

機関番号：34419  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591982  
 研究課題名（和文） DNA マイクロアレイによる内耳病態の解明 - ヒト内リンパ嚢遺伝子の動態解析  
 研究課題名（英文） Gene Expression Profiling of Human Endolymphatic Sac by DNA Microarray Analysis  
 研究代表者  
 土井 勝美（DOI KATSUMI）  
 近畿大学・医学部・教授  
 研究者番号：40243224

研究成果の概要（和文）：難治性メニエール病確実例および対照群の内リンパ嚢に発現する多数の遺伝子群の遺伝子動態を網羅的に解析した。メニエール病確実例（MD 群）内リンパ嚢での遺伝子発現量が 0.33 倍以下に低下したのは 1214 遺伝子（16%）、遺伝子発現量が 0.33 倍以下に低下したのは 502 遺伝子（6.8%）あった。これらの遺伝子群における発現量の変化が、内リンパ水腫の形成に関係するものなのか、あるいは、存在する内リンパ水腫の結果であるのか、さらに解析を進めていく予定である。

研究成果の概要（英文）：To identify genes related to the pathogenesis of Meniere's disease (MD), gene expression profilings of the human endolymphatic sac (ES) harvested from the cases of both MD and Vestibular Schwannoma (VS) were determined by DNA microarray analysis. In the present study, we could successfully perform the DNA microarray analysis of the human ES. In spite of a tiny amount of total RNA obtained from this specialized tissue, approximately 7500 genes were identified to be there. In comparison of gene expression profiling between the human ES of both MD and VS cases, some genes were significantly up-regulated and others were down-regulated in the human ES of MD cases. The DNA microarray analysis in the present study may provide a large-scale understanding of gene expression profiling in the human ES and make it possible in future to identified the genes crossly related to the pathogenesis of MD.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：メニエール病、ヒト内リンパ嚢、DNA マイクロアレイ、聴神経腫瘍、遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

回転性めまい、難聴、耳鳴を三主徴とするメニエール病の本態とされる内リンパ水腫は、蝸牛血管条と前庭半規管膨大部の暗細胞領域における内リンパ液の産生、内リンパ嚢における内リンパ液の吸収との不均衡により生じると推察されているが、その形成機構は現在も十分には解明されていない。これまで我々は、血管条および内リンパ嚢に発現するカリウムチャネル *KCNE* 遺伝子に焦点を絞り、メニエール病確実例ゲノム中の同遺伝子の SNP 解析を行った。その結果、*KCNE1* および *KCNE3* 遺伝子上の SNP が、メニエール病の発症すなわち内リンパ水腫の形成に深く関与することを確認した (Doi et al, 2005)。 *KCNE* 遺伝子上の遺伝的バリエーションは、メニエール病発症の危険因子となる可能性が強く示唆されたのである。同時に、*KCNE* 遺伝子上の SNP は、メニエール病確実例において臨床症状 (初診時の聴力レベルなど) と相関を有することも報告した (土井, 2006)。

もちろん、多因子疾患であるメニエール病の発症には、*KCNE* 遺伝子上のバリエーション以外にも、多くの遺伝的な素因とストレス、食事、生活パターンなどのさまざまな環境因子が複雑に絡み合っているものと推察される。メニエール病の遺伝的素因をより詳細に検討するためには、蝸牛、前庭および内リンパ嚢に発現する膨大な数の遺伝子の中から、内リンパ水腫の形成に深く関与する可能性が高い遺伝子群を抽出した上で、*KCNE* 遺伝子の解析と同様の手法により、それらの遺伝子群において遺伝子変異や遺伝的なバリエーションの有無を解析していく必要がある。

そこで、本研究では、メニエール病確実例の内リンパ嚢に発現する遺伝子の動態を、瞬時に網羅的に観察することが可能な DNA マイクロアレイ法を用いて解析し、同時に、内リンパ水腫を有しない対照群の内リンパ嚢に発現する遺伝子動態と比較検討することで、内リンパ水腫の形成に関連する可能性のある遺伝子群の抽出を行い、さらに抽出された遺伝子群について、メニエール病確実例ゲノムの遺伝子解析を進めることで、メニエール病発症の遺伝的素因をより詳細に解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

