

[参考文献]

- 1) Takeda T, Kakigi A, Saito H. Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1995;519:219-22.
- 2) Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada T, Kakigi A. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res.* 2000 Feb;140(1-2):1-6.
- 3) Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Kakigi A, Azuma H. Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. *Neuroreport.* 2002 Jul 2;13(9):1127-9
- 4) Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl).* 1995 Feb;191(2):101-18.
- 5) 西岡利恵, 西村将彦, 岡田暉彦, 柿木章伸, 竹田泰三. ラット内耳血管条における水チャネルの発現と局在. 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業. 前庭機能に関する調査研究. 平成 19 年度報告書 (印刷中).
- 6) Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Okada T, Ando M, Suzuki M, Kakigi A. Aquaporin-1 (AQP1) is expressed in the stria vascularis of rat cochlea. *Hear Res.* 2003 Jul;181(1-2):15-9.
- 7) Crouch JJ, Sakaguchi N, Lytle C, Schulte BA. Immunohistochemical localization of the Na-K-Cl co-transporter (NKCC1) in the gerbil inner ear. *J Histochem Cytochem.* 1997 Jun;45(6):773-8.
- 8) Hamann S, Herrera-Perez JJ, Bundgaard M, Alvarez-Leefmans FJ, Zeuthen T. Water permeability of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters in mammalian epithelial cells. *J Physiol.* 2005 Oct 1;568(Pt 1):123-35.
- 9) MacAulay N, Hamann S, Zeuthen T. Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience.* 2004;129(4):1031-44.

