

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592553

研究課題名(和文)水代謝機構を標的とした新たなメニエール病のモデルと治療法の開発

研究課題名(英文)The role of aquaporin 11 in water metabolism of inner ears

研究代表者

小林 泰輔 (KOBAYASHI, Taisuke)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：30253313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：メニエール病は内耳の水代謝に障害をきたし内リンパ水腫をきたすことが原因とされている。内耳の水代謝にはバソプレッシンを介した水チャネル・アクアポリン2(AQP2)が関与している。最近発見されたアクアポリン11(AQP11)もAQP2と同様に内耳に発現することが知られているが、AQP11の内耳における機能は明らかになっていない。本研究ではAQP11ノックアウトマスの聴覚を測定するとともに組織学的に内耳を観察した。その結果AQP11ノックアウトマスでは野生型マウスに比べて、15～50dBの閾値が高かった。しかし光学顕微鏡による組織学的研究では、内リンパ水腫は認められず、有意な形態的变化はなかった。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of Meniere disease is believed to be endolymphatic hydrops due to failure of water metabolism of inner ear. Aquaporin 2 (AQP2) involves water metabolism of inner ear through the vasopressin system. Aquaporin 11 (AQP11) is also one of the aquaporin family and it may have important role in the metabolism of inner ear. Recent study revealed that AQP11 is expressed in inner ears as well as AQP2. However, the function of AQP11 in inner ear is still unclear. In this study, the hearing of aquaporin 11 knockout mice was measured by auditory brain stem response. The inner ears were observed histologically. The thresholds of ABR of AQP11 knockout mice were higher than 15 to 50 dB. However, there was no evidence of endolymphatic hydrops in a histological study and no definitive difference in other inner ear structure under the observation of a light microscopy.

研究分野：医学、耳鼻咽喉科学、神経耳科学

キーワード：めまい メニエール病 水チャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) メニエール病はめまい発作と難聴を繰り返して起こし、徐々に難聴が進行していく原因不明の疾患である。現時点では根本的治療がなく、めまい発作時には対症的治療を行い、めまいの消退を待つのが一般的治療である。近年、内耳における水代謝機構が解明されつつあり、メニエール病の病態解明がすすんだ。研究協力者の Nishioka らはラット血管条における水チャネルであるアクアポリンの局在を詳細に検討したうえで、ストレスホルモンであるバゾプレッシンが、蝸牛血管条で V2 レセプター(以下 V2-R)に結合し、アクアポリン 2 (以下 AQP2) が発現することにより、内リンパに水が輸送され内リンパ水腫が形成されめまい発作が起こると推定している (Nishioka et al. Hear Res 2010)。以上のことよりメニエール病の本態である内リンパ水腫の形成に水チャネル・アクアポリンが深く関与していることが明らかになった。

(2) 近年、他にも多くのアクアポリンが発見されている。アクアポリン 11 (AQP11) は比較的最近発見され、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。AQP11 ノックアウトマウスは多発性嚢胞腎を形成し、腎不全をきたすため生後長期生存が困難である (Morishita Y et al. MOL. CELL. BIOL. 2005)。腎臓以外では、肝細胞にも空胞変性を来すことが示されているが、しかし、他の臓器における AQP11 の機能は依然として不明である (Ishibashi et al. Biochimica et Biophysica Acta 2013)。最近の研究から、内耳においてもマウスの前庭の感覚細胞、内リンパ嚢や前庭神経節において AQP11 の発現が報告されている (Takumida et al. Acta Otolaryngologica 2013)。このことより、AQP2 同様、AQP11 は内耳の水代謝において重要な機能を担っていると推定されるが、現時点で明らかにされていない。

2. 研究の目的

これまでの研究結果からアクアポリンは内耳の水代謝関与しており、内リンパ水腫の形成にも深くかかわっているとされている。本研究は AQP11 の内耳における機能を明らかにすることにより、メニエール病の発症機序の一部を明らかにしたい。実験では野生型マウスと AQP11 ノックアウトマウスにおいて聴力を測定したのちに、内耳を採取して、内耳機能とともに内耳形態的变化を明らかにする。この結果を比較検討することにより、AQP11 が内耳における機能を明らかにしたい。

3. 研究の方法

動物は C57BL/6 マウスを用いる。4 週齢のブライエル反射正常な野生型マウス 6 匹をコントロールとして用いる。ネンプタル麻酔下 (0.1ml/10g) に聴性脳幹反応 (ABR) の測定を行う。ABR は誘発電位測定装置 (日本光電、MEB-9402、現有機) で発生させた click 音を用いて測定し、100 dB より 10 dB ステップで音圧を下げ、I 波を指標に閾値を求める。閾値付近では 5 dB ステップとした。これらの測定後にネンプタル深麻酔下 (0.4ml/10g) にリン酸緩衝液と 4% パラホルムアルデヒドで経心還流を行った後に頭部を採取する。固定、脱灰後に、頭蓋骨はパラフィン包埋して 6 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、内リンパ嚢およびクプラの形態を光学顕微鏡下に観察する。

