

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890155

研究課題名(和文)内耳・内リンパ嚢におけるイオン輸送及び制御機構の研究

研究課題名(英文)ion transport and regulation of the ion transport in the inner ear and endolymphatic sac

研究代表者

宮下 武憲(Miyashita, Takenori)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：60363214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：内リンパ嚢は、近位部、中間部、遠位部の3部位に分けられるが、いずれの部位でもProx1の発現が確認できた。内リンパ嚢中間部はmitochondria-rich cellsと、ミトコンドリアが少ないribosome-rich cellsの2種類の細胞から構成されるが、mitochondria-rich cellsではProx1はほとんど発現していなかった。内耳(蝸牛)、神経系におけるProx1の機能は、前駆細胞から機能を持った細胞への分化誘導を促していると報告されている。内リンパ嚢においても、Prox1がイオン輸送障害時等に機能性細胞への分化誘導を推し進めていることが推測された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the expression of Prox1 in all parts of the endolymphatic sac epithelia in adult stage. Prox1 was used as a marker for the endolymphatic sac epithelia. The use of Prox1-GFP mice made possible the whole-mount imaging and three-dimensional observations of the endolymphatic sac epithelial cells through decalcified temporal bone. Using this whole-mount imaging technique and vascular staining with dextran-rhodamine, the endolymphatic sac was observed. In the proximal portion, the endolymphatic sac was narrow and surrounded by few blood vessels. In the intermediate portion, which is the most active ion transporting part, the endolymphatic sac protruded and was surrounded by many branched blood vessels. In the distal portion, the endolymphatic sac was close to the sigmoid sinus. The same samples were sectioned and stained by immunohistochemistry. This whole-mount imaging technique of the endolymphatic sac will be a very useful method for endolymphatic sac research.

研究分野：耳科学

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：内リンパ嚢 内耳 イオン輸送 イオンチャネル メニエール病 イオンイメージング 内リンパ調節

## 1. 研究開始当初の背景

特定疾患のひとつであるメニエール病の病態は、内リンパ水腫であるが、健常では内リンパ水腫が生じないように内リンパ系が調節されている。この内リンパ系の調節に内リンパ嚢が重要な役割をしていることが近年の形態学的、薬理的、生理学的研究により示唆されている。特に、内リンパ嚢を閉塞した動物ではメニエール病の病態である内リンパ水腫が発生することから、内リンパ嚢は内リンパ液の吸収をしていると考えられている。さらに、難治性メニエール病の治療として、内リンパ嚢開放術(ドレナージ術)が広く行われている。しかし、実際に内リンパ嚢がどのような働きをしているか、そしてどのように調節されているか、その全貌はいまだ明らかになっていない。すでに、我々の研究室でも、内リンパ嚢機能の一要素として、ナトリウム輸送が内リンパの吸収に重要な働きをしていることを示唆する研究結果を蓄積している(Miyashita et al., 2007、Wu & Mori, 1999、Mori et al., 2000、Miyashita et al., 2001、宮下他、2003、Miyashita et al., 2012)。特に、内リンパ嚢上皮細胞の Na ポンプが、内リンパ水腫を改善させるのに十分な内リンパ液の輸送能を作り出すことを、シート状の生標本にて測定することに成功した(Miyashita et al., 2007)。さらに、Na ポンプの制御因子のひとつである FXND 6 が内リンパ嚢上皮細胞に発現し、Na ポンプと多くが共発現していることが確認できた(Miyashita et al., 2012)。この内リンパ液の輸送能を制御することができれば、内リンパ水腫を呈するメニエール病などの根本的な治療が可能であり、内リンパの輸送能を制御は大変重要な要素であるが、内リンパ嚢における内リンパの吸収を制御する因子に関して直接研究した報告は少ない。そこで、内リンパの吸収に関わるイオン輸送体、そしてその制御因子、ホルモンレセプターに着目し、