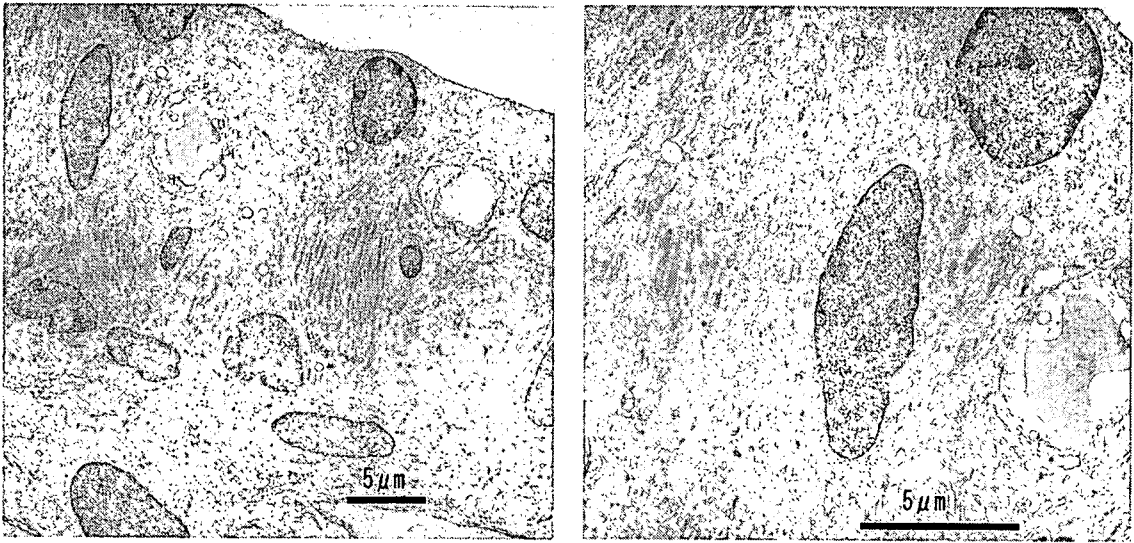


图1 VP 投与 10 分後

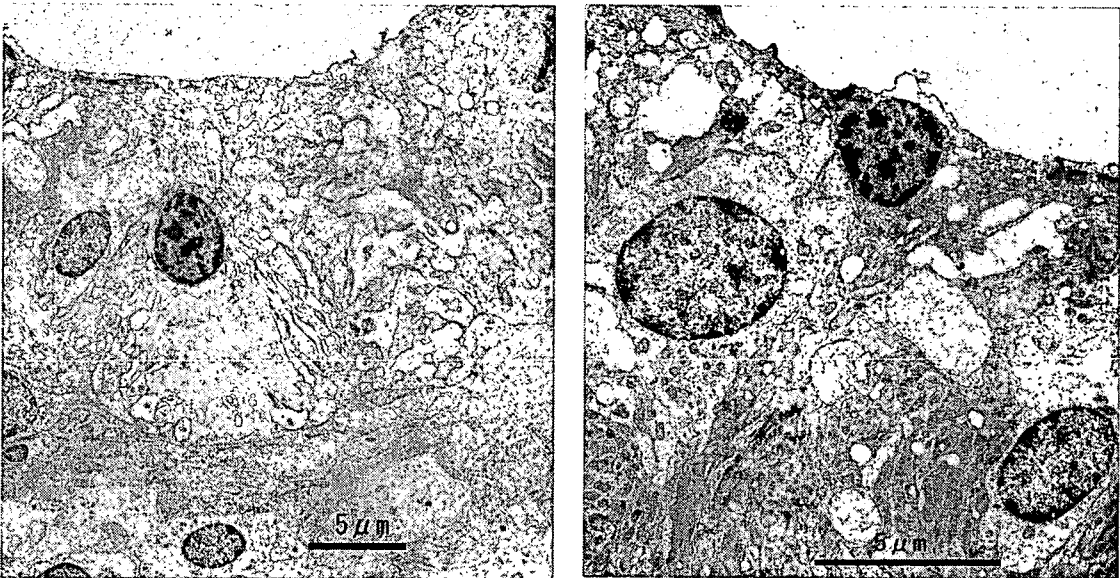


图2 VP 投与 20 分後

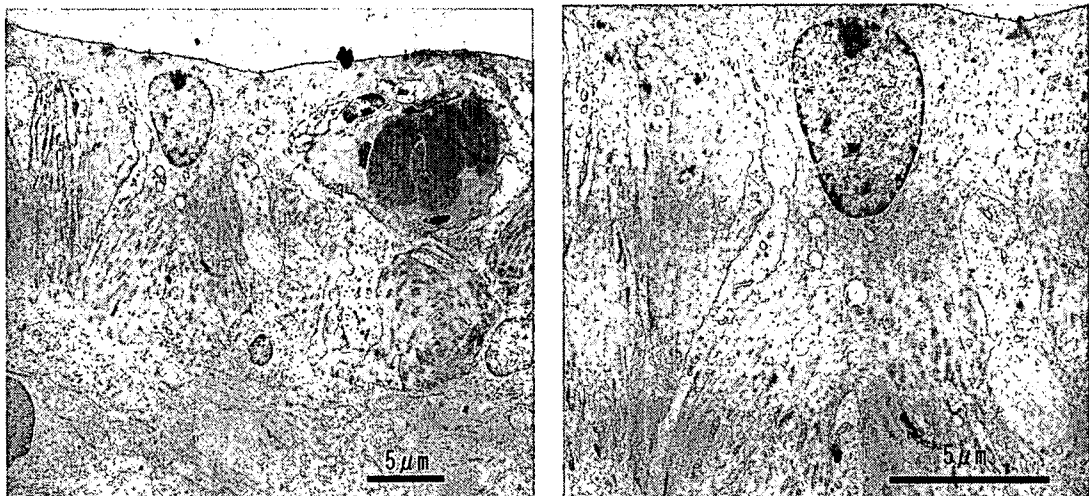


图3 VP 投与 30 分後

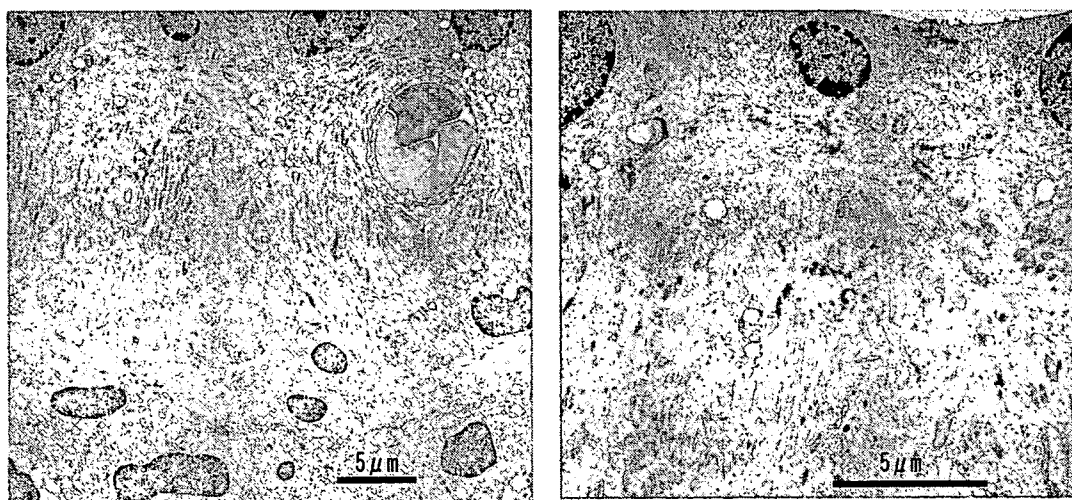


图4 VP 投与 40 分後

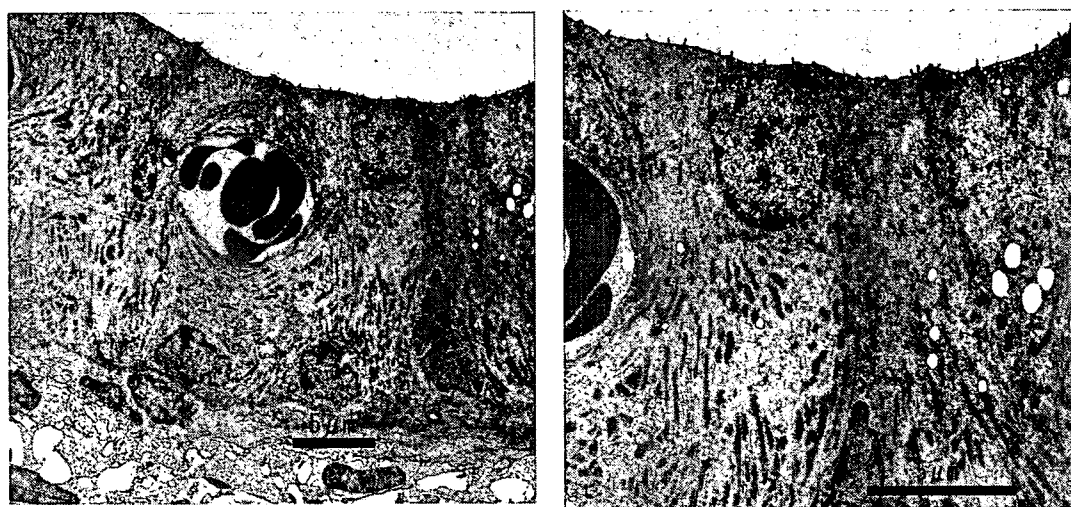


图5 VP 投与 50 分後

6. 生後ラット内耳発達過程における CTP 発現の検討

新藤 晋, 池園哲郎, 関根久遠, 李 麗淑, 八木聰明 (日本医大)

[はじめに]

われわれは, 常染色体優性, 非症候性遺伝性難聴のひとつ DFNA9 の病因蛋白である cochlin¹⁾ に着目し, 今までに①cochlin が内耳の非コラーゲン性蛋白の 70%を占める, 内耳に豊富に発現している蛋白であること, ²⁾ ②分子量の異なる 4 つのアイソフォーム (p63, p44, p40, CTP (cochlin-tomoprotein)) を持つこと²⁾, ③CTP が内耳特異的蛋白であり, 外リンパ瘻の生化学的診断マーカーとして臨床応用可能であること^{3) 4)} ④生後ラットを用いた検討で, cochlin は内耳の発達とともに発現が増加することなどを報告してきた. しかし④は内耳組織のみの検討であり, 外リンパに存在するもう一つのアイソフォームである CTP の発現パターンは不明である. 今回われわれは生後ラット内耳発達過程の外リンパにおける CTP の発現についてウェスタンブロットの手法を用いて検討を行ったので, いままでの研究結果と併せて報告する.

[対象と方法]

使用動物; ウィスターラット

使用抗体; LCCL 抗体 (図 1)

実験方法; ウェスタンブロット法

生後 12 日目 (n=4), 生後 19 日目 (n=4), 生後 28 日目 (n=2), 生後 35 日目 (n=2), 生後 70 日目 (n=4) のラットを深麻酔ののち断頭後, すみやかに外リンパを採取した.

採取した外リンパを用い, 下記の条件でウェスタンブロットを行なった.

【Load 量】	5 μ /lane
【ゲル】	PAGEL 15% SDS-PAGE GEL (ATTO 社製)
【一次抗体】	LCCL3 抗体 ; 1,000 倍希釈 反応時間 2 時間
【二次抗体】	anti Rabbit immunoglobulins/HRP (DAKO 社製) 1,000 倍希釈 反応時間 1 時間
【 blocking buffer 】	5% skim milk, 0.2% Tween20/PBS pH7.5
【 dilution buffer 】	1% skim milk, 0.1% Tween20/PBS pH7.5
【発光試薬】	ECL Advance

[結果] (図 2)

LCCL 抗体を用いた今回の検討では, Cochlin の 4 つのアイソフォームの内, p63s と CTP の発現が認められた. 次に生後発達過程におけるアイソフォームの発現パターンについてみると, p63s は生後 12 日目に強く発現を認めたがその後徐々に減少した. 一方, CTP は生後 12 日目には認められなかったが, その後発現が増加した.

