

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791179

研究課題名 (和文) 内リンパ嚢における水吸収機構の解明

研究課題名 (英文) The mechanism of water absorption in the endolymphatic sac

研究代表者 中谷 和弘 (NAKAYA KAZUHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：60466563

研究成果の概要 (和文)：

siRNA_AQP2 をラットの蝸牛正円窓に留置し、48 時間後に側頭骨を採取した。抗 AQP2 抗体を用いて蛍光顕微鏡下で観察すると、negative control_siRNA を留置したものと比較して、内リンパ嚢における AQP2 の発現は減少していた。内リンパ嚢における AQP2 mRNA の発現の抑制程度については、Quantitative RT-PCR(qRT-PCR)により解析した。qRT-PCR の実験においては、採取した内リンパ嚢への硬膜の contamination を完全に排除することが困難であった。Reissner's membrane の形態には差がなかった。

研究成果の概要 (英文)：

AQP2 mRNA was knocked down by placing siRNA specific to rat AQP2 at the round window membrane. The samples were harvested 48 hours after the intervention. The immunohistochemical study under the fluorescent microscope revealed that the expression of the AQP2 in the endolymphatic sac was reduced in the group treated with AQP2 siRNA compared to the group treated with negative control siRNA. Neither endolymphatic hydrops nor endolymphatic collapse occurred in both groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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・耳科学

キーワード：RNAi, 内リンパ水腫

1. 研究開始当初の背景

メニエール病はめまいをひき起こす病気のひとつで、有病率は人口 10 万人当たり 15～

18 人と比較的好く見かける疾患である。病態は内リンパ水腫であることが分かっているものの、明らかな原因、発症機序はいまだ解

明されていない。

過去の動物実験モデルでは内リンパ管を閉鎖することで内リンパ水腫を引き起こすことが示されており、内リンパ嚢が内リンパの水吸収に関与していると考えられている。

これまで、内リンパ嚢での水吸収に関与する蛋白として、アクアポリンのサブタイプが提唱されているものの、メニエール病との直接的つながりは明らかでない。

2. 研究の目的

近年、RNA interference (RNAi) という手法が広がりつつある。

標的 mRNA に配列特異的な相同性のある dsRNA を細胞に導入することによって、標的 mRNA を認識し、発現している mRNA を特異的に分解することが出来る。われわれは、RNA interference の手法を用いることによって、アクアポリンのサブタイプをノックダウンし、内リンパ水腫との関連を解明することを目的としている

3. 研究の方法

RNAi をラットの蝸牛正円窓 (RW) に投与することで、蝸牛に発現している mRNA をノックダウンできるという報告がごく最近あったため (Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid 1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat. Mukherjea D, Jajoo S, Whitworth C, Bunch JR, Turner JG, Rybak LP, Ramkumar V. J Neurosci. 2008 Dec 3;28(49):13056-65.)、これに準じて AQP2_RNAi、AQP4_RNAi を蝸牛 RW に投与した。

RNAi 投与

250-350g の Wistar Rat をキシラジン・ケタミン腹腔内投与により麻酔後、耳後切開、1) ブラを一部開放、2) RW 前方の骨壁 (ブラと連続した部分) をドリリング、3) RW 前面と周囲骨組織が作る陥凹部に、RNAi を 5 μ l 滴下 (ピペットマンとガラス管使用)、4) 15 分待ったあと、同部位にスポンゼルを留置 5) 閉創、48 時間後に側頭骨を採取した。

免疫染色

4%パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定後側頭骨を採取、RW、卵円窓から 4%PFA を灌流させた。24 時間 4%PFA で固定後、10%EDTA で 72 時間脱灰を行った。パラフィン包埋し 5 μ m に薄切した。5%アルブミン入 PBS-TritonX で 30 分ブロッキング、ラビット抗ラット AQP2 抗体 (Chemicon #AB3274) (1:100)、ラビット抗ラット AQP4 抗体 (#AB3594) (1:100)、で Over night 後 Alexa Fluor® 488 抗ラビット抗体 (INVITROGEN #A11008) (1:1000、2 時間) で蛍光標識した。また、Alexa Fluor® 594 phalloidin (INVITROGEN #A12381) (1:40、15 分) を使用した。蛍光顕微鏡下で

観察した (Keyence #BZ-9000)。

Quantitative RT-PCR

採取した側頭骨から内リンパ嚢を取り出し、RT-PCR により mRNA の発現を定量した。内リンパ嚢と周囲組織 (骨、硬膜、結合組織、血管) とを正確に分離することは技術的に困難であったため、周囲組織の混入がないことを周囲組織にのみ存在する mRNA の発現を確認することで採取標本の純度を確認した (A new approach for selective rat endolymphatic sac epithelium collection to obtain pure specific RNA. Akiyama K, Miyashita T, Matsubara A, Mori T, Inamoto R, Nishiyama A, Mori N. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Nov 21;376(3):611-4.)。

