

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591883
 研究課題名（和文） メニエール病発症における β アドレナリン受容体の役割に関する研究

研究課題名（英文） Research on the role of β adrenergic receptors in pathogenesis of Meniere's disease

研究代表者

森 望 (MORI NOZOMU)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：90124883

研究成果の概要（和文）：カテコールアミンが β 作用により蝸牛および前庭半規管の内リンパ圧を上昇させるが、内リンパ嚢閉塞動物（モルモット）では上昇しないことからこの上昇作用には内リンパ嚢が大きく関与していることが考えられる。また、その上昇量は蝸牛の方が前庭半規管より大きいことが示されたが、このことはメニエール病においても蝸牛症状の方が前庭症状より起こる頻度が高いことと関連していると考えられる。ラット内リンパ嚢上皮細胞（中間部）に β_2 アドレナリン受容体の特異的な強い発現が認められたことはカテコールアミンは β_2 作用により内リンパ嚢直流電位を低下はさせるとする電気生理学的報告と符合するものであった。カテコールアミンが内リンパ嚢の β_2 アドレナリン受容体を介してリンパ圧上昇作用を起こすことが示されたことは、ストレスがメニエール病発症、症状悪化に関与しているとの臨床所見に基礎的な根拠を与えるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The results that catecholamines increased endolymphatic hydropressure in the cochlea and semicircular canal in the normal guinea pigs but not in the guinea pigs with obstructed endolymphatic sac (ES) strongly suggest the involvement of ES in increased endolymphatic hydropressure by catecholamines. The findings that catecholamines increased endolymphatic hydropressure in the cochlea to a larger degree than that in the semicircular canal correspond to clinical findings that Meniere patients suffer more frequently from the cochlear symptoms than the vestibular symptoms. The strong expression of β_2 -adrenergic receptor in epithelial cells of the ES intermediate portion accords with the electrophysiological results that catecholamines decrease ES direct current potential via β_2 -action.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、 β 受容体、内リンパ嚢、内リンパ圧、ストレス

1. 研究開始当初の背景

代表的ストレスホルモンであるカテコールアミンが β 作用により内リンパ圧を上昇させ、この上昇作用には内リンパ嚢が大きく関与していることが最近のわれわれの研究から明らかになってきた(1, 2)。本研究において内耳内リンパ系における β アドレナリン受容体(AR)の関与の詳細を検討した。

2. 研究の目的

本研究において内耳内リンパ系における β アドレナリン受容体(AR)の関与の詳細を検討した。

3. 研究の方法

1) 内耳圧測定

Hartley系モルモット(300g - 400g, Preyer反射陽性)をketamine(50mg/kg), xylazine(5mg/kg)筋肉注射による全身麻酔後、自発呼吸下に中耳骨胞上部を開放し、蝸牛は正円窓から、また半規管には上半規管膨大部から半規管に移行する部位の骨壁の小孔から微小ガラス電極(先端5-10 μ m, 2MKClを充填)を挿入し、蝸牛、半規管の内リンパ腔、外リンパ腔の静止電位と静水圧を90A micropressure system(WPI社製)を使用して測定した。イソプロテレノール(プロタノール[®])を生理食塩水2.5mlに溶かし(6.25 μ g/kg/min)、静止電位、内リンパ圧が安定していることを確認後に、内頸静脈に留置したカテーテルからインフュージョンポンプを用いて5分間投与した。

2) 分子生物学的手法

4週のWistar系雌ラットから全身麻酔下に還流固定後に断頭、両側側頭骨を摘出した。脱灰した側頭骨を厚さ10~12 μ m切片にスライス、脱水処理後、顕微鏡下にて内リンパ嚢上皮、あるいは蝸牛血管条を、LCM(Laser Capture Microdissection)にて選択的に採取

した。LCMサンプルよりTotal RNA抽出、逆転写反応でcDNAを作成した。 α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{2A} 、 α_{2B} 、 β_1 、 β_2 、 β_3 -ARに特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行った。

3) 免疫組織学的手法

固定・脱灰後の側頭骨より、厚さ10~12 μ mの内リンパ嚢中間部の切片を作成した。固定、洗浄、ブロックングを経て、 α_1 、 α_{2A} 、 α_{2B} 、 β_1 、 β_2 、 β_3 -ARに特異的な一次抗体を用いて免疫組織染色を行った。二次抗体にはAlexa Fluor-488 goat anti-rabbit IgGまたはAlexa Fluor-488 goat anti-mouse IgGを使用した。核染色に4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)を用いた。Positive controlには α_1 、 β_1 、 β_3 ; 心臓、 α_{2A} 、 α_{2B} ; 食道、 β_2 ; 肺を用いた。Negative controlは一次抗体を省略したものとした。

