

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861376

研究課題名(和文)前庭神経系における浸透圧受容体TRPV4の機能解析

研究課題名(英文)Functional expression of osmosensitive cation channel, transient receptor potential vanilloid 4, in the vestibular system

研究代表者

大園 芳之(Ozono, Yoshiyuki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10724768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：非選択的陽イオンチャネルであるTRPV (transient receptor potential vanilloid) 4受容体は侵害刺激受容体のTRPVファミリーの一つで、体性感覚系の神経節(後根神経節、三叉神経節)、腎、肺、視床下部、蝸牛等に発現し、細胞外液の低浸透圧化によっても活性化することが知られている。内耳においてTRPV4受容体の発現は蝸牛や内リンパ嚢で既に報告があり、今回我々はTRPV4受容体について、組織学的な発現だけでなくカルシウムイメージング法を用いて機能的な発現も確認した。このTRPV4受容体は前庭機能、機能異常に関与している可能性が想定された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of transient receptor potential vanilloid (TRPV) 4, a non-selective cation channel, in rat vestibular ganglia (VG) neurons. TRPV4 RT-PCR product was amplified from the mRNA of VG neurons. In situ hybridization confirmed that the neurons expressed TRPV4 mRNA. Immunoreactivity for TRPV4 was localized in VG neurons. In Ca²⁺ imaging experiments in primary cultures of rat VG neurons, 4-PDD caused an increase in intracellular calcium ion concentration ([Ca²⁺]_i); this increase was almost completely inhibited by ruthenium red, a selective antagonist of TRPV channels. Similarly, hypotonic stimulation induced a significant increase in [Ca²⁺]_i that was blocked by ruthenium red. Our histological and physiological studies reveal that TRPV4 is functionally expressed in VG neurons as an ion channel. TRPV4 in VG neurons might participate in vestibular neurotransmission as an osmoreceptor and/or mechanoreceptor.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：TRPV4受容体 前庭機能 低浸透圧刺激

1. 研究開始当初の背景

末梢性眩暈症の急性期には点滴等の薬物治療が行われることが多いが、特に使われる頻度の多い薬剤の一つが7%炭酸水素ナトリウム(メイロン®)である。弱塩基性緩衝剤であるメイロン®は局所のアシドーシス改善や血流改善の目的で用いられるが、その明確な作用機序は未だ不明である。メイロン®は高張液でもあることから、眩暈発作時には前庭神経系が低張状態にさらされている可能性も考えられ、メイロン®は低張状態を是正するために作用している可能性がある。一方、侵害刺激受容体の TRPV4 受容体は非選択的陽イオンチャネルである transient receptor potential subfamily V(TRPV)の一つで、一般体性感覚系や腎、肺、視床下部、蝸牛などに存在し、細胞外液の低浸透圧化や 30 度以上の熱、機械刺激、4αPDD のようなフォルボールエステルで活性化する。発現する組織や刺激応答の多様性から TRPV4 は様々な生理的役割を持つものと予想されている。内耳においては TRPV4 受容体の発現は蝸牛や内リンパ嚢ですでに報告がある。TRPV4 ノックアウトマウスでは遅発性聴力障害がみられるため、TRPV4 受容体は聴力維持に不可欠と考えられる。我々は予備実験で前庭神経節において、低浸透圧刺激に反応する陽イオンチャネルの存在の可能性を見出した。またこの低浸透圧刺激に対する反応は TRPV チャンネルのアンタゴニストであるルテニウムレッドにより抑制されたことから、この陽イオンチャネルが TRPV4 チャンネルであることを示唆している。一方、同じく前庭神経節には TRPV4 選択的アゴニストとされる 4αPDD に反応し、ルテニウムレッドにより抑制される陽イオンチャネルの存在も確認した。これらのデータから TRPV4 が前庭神経系に発現している可能性は極めて高い。発現部位や刺激応答の多様性を持ち、様々な生理的役割が予想される TRPV4 受容体が内リンパ嚢に発現があり、かつ前庭神経節にも発現が認められるとなると、前庭機能ないし前庭機能異常に関与している可能性は極めて高いのではないかと考え着想に至った。

