆、中澤裕子、新藤 晋、李 麗淑、小泉康雄、斎藤明彦、馬場俊吉、八木聰明：内リンパ水腫疾患と診断されていた慢性外リンパ瘻の 2 症例。第 6 回耳鳴りと難聴の研究会。2006. 07

・池園哲郎、新藤 晋、関口沙登美、李麗淑、Ruby Pawankar、八木 聰明：A Novel Perilymph-Specific Protein for PLF Diagnosis. 2007 年 AAO アメリカ耳鼻咽喉科・頭頸部外科学会年次総会。2007. 09

・新藤 晋、池園哲郎、八木 聰明：Isoform-Specific Analysis of Cochlin in the Developing Rat. 2007 年 AAO アメリカ耳鼻咽喉科・頭頸部外科学会年次総会。2007. 09

・池園哲郎、新藤 晋、李 麗淑、関根久遠、小泉康雄、斎藤明彦、小津千佳、杉崎一樹、中村 毅、椎葉恭子、中澤裕子、八木聰明：中耳真珠腫による内耳瘻孔深達度の新しい診断法。第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会。2007. 04.

・長谷川 純、池園哲郎、新藤 晋、八木聰明：末梢性顔面神経麻痺の血清抗体価による分類についての検討。第 17 回日本耳科学会総会。2007. 10.

・杉崎一樹、池園哲郎、新藤 晋、稲井 俊太、渡辺 淳、八木聰明：耳硬化症の 3 姉妹。第 17 回日本耳科学会総会。2007. 10.

・新藤 晋、池園哲郎、関根久遠、李麗淑、八木聰明：感音成分憎悪のないアブミ骨外傷による外リンパ瘻確実例。第 17 回日本耳科学会総会。2007. 10.

・池園哲郎：外リンパ液・脳脊髄液の漏出によるめまい。第 66 回日本めまい平衡医学会総会教育講演。2007. 11

・池園哲郎、新藤 晋、関根久遠、松田 帆、八木聰明：難聴・めまいの原因診断と reporting standard (報告基準)。第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会。2008. 05.

・池園哲郎、新藤 晋、関根久遠、松田 帆、八木聰明：The clinical symptomatology of PLF and its Diversity. 第 18 回日本耳科学会総会。2008. 10.

・杉崎一樹、池園哲郎、登坂亜希子、新藤 晋：B0 症候群に人工内耳埋込み術を行い、gusher を認めた 1 症例。第 18 回日本耳科学会総会。2008. 10.

・新藤 晋、池園哲郎、関根久遠、杉崎一樹、登坂亜希子、八木聰明：生後ラット内耳発達過程の外リンパにおける cochlin 発現の検討。第 18 回日本耳科学会総会。2008. 10.

・松田 帆、池園哲郎、新藤 晋、関根久遠、八木聰明：CTP 検査法で診断したいわゆる突発性外リンパ瘻症例。第 67 回日本めまい平衡医学会総会。2008. 10.

・池園哲郎、新藤 晋、関口沙登美、関根久遠、松田 帆、八木聰明：迅速 CTP 検査法の開発 外リンパ瘻術前診断をめざして。第 67 回日本めまい平衡医学会総会。2008. 10.

・宮下元明、櫻井努、古屋信彦、池園哲郎：外リンパ瘻症例の検討 第 18 回日本耳科学会総会。2008. 10.

・三好正人、小川徹也、谷川徹、稲福繁、池園哲郎：CTP が有力なマーカーになると考えられた特発性外リンパ瘻の 1 症例 第 18 回日本耳科学会総会。2008. 10.

[図書] (計 4 件)

・外リンパ瘻 今日の耳鼻咽喉科・頭頸部外科治療指針第 3 版 医学書院 p168-169. 2008.3

・外リンパ瘻 今日の治療指針 2008 年度 p1096-97. 医学書院 2008.1

・外リンパ瘻 日本学術会議 感覚器医学研究連絡委員会 感覚器医学ロードマップ 感覚器障害の克服と支援を目指す 10 年間 第 2 版 2008.8.28. p62-65 (分担執筆)

・外傷による恒常性の破綻と内耳障害

〔産業財産権〕

○ 取得状況 (計 1 件)

発明の名称：外リンパ瘻の検出方法

特許権者：学校法人日本医科大学 ・

三菱化学株式会社

発明者：池園哲郎、八木聰明、大森彬

日本

特許番号：特許第 4172777 号

(平成 20 年 8 月 22 日)

中国

特許番号：ZL03815172.3

(登録 2007 年 9 月 5 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池園哲郎 (IKEZONO TETUO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80277491

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し