外科的治療の適応となった難治性メニエ

ール病確実例のヒト内リンパ嚢より RNA 調整を行い、ジーン・チップ上に存在する数万遺伝子に関して、内リンパ嚢の遺伝子動態を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析する。対照群として、やはり外科的治療の適応となった聴神経腫瘍症例より内リンパ嚢を採取し、同様に内リンパ嚢における遺伝子発現動態を解析する。メニエール病確実例と対照群の両群間で、ヒト内リンパ嚢における遺伝子発現動態を質的・量的に比較検討することにより、メニエール病確実例の内リンパ嚢において発現量が有意に増加もしくは低下している遺伝子群を抽出する。これらの遺伝子群は、内リンパ水腫の形成もしくは内リンパ水腫の存在と密接に関連する遺伝子群であることが推察される。DNA マイクロアレイ法により抽出されたこれらの内リンパ水腫・メニエール病関連遺伝子について、メニエール病確実例ゲノム中の遺伝子変異および遺伝的バリエーションの有無についての遺伝子解析を行う。

## 3. 研究の方法

1) メニエール病確実例と聴神経腫瘍症例の外科的治療に際してヒト内リンパ嚢の抽出

当科では、難治性メニエール病確実例 (年間 10-20 例) および聴神経腫瘍 (年間 5-10 例) に対する外科的治療を施行している。本研究に関する倫理委員会への申請・受理を経て、手術症例には十分なインフォームド・コンセントを行い、内リンパ嚢上皮の採取に関して文書による同意を得た上で、手術時にそれぞれの症例で後頭蓋窩硬膜上にて内リンパ嚢を同定した後、内リンパ嚢遠位部上皮の一部 (5x5 mm<sup>2</sup>) を摘出して直ちに液体窒素中に保存する。

メニエール病確実例では、内リンパ嚢上皮の採取に続いて、通常の手術時と全く同様に内リンパ嚢を開放し、ジェルフィルムで作成したバルーニング用チューブを内リンパ嚢内へ留置して手術を終了するので、内リンパ嚢採取に同意した症例に何ら医学的な不利益が生じる可能性はない。聴神経腫瘍症例では、通常の手術時でも内リンパ嚢を除去・摘出される。

2) ヒト内リンパ嚢に発現する遺伝子の DNA マイクロアレイ解析

マイナス 80°C にて保存されたメニエ

ル病確実例および対照群(聴神経腫瘍症例)のヒト内リンパ嚢より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ・チップ上に存在する多数の遺伝子(HG Focus Array では 8,793 遺伝子、U133plus 2,0 Array では 47,000 遺伝子)とのハイブリダイゼーションを行うことにより、難治性メニエール病確実例および対照群の内リンパ嚢に発現する多数の遺伝子群の遺伝子動態を網羅的に解析する。

### 3) DNA マイクロアレイ解析によるメニエール病関連遺伝子の抽出

メニエール病確実例および対象群の内リンパ嚢にそれぞれ発現する遺伝子群について、対照群での遺伝子発現量を基準にして、メニエール病確実例内リンパ嚢での遺伝子発現量が、3 倍もしくは 1/3 (0.33) 倍に変化した遺伝子群を抽出する。複数のメニエール病確実例より抽出した内リンパ嚢遺伝子について同様の解析を行い、メニエール病確実例の内リンパ嚢でその遺伝子動態に有意な変化が見られる遺伝子群(これらはメニエール病関連遺伝子と推察される)を抽出する。