2. 研究の目的

前庭神経系での TRPV4 受容体の発現を組織学的かつ生理学的に確認し、TRPV4 受容体をターゲットにした新しい眩暈治療の可能性を検討することである。

3. 研究の方法

動物は Wistar ラット 8 週齢オス(180~200g)を用いた。動物実験は大阪大学大学院医学系研究科の動物実験規定に則って行った(動物実験承認番号 21-086-0)。

RT-PCR

ラット前庭神経節ないし腎を素早く摘出して homogenize し、Nucleo Spin XS®

(Macherey-Nagel)、説明書に従って total RNA を抽出した。さらに逆転写を行い、cDNA を得た。以下に示すプライマーをカスタムし、PCR を行った。ポジティブコントロールには β actin、ネガティブコントロールには逆転写を行わない RNA を用いた。

プライマー (TRPV4: 258bp, βactin: 298bp)

TRPV4 forward:

5'-CTATCTGTGTGCCATGGTCATC-3'

TRPV4 reverse:

5'-AGACACAACCACCAGCACTGAG-3'

βactin forward:

5'-GATCCTGACCGAGCGTGGCTACA-3'

βactin reverse:

5'-AGCGATGTCAACGTCACACTTCA-3'

in situ hybridization 法

腎より抽出した total RNA より逆転写にて cDNA を得て、975bp を鋳型にして Digoxigenin でラベルした cRNA プロブを作成した。次にラット前庭神経節新鮮凍結切片を作成し、固定処理などの後に先述の cRNA プロブで hybridization を 24~48 時間行い、一次抗体に anti-Digoxigenin-POD (Roche)、さらに TSA Plus DNP AP System (Perkin Elmer)を用い、anti-DNP-Alexa Fluor 488 (Invitrogen)でシグナルを検出した。

免疫組織化学法

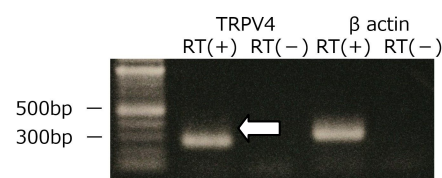
一次抗体に Anti-TRPV4 antibody (Rabbit polyclonal, ab39260, Abcam)、二次抗体にビオチン化二次抗体 (goat anti-rabbit; Vector Laboratories)を用い、VectastainABC reagent (Vector Laboratories)、ジアミノベンジジンで発色した。

カルシウムイメージング法

ラット前庭神経節を摘出して一晩培養ののち、予めカルシウムインジケータ fura-2 (Invitrogen)をロード、Nikon ECLIPSE TE2000-U microscope equipped with the AQUACOSMOS system (Hamamatsu Photonics)を用いて TRPV4 アゴニストの 4α-PDD、低浸透圧緩衝液(220Osm)、TRPV blocker のルテニウムレッドを投与しながら吸光度のレシオ(380/340)の経時的变化を計測した。