AQP11 ノックアウトマウスは Morishita らの方法により作成された 4~6 週齢のものを使用した (本ノックアウトマウスは明治薬科大学、石橋賢一教授より供与を受けた)。コントロール群と同様に ABR の測定と組織学的観察を行い、その結果を野生型のものと比較した。

4. 研究成果

(1) 聴覚機能

野生型マウスにおける聴覚機能について ABR で検討を行った結果は閾値 25dB で左右差は認められなかった (図 1)。一方 AQP11 ノックアウトマウスの閾値は 40dB から 75dB であり、左右差がある個体もあった (図 2)。

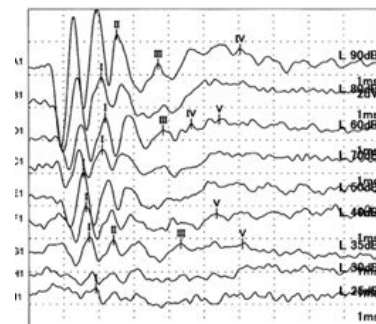


図 1 野生型マウスの ABR 例

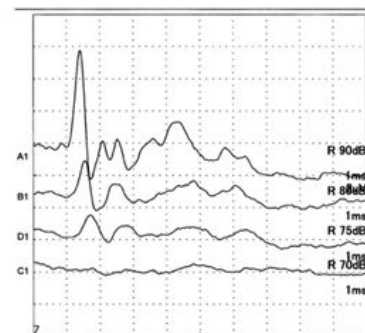


図 2 AQP11 ノックアウトマウスの ABR 例

(2) 形態学的変化

AQP11 ノックアウトマウスの蝸牛や前庭に内リンパ水腫の形成は認められなかった(図6)。また、野生型マウスの結果と比較して、AQP11 ノックアウトマウスの血管条、コルチ器や前庭器の感覚細胞には形態学的に大きな差異は認められなかった(図7)。AQP11 ノックアウトマウスの1耳において、内リンパ嚢上皮に浮腫状変化があったが、有意な変化であるか否か判定困難であった(図8)。