[考察]

Cochlin のアイソフォームには p63s, p44s, p40s, CTP の 4 つがあることが知られている. 以前我々は, 主に内耳組織に発現する p63s, p44s, p40s について生後発達過程のラットを用い

て、免疫染色、および、ウェスタンブロットの手法を用いた検討を行なった（2006年度の本報告会）。その後、もう一つのアイソフォームである CTP を認識する新抗体（LCCL 抗体）を作成した。その抗体を用いて研究を進めたところ、CTP は外リンパのみに存在し、他の体液（血液、髄液、中耳粘液 etc...）には存在しないことが明らかとなった³⁾。この結果は CTP が外リンパ瘻の生化学的診断マーカーとして有用であることを示す貴重なデータである。今回はさらに生後発達過程における CTP の発現パターンを解析する目的で研究を行った。

今回の結果、CTP は内耳が未熟なラットの生後 12 日目には発現していないこと、成熟が急速に進んでくる生後 19 日目以降に発現を認めることが明らかになった。この結果から CTP は内耳の成熟に必要な蛋白である可能性が示唆された。モチーフ解析の点から見ると、CTP の大部分をしめる LCCLmodule⁵⁾ は免疫系の関与が言われており、以上の結果から合わせて考えると、内耳免疫の成熟に CTP が関わっている可能性がある。

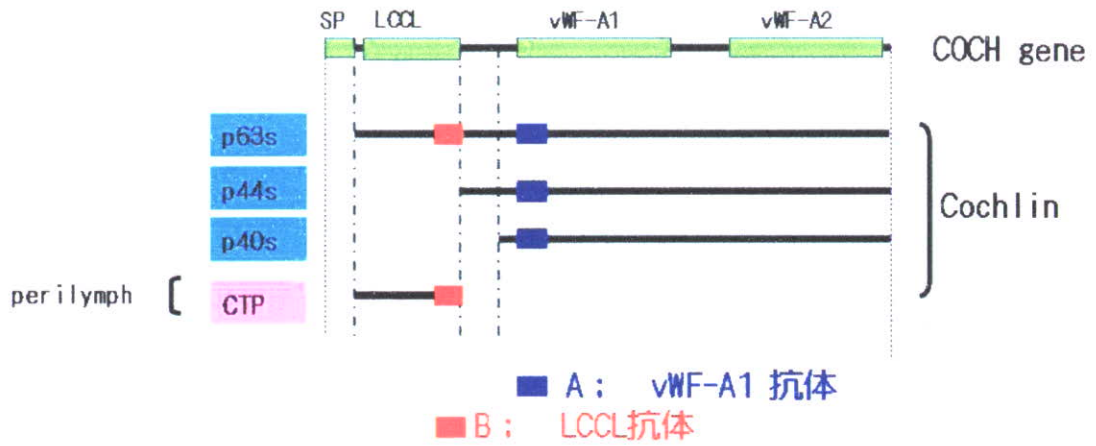
[結論]

ラット生後発達過程における CTP 発現の検討を行なった。

ラット生後発達過程において、CTP は生後 12 日目には発現せず、19 日目以降に発現を認めた。一方、p63s は生後 12 日目に強い発現を認め、以後徐々に減少した。

[参考文献]

- 1) Robertson N G, Hamaker S A, et al. Subcellular localization, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *J Med Genet* 2003; 40:479-486.
- 2) Ikezono T, Omori A, et al. Identification of the protein product of the COCH gene-hereditary deafness gene- as the major component of inner ear protein, *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535: 258-265.
- 3) Ikezono T, Shindo S, et al. Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 6; 314: 440-446.
- 4) Li L, Ikezono T, et al. Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx* 2005; 32: 219-223.
- 5) Trexler M, Banyai L, et al. The LCCL module, *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 5751-5757.



A (vWF-A1 抗体) : p63s, p44s, p40sを認識

B (LCCL抗体) : p63sとCTPを認識

図 1

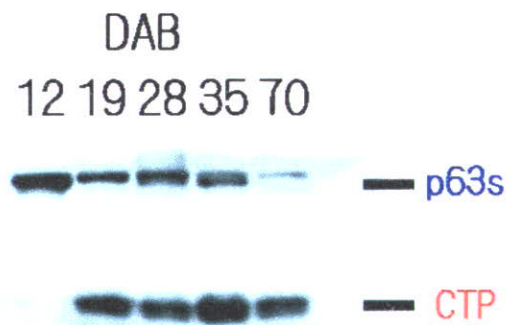


図 2

7. COCH 遺伝子発現の転写調節について

関根久遠, 池園哲郎, 新藤 晋, 李 麗淑, 八木聰明 (日本医大)

[はじめに]

Cochlin^{1) 2) 3) 4)} は非症候性遺伝性難聴のひとつ, DFNA9 の病因蛋白である. DFNA9 は臨床で, 30~40 代から発症する感音難聴で, 徐々に進行し高度感音難聴になる. 前庭障害は蝸牛同様, 緩徐に進行するため, めまいの特徴は回転性, 浮動性めまいを呈する. またメニエール病に類似した症候を呈するケースもある, 非常にユニークな疾患である. 我々は Cochlin に着目して研究を行ない, ①4 つの分子量の異なるアイソフォームを持つこと. ②Cochlin が内耳にほぼ特異的に発現していること.⁵⁾③Cochlin のアイソフォームのひとつ, CTP (Cochlin-tomo-protein) が外リンパ瘻の生化学的診断法として臨床応用可能であることを報告してきている.⁶⁾ Cochlin は内耳蛋白の約 70% を占めるといふ, 内耳に非常に豊富に存在する蛋白であるが, 機能についてはまだほとんどわかっていない. そこで我々は Cochlin のアイソフォーム形成のメカニズムを解明することが Cochlin の機能を解析する一助となると考え, 比較的解析の容易な mRNA レベルでのバリエーション形成について検討した.