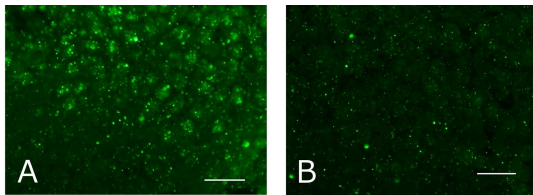
4. 研究成果

RT-PCR 法



上図のように3. で述べたプライマーにより、TRPV4mRNA の発現を認めた(矢印)。

in situ hybridization 法



上図A：アンチセンスプローブでは弱いシグナルを認めた。

上図B：センスプローブを用いたネガティブコントロールでは殆どシグナルを認めなかった。

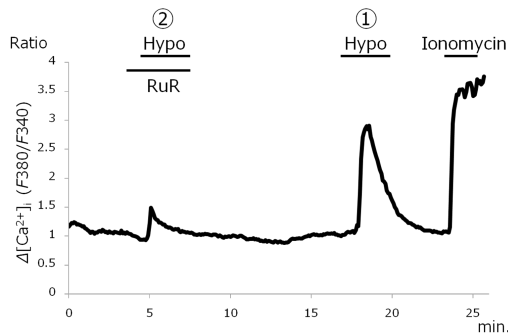
bar:50µm

免疫組織化学法

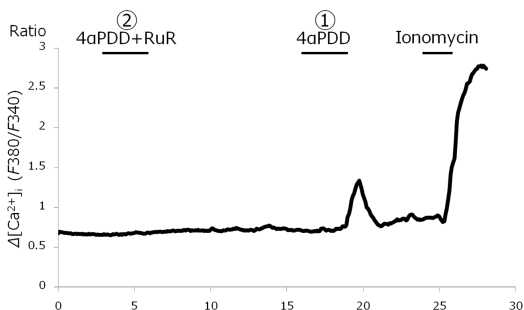


特に矢印の細胞では細胞膜付近に特に強いシグナルを認めた(bar:25µm)。

カルシウムイメージング法

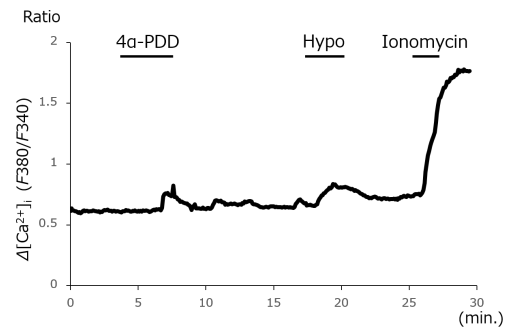


図A：低浸透圧刺激(Hypo)に反応を見せ、細胞内カルシウム濃度の上昇が見られたと同時に、ルテニウムレッド(RuR)により低浸透圧刺激による反応は明らかに減弱した。



図B：4α-PDD に反応を見せ、細胞内カル

シウム濃度の上昇が見られたと同時に、ルテニウムレッド(RuR)にて4α-PDDによる反応はほぼ抑制された。



図C：4αPDD に反応し、かつ低浸透圧刺激にも反応する細胞も見られた。4αPDD に反応するイオンチャンネル、低浸透圧刺激に反応するイオンチャンネルはそれぞれ TRPV4 受容体以外にも想定されうるが、同一細胞で両方の刺激に反応することから、この細胞に TRPV4 受容体が発現している可能性は極めて高いと考えられる。

以上のことから、TRPV4 受容体が前庭神経節に機能的に発現している可能性が高いことが確認され、TRPV4 受容体が前庭機能ないし前庭機能異常に関与している可能性が示唆された。

さらに塩化カリウムを鼓室内投与するとメニエール病に似た眼振経過を示すことから、眼振モデルを模索中で(論文投稿準備中)、これを用いて TRPV4 受容体の変化について検討を重ねているところである。

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0件)

2016年4月20日現在、論文投稿中。

〔学会発表〕(計1件)

鎌倉 武史、北原 紘、滝本 泰光、大園 芳之、堀井 新、今井 貴夫、奥村 朋子、猪原 秀典。ラット前庭神経節における TRPV4 受容体の機能的発現。第73回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会。2014年11月、横浜。

6. 研究組織

(1)研究代表者

大園芳之 (Yoshiyuki Ozono)

所属機関：大阪大学

部局：医学部附属病院

職名：医員

研究者番号：10724768

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

鎌倉武史 (Takefumi Kamakura)

所属機関：大阪大学大学院医学系研究科

部局：神経細胞生物学

職名：特任研究員

研究者番号： 30600564