4. 研究成果

1) 内耳圧測定結果

内リンパ嚢未閉塞動物でのイソプロテレノール(6.25 μ g/kg/min)を静注投与したとき、膨大部内リンパ電位(ampullar endolymphatic potential:AEP)には変化は認めないが、前庭内リンパ圧には一過性の上昇がみられたが変化量は蝸牛より有意に($p < 0.01$)小さかった。なお、生理食塩水投与時に、AEPおよび前庭内リンパ圧には変化は認めなかった。内リンパ嚢を閉塞した直後にイソプロテレノールを投与したところ、前庭内リンパ圧の一過性の上昇は抑制されており、AEPには変化は認めなかった。

2) RT-PCR結果

LCMにより切り出し、抽出した内リンパ嚢上皮totalRNAから、7つのターゲットARすべてのtranscriptがみられた。また、蝸牛血管条からのLCMサンプルからは β_1 、

β_2 -ARはバンドが見られたが、 β_3 -ARは確認できなかった。

3) 免疫組織学的結果

内リンパ嚢中間部上皮において、 β_2 -ARは特異的な強い発現が認められた。 β_2 -ARよりは弱い β_3 -ARも上皮細胞に発現がみられた。 α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{2A} 、 α_{2B} 、 β_1 -ARは特異的な蛍光染色は確認できなかった。Positive controlではそれぞれの抗体において特異的な染色が確認された。

4) 考察

今回の研究から蝸牛同様に前庭半規管においてもイソプロテレノールは内リンパ圧、外リンパ圧を上昇させることが明らかになった。蝸牛の上昇量にくらべて、小さい値であったことは蝸牛と前庭での膜迷路の膜特性の違いによるものなどが考えられる。メニエール病においても蝸牛症状の方が前庭症状より起こる頻度が高いことと関連しているかもしれない。我々の一連の研究からカテコールアミンが β 作用により蝸牛、前庭半規管の内リンパ圧を上昇させ、この上昇作用には内リンパ嚢が大きく関与していることが明らかになり、メニエール病の発症にストレスが関与している臨床報告の基礎的根拠を与えるものと考えられる。

今回のLCMを用いたRT-PCR、免疫組織学的結果から α -、 β_1 -ARの内リンパ嚢上皮における局在はみられず、 β_2 -ARの局在が特異的に認められたことは、カテコールアミンによるESPの低下は β_2 作用であるという以前の電気生理学的な報告と符合するものであった。特に内リンパ嚢中間部の上皮細胞という、最もイオン輸送が活発とされている部位でその局在を確認できたことは、カテコールアミンが β_2 -ARを介して内リンパ嚢の機能に作用していることを示唆するものである。

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 3件)

1) Matsubara, A., T. Miyashita, T. Mori, K. Akiyama, R. Inamoto and N. Mori (2012)

The mRNA of claudins is expressed in the endolymphatic sac epithelia.

Auris Nasus Larynx 39:361-364.

2) Miyashita, T., K. Akiyama, R. Inamoto, A. Matsubara, T. Nakagawa, F. Yamaguchi, M. Tokuda and N. Mori (2012)

Presence of FXVD6 in the endolymphatic sac epithelia.

Neuroscience Letters 513:47-50.

3) Matsubara, A., T. Miyashita, R. Inamoto and N. Mori (2013)

Presence of adrenergic receptors in rat endolymphatic sac epithelial cells.

J. of Membrane Biol. 246:109-114.

[学会発表] (計 3件)

1) Matsubara, A., T. Miyashita, T. Inamoto and N. Mori

Presence of adrenergic receptors in the rat endolymphatic sac epithelial cells.

The first Asian Otolology Meeting & the 3rd East Asian Symposium on Otolology Nagasaki, Japan June, 2-3, 2012.

2) 松原あい、宮下武憲、稲本隆平、森 望
ラット内リンパ嚢におけるアドレナリンレセプターの発現.

第30回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会 平成24年8月25日

3) 稲本隆平、宮下武憲、森 望

イソプロテレノールの内耳への影響.

第30回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会 平成24年8月25日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 望 (MORI NOZOMU)

研究者番号 : 90124883

(2) 研究分担者

宮下 武憲 (MIYASHITA TAKENORI)

研究者番号 : 60363214

秋山 貢佐 (AKIYAMA KOSUKE)

研究者番号 : 40568838

稲本 隆平 (INAMOTO RYUHEI)

研究者番号 : 50581047

(3) 連携研究者

松原 あい (MATSUBARA AI)

研究者番号 :