[対象と方法]

1. Total-RNA 抽出及び RACE

8W の雌の Wistar 系ラット 10 匹より内耳組織を摘出し, 直後に Ambion 社の RNA later® を用いて安定化し, -80°C で冷凍保存していたサンプルを用いた. Qiagen 社の RNeasy® Mini Kit のプロトコールに従って total-RNA を抽出した. 抽出した total-RNA サンプルを用いて Invitrogen 社の Gene Racer™ kit を用いてプロトコール通り First strand の Full-Length の cDNA を作成した. この Kit では, Oligo cap を特異的に開裂する Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) を用いて完全長の cDNA を作成することができる. この Full-Length の cDNA を用いて, 5' RACE, 3' RACE を行なった. GeneRacer5' Primer(キット付属)及び, gene bank に登録されている Human や Mouse と 90% の Homology をもつラットの既知配列(XM_343058.3)から作成したプライマーを用いて 5' RACE を行ない, また, GeneRacer3' Primer(キット付属)及び, 同様に既知配列から作成したプライマーを用いて 3' RACE を行なった. さらに非特異的増幅を抑えるためにキット付属のプライマーと既知配列から一回目の PCR より内側の配列を用いて nested PCR を行なった.

2. Cloning 及び Sequencing

RACE の産物を電気泳動し, 検出されたバンドを切り出し, Gene Racer kit のプロトコール通り Zero Blunt TOPOR PCR Cloning Kit for Sequencing を用いてクローニングを行なった. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシーケンズ反応を行ない, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて, Sequencing を行なった.

[結果]

1. RACE

5'RACE では一本のバンド, 3'RACE では長さの異なる 3 本のバンドを認めた.

2. Sequencing

5'RACE 産物の配列を解析した結果、転写開始部位は Human や Mouse の Signal 配列の約 50base 上流、3'RACE では転写開始点から約 700base、約 2000base、約 2440base 下流の 3 種であった。2000base と 2440base のものは Cochlin 全長をコードし、3'UTR の長さが異なるのみであったが、約 700base の配列については、Human や Mouse の 8 番目のエクソンまでの配列はほぼ同一であったが、以降は全長 Cochlin ではイントロンとなっているゲノム配列が続き、40base ほど下流に PolyA が付加されていた。

[考察]

COCH 遺伝子から転写された mRNA は全長 cochlin を含み、3'UTR の異なる 2 種と、700base と短く全長 cochlin と 3'末端の異なる 1 種類があることが分かった。また、その配列の解析の結果から短い mRNA は、COCH 遺伝子のスプライシングバリエントであることが分かった。

これらの mRNA から翻訳された蛋白質は前 2 種は同一であるが、短い配列については全長の Cochlin が切断された場合とは C 末端が一部異なるり、この mRNA から産生される蛋白は全長の Cochlin が蛋白レベルで切断されたものとは異なる蛋白である。現時点ではこの mRNA は内耳組織でしか検出されておらず、CTP が外リンパ特異的に存在するメカニズムの解明の大きな手がかりになると考えられる。内耳組織中の CTP の C 末端を解析することで、この蛋白の由来を検討することも可能と考えられ、今後蛋白レベルでの検討を行なう。

[結論]

1. ラット COCH 遺伝子由来の mRNA は転写開始部位は 1 箇所であるが、3'末端は 3 種類あることが分かった。
2. 3 種類の 3'末端のうち 2 種はエクソン 1 から 12 までを含み、全長 Cochlin をコードし 3'UTR が異なるのみであったが、もう 1 種はエクソン 1 から 8 で構成される短いスプライシングバリエントであることが分かった。

[参考文献]

- 1) Ikezono T, Shindo S, et al. Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. *ORL* 2005; 67: 252-258.
- 2) Robertson N G, Hamaker S A, et al. Subcellular localization, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *J Med Genet* 2003; 40:479-486.
- 3) Trexler M, Banyai L, et al. The LCCL module, *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 5751-5757.
- 4) Ikezono T, Omori A, et al. Identification of the protein product of the COCH gene-hereditary deafness gene- as the major component of inner ear protein, *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535: 258-265.
- 5) Li L, Ikezono T, et al. Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx* 2005; 32: 219-223.
- 6) Ikezono T, Shindo S, et al. Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 6; 314: 440-446.
- 7) 福島 邦博ら. 発達過程のマウス内耳における Dfna5 遺伝子発現の量的変化. 厚生省特定疾患 急性高度難聴調査研究班平成 12 年研究業績報告書:13-14

8. 内耳血流の変化による内リンパ嚢の変化

工田昌也, 赤木奈々, 平川勝洋 (広島大)

[はじめに]

近年, 内リンパ嚢には内リンパ環境の恒常性を能動的に調節する機能があることが明らかになってきた. この機能には内リンパ嚢の容積の変化や内リンパ嚢上皮の分泌機能, 内リンパ腔に認められるいわゆる stainable substance (SS)の出現が重要な役割を果たしている. SS は cochleo-saccular degeneration, 迷路破壊後, グリセロール投与後など内リンパの量や圧が減少, あるいはイオン環境が崩れた時に認められ, 内リンパの恒常性の維持に重要な役割を果たしている¹⁻⁵⁾.

一方, 内耳血流は正常状態では恒常性が維持されているが, その変化は神経性難聴を引き起こす原因のひとつとして考えられている. 内リンパ圧の上昇は内耳血流を低下させ, 一定以上の内リンパ圧の上昇は蝸牛内電位を低下させるが, 正常動物では徐々に回復する. しかし, メニエール病に代表される内リンパ水腫の様な状態ではこの内耳血流の調節作用が障害されており, 内リンパ水腫耳では蝸牛血流の低下は正常耳より大きいことなどが報告されている⁶⁻⁸⁾. このことは内リンパ嚢の機能と内耳血流の恒常性を維持する機能との間には密接な関係があることを示唆している. しかし, 実際に内耳血流の変化が内リンパ嚢にどのような変化を与えるかについては殆ど知られていない. そこで今回, 我々は内耳血流を増加あるいは減少させることにより生じる内リンパ嚢の反応について検討した.

[研究方法]

実験にはプライエル反射正常, 8週齢の CBA/J マウスを使用した. 動物は2群に分け, 1群は左耳に 1:10,000 エピネフリン, 2群は 3% ソジウムニトロプルシド (SNP) を経鼓膜的に鼓室内投与した. 動物は薬剤の投与終了後, 0, 30分, 1, 2, 4, 24時間後に深麻酔下に断頭, 側頭骨を摘出, 4%パラホルムアルデヒドにて固定後, EDTA で脱灰, エタノール系列にて脱水後, 水溶性レジン (JB-4[®]) にて包埋した. その後, 通常の方法で切片を作製し, 光学顕微鏡にて形態学的観察を行なった.

[結果]

蝸牛の変化

エピネフリン投与耳では血管条の細胞間隙の拡張や空胞形成が認められた. これらの変化は投与 30分後から認められ始め, 2時間後に最大となり, 24時間後には正常に回復した. 一方, SNP 投与耳では血管条の変化は認められなかった. これらの血管条の変化に際して内リンパ水腫やライスネル膜の虚脱などの変化はどちらの群においても認められなかった.