### 4) メニエール病関連遺伝子の機能別選別とヒト内リンパ嚢上皮での形態学的検討

メニエール病関連遺伝子を抽出した後、DNA マイクロアレイ解析用の専用ソフト Gene Spring により機能別の遺伝子選別を行う。Gene Spring 内には、ジーン・チップ上に存在する遺伝子群を機能別に分類したデータベースが構築されていて、抽出したメニエール病関連遺伝子の中から、内リンパ水腫形成に関与することが推察される遺伝子群、例えば、カリウムチャネル遺伝子、水チャネル遺伝子、クロライドチャネル遺伝子、ストレス関連遺伝子などに着目して、機能別に解析の標的とする遺伝子群を選別することが可能である。

### 4. 研究成果

対照群(AN 群)での遺伝子発現量を基準にして、メニエール病確実例(MD 群)内リンパ嚢での遺伝子発現量が、3 倍もしくは 1/3 (0.33) 倍に変化した遺伝子群を抽出した。メニエール病症例の内リンパ嚢では、聴神経腫瘍症例の内リンパ嚢における各遺伝子の発現量と比較して、その遺伝子発現量が低下する遺伝子群が多数確認された。MD1 で遺伝子発現量が 0.33 倍以下に低下したものが 1214 遺伝子(16%)、MD2 で遺

子発現量が 0.33 倍以下に低下したものが 502 遺伝子(6.8%)あった。AN1 と比較して、MD1 と MD2 の両者で遺伝子発現量が 0.33 倍以下に低下したのは 322 遺伝子であった。これらの遺伝子群における発現量の変化が、内リンパ水腫の形成に係るものなのか、あるいは、存在する内リンパ水腫の結果であるのか、さらに解析を進めていく必要がある。

### 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 9 件)

H. Shojaku, Y. Watanabe, N. Takeda, T. Ikezono, M. Takahashi, A. Kakigi, J. Ito, K. Doi, M. Suzuki, M. Takumida, K. Takahashi, H. Yamashita, I. Koizuka, S. Usami, M. Aoki, H. Naganuma: Clinical characteristics of delayed endolymphatic hydrops in Japan: A nationwide survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan. *Acta Otolaryngol* 130: 1135-40, 2010. 査読有

K. Terao, S. Cureoglu, PA. Schachern, MM. Paparella, N. Morita, T. Sato, K. Mori, K. Murata, K. Doi: Marrow-middle ear connections: a potential cause of otogenic meningitis. *Otol Neurotol* 32: 77-80, 2010. 査読有

N. Hikita-Watanabe, T. Kitahara, A. Horii, T. Kawashima, K. Doi, SI. Okumura: Tinnitus as a prognostic factor of sudden deafness. *Acta Otolaryngol* 130: 79-83, 2010. 査読有

K. Kizawa, T. Kitahara, A. Horii, C. Maekawa, T. Kuramasu, T. Kawashima, S. Nishiike, K. Doi, H. Inohara: Behavioral assessment and identification of a molecular marker in a salicylate-induced tinnitus in rats. *Neuroscience* 165: 1323-32, 2010. 査読有

C. Maekawa, T. Kitahara, K. Kizawa, S. Okazaki, T. Kamakura, A. Horii, T. Imai, K. Doi, H. Inohara, H. Kiyama: Expression and translocation of aquaporin-2 in the endolymphatic sac in patients with Meniere's disease. *J Neuroendocrinol* 22: 1157-1164, 2010. 査読有

Kitahara T, Maekawa C, Kizawa

K, Horii A, Doi K: Plasma vasopressin and V2 receptor in the endolymphatic sac in patients with delayed endolymphatic hydrops. Otol Neurotol, 30: 812-819, 2009. 査読有

土井勝美: めまい. ガイドライン外来診療 2009, 日経メディカル, 東京, 490-496, 2009. 査読無

土井勝美: めまいの発症機序を考える: メニエール病の遺伝的素因. Equilibrium Res., 67: 222-227, 2008. 査読有

Kitahara T., Doi K., Maekawa C., Kizawa K., Horii A., Kubo T., Kiyama H.: Meniere's attacks occur in the inner ear with excessive vasopressin type-2 receptors. J Neuroendocrinol., 20: 1295-1300, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

吉波和隆, 北原紘, 今井貴夫, 大崎康宏, 増村千佐子, 木澤薫, 岡崎鈴代, 前川千絵, 土井勝美, 猪原秀典, 堀井新: 難治性 BPPV 患者の責任半規管の同定と半規管遮断術. 第 68 回日本めまい平衡医学会, 2009, 11.27 徳島.