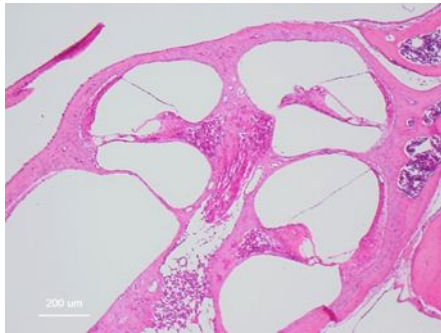


図3 野生型マウス蝸牛

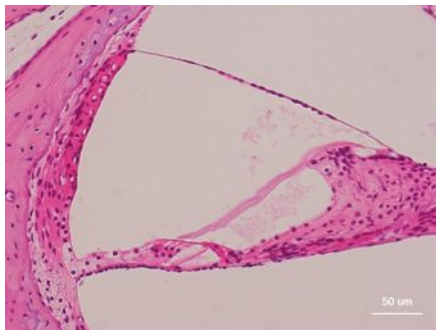


図4 野生型マウスのコルチ器と血管条

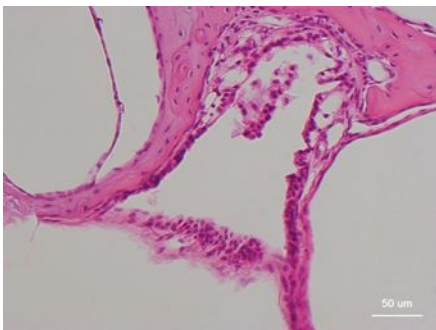


図5 野生型マウスの内リンパ嚢

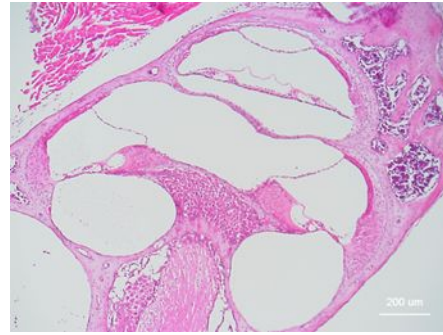


図6 AQP11 ノックアウトマウスの蝸牛

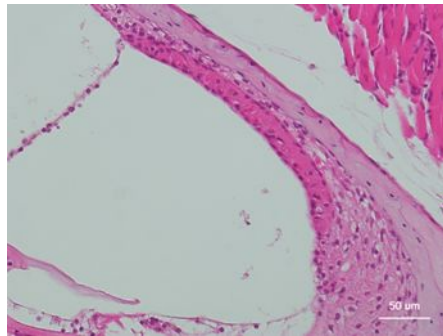


図7 AQP11 ノックアウトマウスの血管条

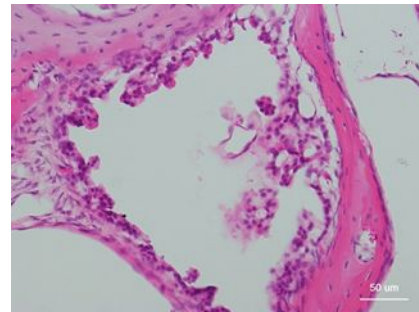


図8 AQP11 ノックアウトマウスの内リンパ嚢

(3) 考察

本研究の結果からAQP11 ノックアウトマウスは、生後4から5週齢において、すでに難聴をきたしていることが明らかになった。AQP11 ノックアウトマウスは腎機能障害のため、成長が阻害されて個体が小さく、運動能も障害されているため、平衡機能に関しては測定することが困難であった。しかし、生後間もなくから内耳機能に障害をきたしていたと考えられる。形態学的には内リンパ水腫の形成はなかった。また他の明確な差異はなかった。唯一内リンパ嚢の上皮の浮腫状変化が認められたが、非特異的变化の可能性もあり、今後さらなる検討を要する。生後4週の間、機能的な障害はできるものの、顕微鏡レベルでの形態学的異常は見いだされていない

ことになり、今後電顕レベルでの検討が必要になる。

本研究では AQP11 が内耳機能の維持に関与していることが明らかになったが、平衡機能に関しては明らかにすることができなかった。今後この点を明らかにするとともに、形態学的に障害部位が明らかになれば、内耳の水代謝機構をさらに解明することにつながり、ひいてはメニエール病の病態解明や治療につなげることができると期待される。

引用文献

- 1 . Nishioka R, Takeda T, Kakigi A, et al. Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea. *Hearing Res* 2010; 260: 11-19.
- 2 . Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-chikuma M, et al. Disruption of Aquaporin-11 Produces Polycystic Kidneys following Vacuolization of the Proximal Tubule. *MOL. CELL. BIOL.* 2005; 25: 7770-9.
- 3 . Ishibashi K, Koike S, Kondo S, et al. The role of a group III AQP, AQP 11 in intracellular organelle homeostasis. *J Medical Investigation* 2009; Suppl 56; 312-7.
- 4 . Takumida M, Takumida H, Kakigi A, et al. Localization of aquaporins in the mouse vestibular end organs. *Acta Oto-Laryngologica*, 2013; 133: 804-13.
- 5 . Sheykhholeslami K, Megerian CA, Zheng QY. Vestibular Evoked Myogenic Potentials in Normal Mice and *Phex* Mice With Spontaneous Endolymphatic Hydrops. *Otol Neurotol*, 2009; 30: 535-44.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

西岡利恵、竹田泰三、小林泰輔、兵頭政光.
ラット内耳前庭内リンパ嚢における AQP10~12 の発現. 第 73 回めまい平衡医学会総会・学術集会. 平成 26 年 11 月 6 日、パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

西岡利恵、竹田泰三、小林泰輔、兵頭政光.
AQP11 ノックアウトマウスの内耳の形態変化. 第 72 回めまい平衡医学会総会・学術集会. 平成 25 年 11 月 14 日、大阪国際交流センター (大阪)

西岡利恵、小森正博、小林泰輔、兵頭政光.
ラット血管条における AQP10・11・12 の発現. 日本耳鼻咽喉科学会第 39 回中国四国連合学会. 平成 25 年 5 月 25 日、総合あんしんセンター (高知)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 泰輔 (KOBAYASHI, Taisuke)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号: 30253313

(2) 研究分担者

小森 正博 (KOMORI, Masahiro)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号: 30565742

兵頭 政光 (HYODO, Masamitsu)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 00181123

(3) 研究協力者

石橋 賢一 (ISHIBASHI, Ken-ichi)
明治薬科大学・教授
研究者番号: 80223022

西岡 利恵 (NISHIOKA, Rie)
仁生会三愛病院
研究者番号: 2039805

伊藤 広明 (ITO, Hiroaki)
高知大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 80646018