内リンパ嚢の変化

エピネフリン投与群では内リンパ腔は狭小化し, 内リンパ嚢上皮細胞間の細胞側間隙 (LIS) は拡張していた. 内リンパ腔内には SS の出現が認められた. これらの内リンパ腔の狭小化や SS の出現はエピネフリン投与 30分後から認められ, 2時間後に最大となり, 4時間後には逆に内リンパ腔は拡大し, 24時間後には正常に回復した.

SNP 投与群では内リンパ腔は拡大し、LIS は狭小化した。これらの変化は SNP 投与 30 分後から認められ、1 時間後に最大となり、24 時間後には正常に回復した。(図 1,2)

[考察]

エピネフリンの鼓室内投与は最大 60%程度の上昇を速やかな内耳血流の低下を引き起こし⁹⁾、一方、SNP は速やかに内耳血流を約 200%に増加させることが報告されている¹⁰⁾ことから、今回の検討では内耳血流の減少の目的にはエピネフリンの鼓室内投与を用い、増加には SNP を使用した。

今回の検討で、エピネフリン投与、即ち内耳血流の低下、により血管条での細胞間隙の拡大や空胞変性が生じることが明らかとなった。同様の所見は一過性の蝸牛虚血でも認められており、その理由として一過性の蝸牛虚血が血管条の機能障害を引き起こし、水分貯留を起こすことが考えられている¹¹⁾。同様の所見はグリセロール全身投与時にも認められており¹²⁾、今回の所見と併せると内耳血流の低下は内リンパ液の産生の減少を起こすと考えられた。このような血管条の異常にもかかわらず、内リンパ水腫やライスネル膜の虚脱などが認められなかったことは、内耳血流の変化に伴う内リンパ環境の変化を代償する何らかの機構が働いていると考えられた。

一方、内リンパ囊では今回の検討で、エピネフリンと SNP の投与により全く逆の変化が認められた。すなわち、エピネフリン投与は内リンパ囊の狭小化、LIS の拡大、SS の出現を引き起こし、SNP 投与では内リンパ腔の拡大と LIS の狭小化が認められた。これらの変化は対側耳では認められなかったことより、内耳血流の変化そのものが内リンパ囊の反応を惹起したと思われた。このエピネフリン投与による内リンパ囊の変化はグリセロール投与後、すなわち内リンパ圧や量が減少した状態と類似しており^{4,5)}、SNP 投与による変化は急性内リンパ水腫(内リンパ量の増加)による変化と類似していた^{13,14)}。以上のことから、内耳血流低下に際しては、内リンパ圧や量の相対的低下が生じ、それを代償するために内リンパ囊の狭小化、SS の出現が起こり、内耳血流増加の際には内リンパ圧や量が相対的に増加し、それを代償するために内リンパ腔が拡大するものと考えられた。即ち、内リンパ囊は内耳血流の変化による内リンパ環境の変化を能動的に詳説していると思われた。実際、内リンパ水腫のある状態では内耳血流の調節作用が障害されていることは良く知られており、内リンパ水腫動物では血圧低下による内耳血流の低下は内リンパ水腫耳で大きく、AICA 閉塞による内耳血流の低下に対する調節能は内リンパ水腫耳で低下することが報告されている⁶⁻⁸⁾。これらの内リンパ水腫は内リンパ能を手術的に閉塞することにより作製されていることから、内リンパ囊の機能異常により内耳血流の調節機能の異常が生じることが明らかとなった。

[参考文献]

- 1) Takumida M. Dynamic properties of the endolymphatic sac. A morphological and histochemical analysis of secretory and absorptive mechanisms. Thesis, Stockholm 1989.
- 2) Friberg U, Wackym PA, Bagger-Sjöbäck D, Rask-Andersen H. Effect of labyrinthectomy on the endolymphatic sac. A histological, ultrastructural and computer-aided morphometric investigation in the mouse. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1986;101:172-82.
- 3) Erwall C. Experiments on endolymphatic sac function. An ultrastructural, electrophysiological and autoradiographic study. Thesis, Uppsala 1988.
- 4) Takumida M, Bagger-Sjöbäck D, Rask-Andersen H. The endolymphatic sac and inner ear homeostasis. I: Effect of glycerol on the endolymphatic sac with or without colchicin pretreatment. *Hear Res* 1989; 40: 1-16.

- 5) Jansson B, Friberg U, Rask-Andersen H. Effects of glycerol on the endolymphatic sac. A time sequence study. *ORL* 1992; 54:201-10.
- 6) Nakashima T, Naganawa S, Sone M, Tominaga M, Hayashi H, Yamamoto H, Liu X, Nuttall AL. Disorders of cochlear blood flow. *Brain Res Review* 2003; 43: 17-28.
- 7) Yamamoto K, Kubo T, Matsunaga T. Autoregulation of inner ear blood flow in normal and hydropic guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1991; 111: 312-8.
- 8) Brechtelsbauer PB, Ren TY, Miller JM, Nuttall AL. Autoregulation of cochlear blood flow in the hydropic guinea pig. *Hear Res* 1995; 89: 130-6.
- 9) Miller JM, Ren TY, Nuttall AL. Studies of inner ear blood flow in animals and human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112: 101-13.
- 10) Ohlsén KA, Didier A, Baldwin D, Miller JM, Nuttall AL, Hultcrantz E. Cochlear blood flow in response to dilating agents. *Hear Res* 1992; 58: 19-25.
- 11) Morizane I, Hakuba N, Shimizu Y, Shinomori Y, Fujita K, Yoshida T, Shudou M, Gyo K. Transient cochlear ischemia and its effects on the stria vascularis. *NeuroReport* 2005; 16: 799-802.
- 12) Takumida M, Bagger-Sjöbäck D, Rask-Andersen H. The endolymphatic sac and inner ear homeostasis. II: Effect of glycerol on the sensory end organs with or without colchicin pretreatment. *Hear Res* 1989; 40: 17-28.
- 13) Rask-Andersen H, DeMott JE, Bagger-Sjöbäck D, Salt AN. Morphological changes of the endolymphatic sac induced by microinjection of artificial endolymph into the cochlea. *Hear Res* 1999; 138: 81-90.
- 14) Akagi N, Takumida M, Anniko M: Effect of acute endolymphatic hydrops overload on the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol* 2008; in press.