北原紘, 吉波和隆, 川島貴之, 今井貴夫, 大崎康宏, 木澤薫, 増村千佐子, 岡崎鈴代, 前川千絵, 土井勝美, 猪原秀典, 堀井新: 内リンパ嚢手術後および半規管遮断術後に生じる低周波数領域の気骨導差. 第 68 回日本めまい平衡医学会, 2009, 11.27 徳島.

宮部淳二, 宮口衛, 堀井新, 大崎康宏, 北原紘, 今井貴夫, 土井勝美, 猪原秀典: 2 次性と思われる内リンパ水腫を画像的に確認できた突発性難聴. 第 68 回日本めまい平衡医学会, 2009, 11.27 徳島.

前川千絵, 北原紘, 木澤薫, 岡崎鈴代, 増村千佐子, 今井貴夫, 土井勝美, 猪原秀典, 堀井新: メニエール病および遅発性内リンパ水腫における内リンパ嚢水代謝異常. 第 68 回日本めまい平衡医学会, 2009, 11.27 徳島.

西村将彦, 土井勝美, 柿木章伸, 竹田泰三: Vasopressin 投与によるラット血管条の形態変化について. 第 68 回日本めまい平衡医学会, 2009, 11.27 徳島.

土井勝美: 内リンパ嚢開放術. 第 68 回日

本めまい平衡医学会, 2009, 11.27 徳島.

北原紘, 堀井新, 木澤薫, 前川千絵, 川島貴之, 大崎康宏, 佐藤崇, 土井勝美, 猪原秀典: 内リンパ嚢手術後に生じる低周波数領域の気骨導差. 第 19 回日本耳科学会, 2009, 10.8 東京.

大崎康宏, 土井勝美, 川島貴之, 堀井新, 北原紘, 猪原秀典: 両側メニエール病・対側型遅発性内リンパ水腫症例における両側内耳造影 MR 画像の検討. 第 19 回日本耳科学会, 2009, 10.8 東京.

北原紘, 前川千絵, 木澤薫, 堀井新, 土井勝美: メニエール病内リンパ嚢における水代謝関連分子動態. 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会, 2009, 5.15 東京.

土井勝美, 大崎康宏, 久保武: メニエール病および遅発性内リンパ水腫症例への両側鼓室内 Gd 注入 MRI 検査. 第 67 回日本めまい平衡医学会, 2008, 10.30 秋田.

堀井新, 大崎康宏, 北原紘, 土井勝美: 鼓室内ガドリニウム注入 MRI による内リンパ水腫の画像診断. 第 67 回日本めまい平衡医学会, 2008, 10.30 秋田.

北原紘, 前川千絵, 木澤薫, 堀井新, 土井勝美: ストレスとメニエール病発作. 第 67 回日本めまい平衡医学会, 2008, 10.30 秋田.

西村将彦, 柿木章伸, 土井勝美, 竹田泰三: Vasopressin 投与によるラット血管条の形態変化について (第二報). 第 67 回日本めまい平衡医学会, 2008, 10.30 秋田.

西村将彦, 柿木章伸, 西岡利恵, 土井勝美, 竹田泰三: ラット内リンパ嚢における AQP サブタイプ・V2-R・NKCC サブタイプの発現について. 第 18 回日本耳科学会, 2008, 10.16 神戸.

大崎康宏, 土井勝美, 川島貴之, 久保武: 両側中耳 Gd 注入 MRI 検査での内耳造影効果の検討. 第 18 回日本耳科学会, 2008, 10.16 神戸.

他 2 件

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

土井 勝美 (DOI KATSUMI)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：40243224

(2)研究分担者

北原 紘 (KITAHARA TADASHI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：30343255

(3)連携研究者

( )

研究者番号：