その内リンパ嚢上皮細胞における発現の有無、およびそれらの機能解明をめざす。

## 2. 研究の目的

内耳の内リンパ液を吸収する内リンパ嚢の制御機構を明らかにすることで、内リンパ水腫をコントロールし、内リンパ水腫を病態とする疾患であるメニエール病等の治療法が確立できる可能性があり、内リンパ嚢におけるイオン輸送制御機構を明らかにしていくことにより、将来的に内リンパの吸収をコントロールすることを目的とする。具体的には、内リンパの吸収は、イオンの吸収が行われ、それに伴い水が動くと考えられている。そのため、内リンパ嚢上皮細胞におけるイオン輸送をターゲットとし、内リンパ嚢におけるイオン輸送体、そしてその制御因子、ホルモンレセプターについてその発現の有無と機能を明らかにすることを目的とする。これまでに、内リンパ嚢上皮細胞において、ナトリウムイオンの輸送については、Na ポンプが内リンパ水腫を改善させるのに十分な内リンパ液の輸送能をもつことがわかっており、apical 側には上皮性 Na チャネル(ENaC)、電位依存性 K チャネル、Na-K-2Cl 共輸送体、Na-Cl 共輸送体、等の発現が確認されている。この中で、上皮性 Na チャネルは電気生理学的にその機能も解明されている。上皮性 Na チャネルによる Na<sup>+</sup>輸送で生じる電位変化を相殺し、より有効なイオン輸送をおこなう Cl<sup>-</sup>輸送体としては Cl<sup>-</sup>チャネルの存在が重要であり、Cl<sup>-</sup>チャネルが存在すれば、より効率的なイオン輸送ができると考えられるため、種々の Cl<sup>-</sup>チャネルの発現の有無を調べることを目的とした。次に、蝸牛では、胎生期に有毛細胞の分化等に重要な役割をもつホメオボックス転写因子 Prox1 の内リンパ嚢での発現の有無を調べることを目的とした。Prox1 は鳥類の蝸牛では、有毛細胞への分化能をもつ支持細胞に発現しており、前駆細胞

としての性質を持つものに特有だと考えられている。内リンパ嚢では、特に中間部ではイオン輸送を活発に行っていると考えられる Mitochondria rich cells があるが、この Mitochondria rich cells が重要だとすれば、Mitochondria rich cells 前駆細胞にあたる細胞に Prox 1 が発現している可能性があるからである。

さらに、立体的な内リンパ嚢を詳細に観察し評価するため、whole mount imaging の手法を開発することを目的として研究した。

### 3 . 研究の方法

これまで開発してきたレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法にて純粋な内リンパ嚢上皮細胞由来の mRNA が集められるため、種々の Cl チャネルの発現をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法で採取した内リンパ嚢上皮細胞由来の mRNA をもとに、RT-PCR 法をもちいて調べた。発現が確認できた cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) について、免疫染色にてタンパクの発現及び局在を調べた。SD ラットを深麻酔下にエタノールにて還流固定し、内リンパ嚢を摘出し 0.12M EDTA にて脱灰した。OTC コンパウンドに包埋し、凍結切片を作成。レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法にて内リンパ嚢上皮を採取し、mRNA を抽出し、RT-PCR にて発現を調べた。

次に、Prox1 GFP マウスを用いて、成体マウスでの内耳での Prox 1 発現を調べた。コントロール実験として、Prox 1 はリンパ管への発現が知られていることから、まず、鼓膜のリンパ管の発現を調べた。Prox1 GFP マウスを深麻酔下にテキサスレッド標識したデキストランを静脈投与し、サクリファイし、鼓膜を摘出し、4% PFA にて固定した。0.12M EDTA にて脱灰後、多光子レーザー顕微鏡下に観察した。

次に、蝸牛、内リンパ嚢での Prox1 発現を調べた。Prox1 GFP マウスを深麻酔下に 4% PFA にて還流固定し、側頭骨を摘出した。蝸牛を摘出し、whole mount 法にて蝸牛を多光子レーザー顕微鏡下に観察した。内リンパ嚢も摘出し、EDTA にて脱灰後、多光子レーザー顕微鏡下に観察した。

### 4 . 研究成果

まず、内リンパ嚢上皮細胞のクロライドチャンネル発現について調べた。内リンパ嚢内のリンパ液は、Na<sup>+</sup>と Cl<sup>-</sup>が主であるイオンであり、Na<sup>+</sup>については多くのイオン輸送体が見ついているが、Cl<sup>-</sup>については共輸送体、交換輸送体以外は見つかっておらず、apical 側に存在する上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)や非選択性陽イオンチャンネルが機能するためには Cl<sup>-</sup>を中心とした陰イオン輸送体が必要であると想像される。そこで、Cl<sup>-</sup>チャンネルについて発現の有無を RT-PCR で調べた。CFTR のみ発現が認められ、免疫染色にて内リンパ嚢中間部上皮細胞を中心に CFTR が発現していることが確認できた。これまで不明であったクロライド輸送系のひとつが CFTR である可能性が示唆された。また、多くの CFTR は ENaC と同じ細胞に共発現していた。唾液腺では、CFTR の活性化は、ENaC を介するナトリウム輸送の活性化を引き起こす相互作用があることが知られており、内リンパ嚢においても、CFTR は ENaC と相互作用をしながらイオン輸送に関与している可能性が示唆された。

内リンパ嚢は、近位部、中間部、遠位部の 3 部位に分けられ、連続した一層の上皮が内腔を覆っている。マウスの内リンパ嚢については、内耳が小さく摘出同定が難しいため、ほとんど報告がない。また、イメージングにおいて、内リンパ嚢の立体構造は大切な要素である。そこで、マウス内リンパ嚢全体を立体的に評価できる方法として、whole mount で