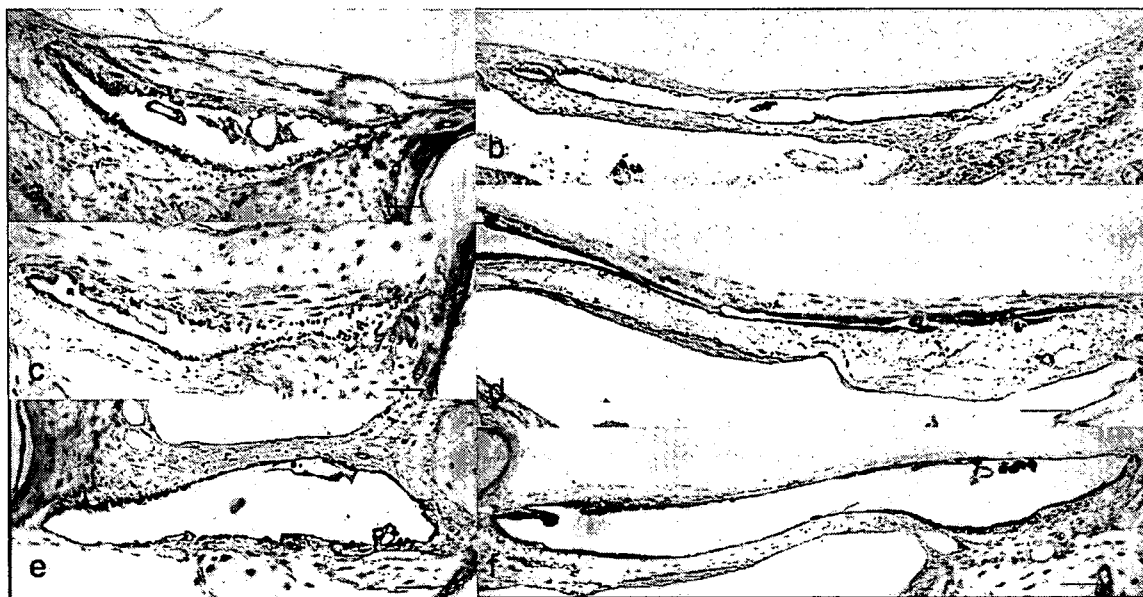


図1：内リンパ囊

a: 正常内リンパ囊 (中間部) b: 正常内リンパ囊 (遠位部) c, d: グリセロール投与1時間後には内リンパ腔は狭小化している. (c: 中間部 d: 遠位部) e, f: SNP 投与1時間後には内リンパ腔は拡大している. (e: 中間部 f: 遠位部)

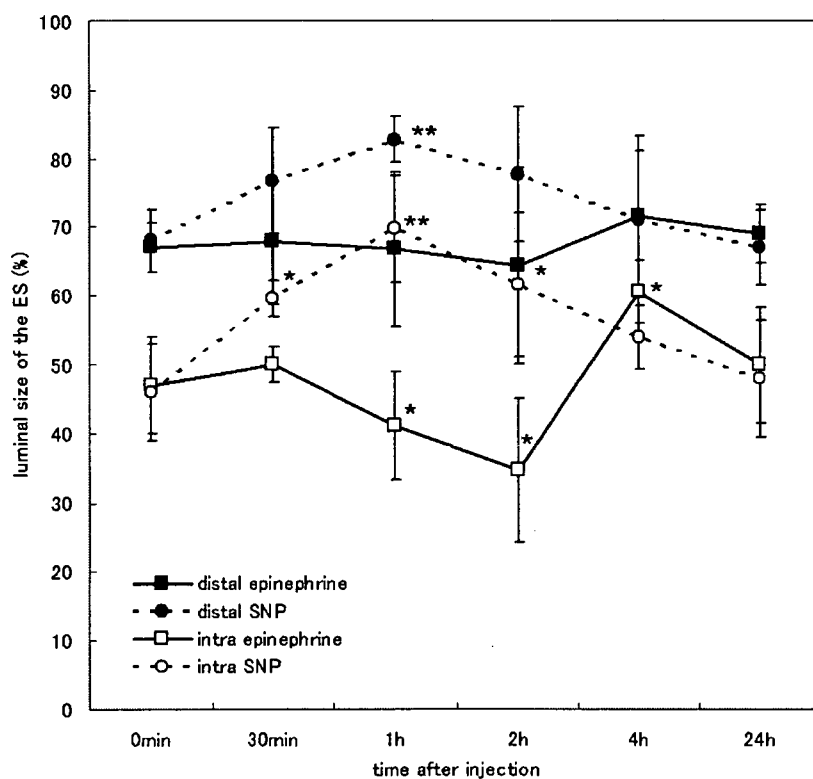


図2：内リンパ腔の容積の変化

9. メニエール病患者の内リンパ嚢組織における V2 レセプター遺伝子発現

北原 紘, 堀井 新, 前川千絵, 木澤 薫,
土井勝美, 久保 武 (大阪大)

[はじめに]

昭和49年の厚生省(当時)特定疾患メニエール病調査研究班のアンケート調査では, メニエール病は国際的に見ても先進国ストレス社会において有病率が高いとされ, "Menierization is civilization"と称された(1). 以来, メニエール病とストレスとの関連性に注目し, 研究が進められてきた. 今から十数年前, 竹田らを中心にメニエール病とストレスを関連付ける具体的な因子として, 視床下部一下垂体後葉から分泌されるストレス・ホルモンである抗利尿ホルモンに関する研究が始められた. メニエール病患者では抗利尿ホルモンの血中濃度が対照群に比して, めまい発作期, 間歇期にかかわらず有意に高いことが示された(2,3). しかしこの抗利尿ホルモン説では, ホルモンが両耳に均等に影響するにもかかわらずメニエール病の7-8割が一側性であることを説明できない. またストレスの非常に多い生活環境下の人が, 必ずしもメニエール病を発症するとは限らない. そこで我々は難治性メニエール病と診断され, 内リンパ嚢手術を施行した症例に関して, 内リンパ嚢組織を採取し, 抗利尿ホルモンの受け手側である V2 受容体の遺伝子発現を検索した.

[対象と方法]

2004-2006年に大阪大学・耳鼻咽喉科を受診し, 難治性と診断され内リンパ嚢手術を受けたメニエール病のうち, 内リンパ嚢組織採取に同意した8例を対象とした. 生体材料の使用に関しては, 大阪大学医学部附属病院倫理委員会により承認を得た(承認番号:0424). 術中に得られた内リンパ嚢組織から total RNA を抽出し, V2 受容体遺伝子のプライマーを用いた定量PCR法により, 内リンパ嚢組織における V2 受容体の遺伝子発現量を測定した. 対照遺伝子として, housekeeping gene である β 2-マイクロ・グロブリンを用いた. 対照群は便宜上, 聴神経腫瘍患者の内リンパ嚢とした.