使用した primer

Aqp2_1_F GGTCCAGTGCAGAGTAGC

Aqp2_1_R GCGGAGACGAGCACTTTTAC

Aqp2_2_F CCACGCTCCTTTTGTCTTC

Aqp2_2_R TTGTGGAGAGCATTGACAGC

Aqp2_3_F GAGAGAGGGAGGAGGAAGA

Aqp2_3_R CATAGAAGGCAGCTCGAAGG

Aqp4_1_F gggagagagaagagccacct

Aqp4_1_R gctcccagcatctacctcag

Aqp4_2_F acagcttgacattgtgtgctc

Aqp4_2_R tctttgtttccacaccaca

Aqp4_3_F gtcatttccaggacagcat

Aqp4_3_R tctttgtttccacaccaca

18S_F GAGGTTCGAAGACGATCAGA

18S_R GAGGTTCGAAGACGATCAGA

Osteocalcin_F GGTGCAAAGCCCAGCGACTCT

Osteocalcin_R GGAAGCCAATGTGGTCCGCTA

Calponin H1_F GGGGGTCAAATATGCAGAGA

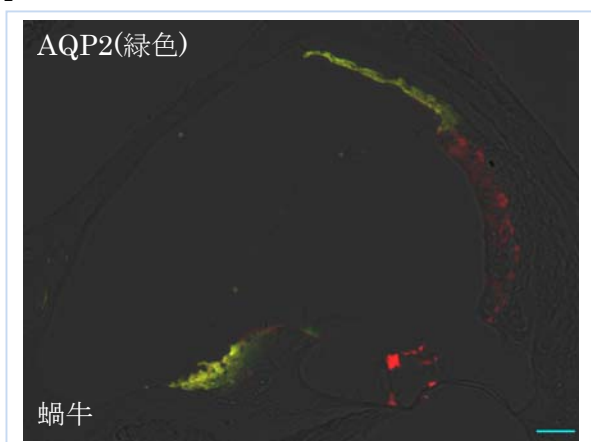
Calponin H1_R GACGTTGAGCGTGTCCACAGT

NKCC2_F CCGTCGCCTACATAGGTGTT

NKCC2_R CCCTTTGCGAAGAAGTGAAG

4. 研究成果

非介入時の蝸牛における AQP2、AQP4 の発現



AQP4(緑色)

蝸牛

Negative control (phalloidinのみ)

蝸牛

AQP2 は stria vascularis 上方の lateral wall と spiral limbus の一部に発現していた。AQP4 は Hensen's cells に発現していた。Negative control では信号が見られなかった。

AQP2_RNAi 投与後の内リンパの変化と AQP2 の発現

AQP2_RNAi 投与後

蝸牛

AQP2_RNAi 投与後

内リンパ嚢

50 μ m

AQP2_RNAi 投与後

蝸牛

50 μ m

Negative control_RNAi 投与後

蝸牛

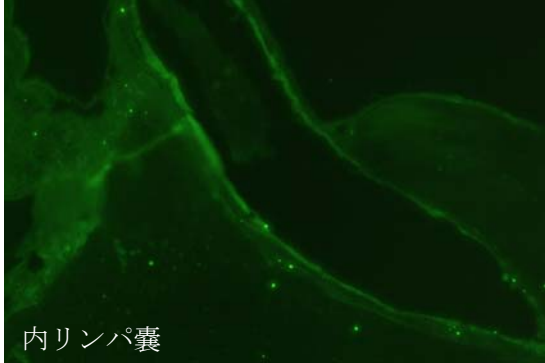
50 μ m

AQP2_RNAi 投与後

内リンパ嚢

50 μ m

Negative control_RNAi 投与後



内リンパ囊

HE染色ではAQP2_RNAi投与後に蝸牛の明らかな変化は見られなかった。内リンパ水腫や内リンパのcollapseも認めなかった。内リンパ囊にも明らかな変化を認めなかった。蛍光染色では、蝸牛においてはAQP2の発現はAQP2_RNAi投与群とnegative control_RNAi投与群で明らかな差を認めなかったが、内リンパ囊ではAQP2_RNAi投与群でAQP2の発現が抑制されていた。

Quantative RT-PCRによるAQP2 mRNAの定量

内リンパ囊でのAQP2, 4 mRNAの発現、Osteocalcinなどの混入マーカーのmRNAの発現に関しては安定したデータが取得できなかった。これは、周囲組織が混入することなく、内リンパ囊のみを採取することが技術的に困難であるためと考えられた。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 和弘 (NAKAYA KAZUHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号： 60466563

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：