イメージングする方法を開発した。まず、コントロールとして、Prox1 はリンパ管に発現することが知られていることから、まず、鼓膜リンパ管のイメージングを行った。リンパ管に発現する Prox1 を GFP で標識した Prox1 GFP マウスの鼓膜を摘出し多光子レーザー顕微鏡で観察した。鼓膜輪に沿ってリンパ管網が観察され、鼓膜弛緩部には豊富にリンパ管が観察されたが、緊張部にはほとんどリンパ管は認めなかった。次に、同様に Prox1 GFP マウスの内リンパ嚢を観察した。Prox1 GFP マウスでは内リンパ嚢上皮細胞が特異的に標識されていることを発見した。側頭骨を脱灰し、レーザー顕微鏡で観察すると、内リンパ嚢全体が詳細に細胞レベルで観察可能であり、内リンパ嚢の立体イメージングを行った。更に、切片を作成し、内リンパ嚢の上皮細胞に普遍的に存在していることを確認した。

内リンパ嚢は、近位部、中間部、遠位部の3部位に分けられるが、いずれの部位でも Prox1 の発現が確認できた。内リンパ嚢中間部は mitochondria-rich cells と、ミトコンドリアが少ない ribosome-rich cells の2種類の細胞から構成されるが、mitochondria-rich cells では Prox1 はほとんど発現していなかった。内耳(蝸牛)、神経系における Prox1 の機能は、前駆細胞から機能を持った細胞への分化誘導を促していると報告されている。内リンパ嚢においても、Prox1 がイオン輸送障害時等に機能性細胞への分化誘導に関係している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Localization and proliferation of lymphatic vessels in the tympanic membrane in normal state and regeneration. Miyashita T, Burford JL,

Hong YK, Gevorgyan H, Lam L, Mori N, Peti-Peterdi J. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、2013、440:371-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.054.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the endolymphatic sac of the rat. Matsubara A, Miyashita T, Inamoto R, Hoshikawa H, Mori N. *Auris Nasus Larynx*. 査読有、2014 doi: 10.1016/j.anl.2014.02.005.

Presence of adrenergic receptors in rat endolymphatic sac epithelial cells. Matsubara A, Miyashita T, Inamoto R, Mori N. *J Membr Biol*. 査読有、246、109-114、2013、doi: 10.1007/s00232-012-9508-5.

〔学会発表〕(計11件)

宮下武憲、森望、内リンパ嚢における Pannexin1 の発現、第23回日本耳科学会、2013年11月26日、宮崎市  
稲本隆平、宮下武憲、森望、イソプロテレノールによる内リンパ圧に対する影響、第23回日本耳科学会、2013年11月26日、宮崎市

宮下武憲、James Burford, Young-Kwon, Hong, Janos Peti-Peterdi, 森望、マウス内リンパ嚢上皮細胞における Prox1 の発現、第31回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、2013年8月24日、大阪市

松原あい、宮下武憲、稲本隆平、星川広史、森望、ラット内リンパ嚢における cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) の発現、第31回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、2013年8月24日、大阪市  
宮下武憲、森望、マウス内リンパ嚢における Prox1 の発現、第114回日本耳鼻咽

喉科学会、2013年5月18日、札幌市  
稲本隆平、宮下武憲、森 望、イソプロ  
ロテレノールによる内リンパ圧に対する  
影響、第114回日本耳鼻咽喉科学会、2013  
年5月18日、札幌市

宮下武憲、森望、マウス鼓膜におけるリ  
ンパ管 - 正常鼓膜での局在と鼓膜再生時  
の反応 - 、日本耳鼻咽喉科学会第38回四  
国四県地方部会連合学会、2012年12月  
2日、高知市

マウス鼓膜におけるリンパ系 - 鼓膜再生  
時の反応 - 、宮下武憲、森望、第22回  
日本耳科学会、2012年10月6日、名  
古屋市

鼓膜のリンパ管局在、鼓膜再生時の反応  
宮下武憲、James Burford, Young-Kwon  
Hong、森 望、Janos Peti-Peterdi、  
第30回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス  
研究会、2012年8月25日、大阪市

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、松原あい、宮下武憲、  
稲本隆平、森望、第30回耳鼻咽喉科ニュー  
ロサイエンス研究会、2012年8月25  
日、大阪市

イソプロテレノールの内耳への影響、稲  
本隆平、宮下武憲、森望、第30回耳鼻咽  
喉科ニューロサイエンス研究会、2012年  
8月25日、大阪市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~jibika/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮下 武憲 (MIYASHITA Takenori)

香川大学・医学部耳鼻咽喉科・講師

研究者番号：60363214