[結果]

メニエール病の内リンパ嚢では, V2 受容体遺伝子の発現量が対照群に比して有意に上昇した. また内リンパ嚢における V2 受容体遺伝子発現量は, 血中抗利尿ホルモン値と有意な負の相関を認めた.

[考察]

これらの結果から, 元々何らかの原因で一側内リンパ嚢に V2 遺伝子が過剰発現していることが一側メニエール病の発症の基礎的背景として重要であり, ストレスの非常に多い生活環境下で血中抗利尿ホルモン上昇を来たした際, 一側メニエール病を発症する可能性が示唆された. また内リンパ嚢における V2 受容体遺伝子発現量と血中抗利尿ホルモン値との有意な負の相関は, 以前にも北野らが動物実験で報告しており(4), おそらく日々の生活でストレスを受け抗利尿ホルモ

ン上昇を来たした際、内リンパ水腫発生を回避するため内リンパ嚢における V2 受容体遺伝子の発現は抑制されると推察された。

[結論]

以上よりメニエール病の治療戦略として、日々のストレスを軽減させるような生活指導、心理療法、有酸素運動療法、水分大量摂取による抗利尿ホルモン値降下療法、さらには内リンパ嚢における V2 受容体およびその周辺遺伝子に対する遺伝子療法が期待される。今後の当研究班活動において進めていく予定である。

[参考文献]

- 1) Watanabe I: Ménière's disease with special emphasis on epidemiology, diagnosis and prognosis·Review·. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 42: 20-45, 1980.
- 2) Takeda T, Kakigi A, Saito H: Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. Acta Otolaryngol Suppl 519: 219-222, 1995.
- 3) Aoki M, Asai M, Nishihori T, Mizuta K, Ito Y, Ando K: The relevance of an elevation in the plasma vasopressin levels to the pathogenesis of Meniere's Attack. J Neuroendocrinol 19: 901-906, 2007.
- 4) Kitano H, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Isono T, Takeda T, Kimura H, Tooyama I: Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. Neuroreport 10: 1205-1207, 1999.

10. メニエール病確実例の内リンパ嚢に 発現する遺伝子の網羅的解析

土井勝美, 佐藤 崇, 倉増俊宏, 北原 紘,
西村将彦, 久保 武 (大阪大)

[はじめに]

多因子疾患であるメニエール病の本態である内リンパ水腫は、蝸牛血管条・半規管膨大部暗細胞における内リンパ液の産生と内リンパ嚢における内リンパ液の吸収の不均衡により生じると推察されているが、その形成機構は現在も十分には解明されていない¹⁾。これまで我々は、血管条および内リンパ嚢に発現するカリウムチャンネル KCNE 遺伝子に焦点をしばり、メニエール病確実例において同遺伝子の SNP 解析を行ってきた。その結果、KCNE1 および KCNE3 遺伝子上の SNP のパターンは、メニエール病の発症すなわち内リンパ水腫の形成に大きな影響を与えることが確認された²⁾。KCNE 遺伝子上のバリエーションは、メニエール病発症の決定因子ではないが、その危険因子となる可能性が示唆されたのである。メニエール病の発症には、KCNE 遺伝子上のバリエーション以外の多くの遺伝的な素因と、ストレス・食事・生活パターン等のさまざまな環境因子が複雑に絡み合っていることが推察される³⁾。メニエール病の遺伝的素因をさらに詳細に検討するためには、膨大な数の遺伝子の中から内リンパ水腫の形成に深く関与する可能性が高い遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子群における変異・バリエーションとメニエール病発症の関連を調べていく必要がある。

本研究では、メニエール病確実例の内リンパ嚢に発現する多数の遺伝子の動態を、同時に網羅的に観察することが可能な DNA マイクロアレイ法を用いて解析することとした。今回は、メニエール病確実例の内リンパ嚢において発現量が著明に低下する遺伝子群の中に含まれるストレス関連遺伝子について検討を行った。

[対象と方法]

当科で手術を施行したメニエール病確実例 (MD1...), 聴神経腫瘍 (AN1...) の症例よりヒト内リンパ嚢の採取を行った。本研究の目的, 内容, 成果等に関して各症例に十分な説明を行い, 各症例より文書によるインフォームドコンセントを得た。採取したヒト内リンパ嚢より total RNA の抽出を行った後, Affymetrix 社製 Gene chip とのハイブリダイゼーションを行った。Human Genome (HG) Focus Array 上で 8793 遺伝子の発現量が一度に測定可能である。得られたデータは解析ソフト Gene Spring を使用して処理を行った。

[結果]

1) 聴神経腫瘍症例 (AN1) とメニエール病症例 (MD1) の内リンパ嚢に発現する遺伝子量の比較

HG Focus Array の chip 上に存在する 8793 遺伝子の内, AN1 および MD1 いずれの内リンパ嚢でも発現が確認できた 7579 遺伝子について, 両者間で発現量を比較した。MD1 において 0.33 倍 (1/3 倍) 以下に発現量の低下を示した遺伝子群が 1214 遺伝子 (1214/7579=16%) あった (図 1)。

2) 聴神経腫瘍症例 (AN1) とメニエール病症例 (MD2) の内リンパ嚢に発現する遺伝子量の比較

同様に、HG Focus Array の chip 上に存在する 8793 遺伝子の内、AN1 および MD2 の内リンパ嚢のいずれにも発現が確認できた 7399 遺伝子について、両者間で発現量を比較したところ、MD2 において 0.33 倍以下に発現量の低下を示した遺伝子群は 502 遺伝子 ($502/7399=6.8\%$) あった。

3) メニエール病症例 (MD1・MD2) の内リンパ嚢で遺伝子発現量の低下する遺伝子群

MD1 において 0.33 倍 (1/3 倍) 以下に発現量の低下を示した遺伝子群が 1214 遺伝子、MD2 において 0.33 倍以下に発現量の低下を示した遺伝子群は 502 遺伝子で、両者に重なって含まれる遺伝子群は 322 遺伝子であった。HG Focus Array 上で、カリウムイオン輸送に関連する遺伝子は 105 遺伝子あり、上述の 322 遺伝子中に含まれるものとして Kir5.1 など 3 遺伝子が同定された。一方、ストレス関連遺伝子のフォルダ内に含まれる遺伝子は 138 遺伝子で、上述の 322 遺伝子群内に含まれるものとして HSP90 など 13 遺伝子が同定された。

[考察]

DNA マイクロアレイを用いた解析から、メニエール病症例の内リンパ嚢では、聴神経腫瘍症例の内リンパ嚢における各遺伝子の発現量と比較して、その遺伝子発現量が低下する遺伝子群が多数確認された。MD1 で遺伝子発現量が 0.33 倍以下に低下したものが 1214 遺伝子 (16%)、MD2 で遺伝子発現量が 0.33 倍以下に低下したものが 502 遺伝子 (6.8%) あった。AN1 と比較して、MD1 と MD2 の両者で遺伝子発現量が 0.33 倍以下に低下したのは 322 遺伝子であった。これらの遺伝子群における発現量の変化が、内リンパ水腫の形成に関係するものなのか、あるいは、存在する内リンパ水腫の結果であるのかは、現時点では不明である。

メニエール病症例で遺伝子発現量の変化するこれらの遺伝子群をさらに機能別に分類して検討することが可能であり、カリウムイオン輸送に関連する遺伝子として Kir5.1 など 3 遺伝子が、ストレス関連遺伝子として HSP90 など 13 遺伝子が同定された。メニエール病の発症とカリウムイオン輸送やストレスとの関係についてはこれまでに十分なデータが蓄積され、内リンパ水腫の形成に密接な関連を有することが示唆されている 3)。これらのストレス関連遺伝子上の変異・バリエーションを解析することで、メニエール病の遺伝的素因と環境因子の双方についてさらに検討を加えていく予定である。

[結論]

DNA マイクロアレイを用いた解析から、メニエール病症例の内リンパ嚢ではその遺伝子発現量が著明に低下する遺伝子群が多数確認された。カリウムチャンネル遺伝子、ストレス関連遺伝子など、これらの遺伝子群の内リンパ嚢における質的・量的変化が、内リンパ嚢における水・イオン輸送における機能的変化を惹起することで、内リンパ水腫の形成やメニエール病発症の遺伝的素因となる可能性が推察された。

[参考文献]

- 1) Morrison AW: Anticipation in Meniere's disease. J laryngol Otol 1995; 109: 499-502.
- 2) Doi K, Sato T, Kuramasu T, Hibino H, Kitahara T, Horii A, Matsushiro N, Fuse Y, Kubo T: Meniere's disease is associated with single nucleotide polymorphisms in the human

potassium channel genes, *KCNE1* and *KCNE3*. *ORL* 2005; 67: 289-293.

3) 高橋正紘: めまいとストレス. *日本医師会雑誌* 134: 1467-1470, 2005.

4) 土井勝美: ここまでわかった遺伝子異常「メニエール病」. *JOHNS* 22: 1719-1722, 2006.

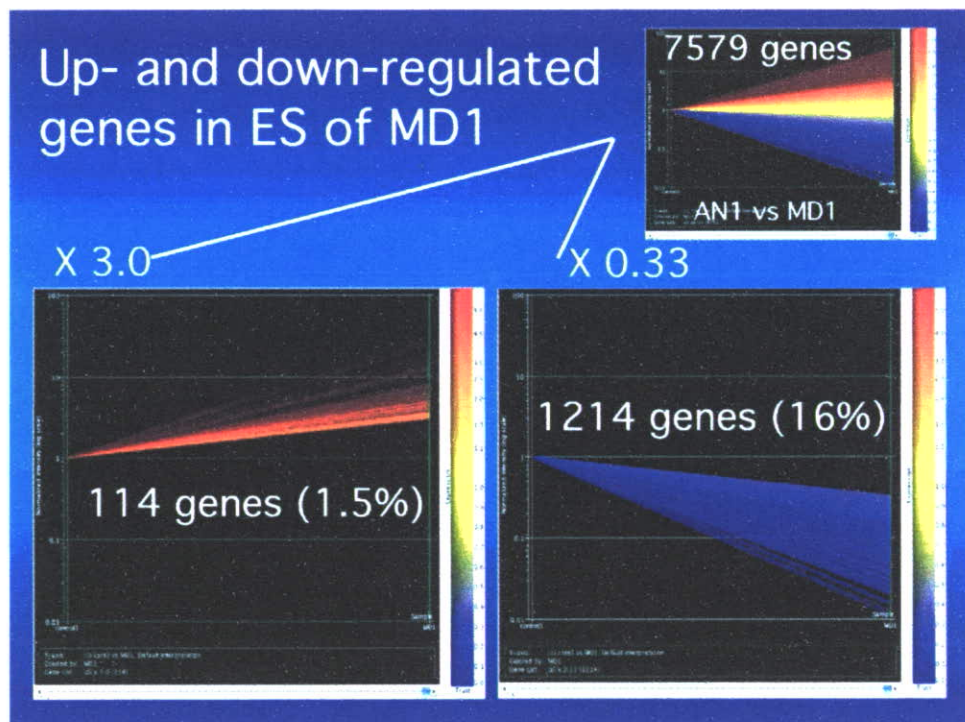


図1 聴神経腫瘍症例（AN1）とメニエール病症例（MD1）の内リンパ囊に発現する遺伝子群

AN1と比較して、MD1で遺伝子発現量が3倍に増加した遺伝子は114遺伝子、逆に発現量が1/3以下に低下した遺伝子が1214遺伝子であった。

1 1. 高度内耳障害に対するハイドロゲル IGF-1 療法臨床試験

伊藤壽一（京都大）

〔はじめに〕

内耳障害治療の目的で、内耳へ薬物を局所投与する研究を行ってきた。内耳障害に対する有効な薬物はこれまでいくつか報告されているが、実際の臨床にほとんど応用されていなかった。この最大の理由は、有効な薬物を内耳に到達させることが困難であることが挙げられる。我々はこれまで動物を使い、内耳へ直接薬物を投与する方法を報告してきた。今回は内耳保護薬物の中でインスリン様細胞成長因子（IGF-1）を生体吸収性徐放ゲルを担体として障害内耳に投与する研究を行い、その有効性が確認されたので、ヒトを対象とした臨床試験を開始した。そのプロトコールも紹介する。

〔対象と方法〕

基礎実験：IGF-1 (insulin like growth factor)を障害を与えた動物の内耳に投与した。IGF-1はこれまで *in vitro* の系で内耳保護作用があると報告されている。内耳に障害を与えたモルモットにIGFを組み込んだ徐放性ハイドロゲルを正円窓に留置した。動物の聴力は電気刺激聴性脳幹反応にて検討した。その後内耳を摘出し、内耳の有毛細胞の障害、ラセン神経節細胞の障害、薬物での保護効果を組織学的に検討した。

臨床試験：上記 IGF-1 を実際の臨床に応用するプロトコールを設定した。

〔結果〕

IGF-1 を投与した動物の内耳ラセン神経節細胞の障害はコントロールに比べ有意に減少した。また、機能的には IGF-1 を投与した動物の聴力閾値の上昇を有意に抑えることができた。

臨床応用のプロトコールは急性高度難聴を想定して作成した。

〔考察〕

内耳の感覚細胞などを保護する薬物はいくつか報告されているが、内耳へ効果的にこれらを投与する方法は皆無であった。今回使用した方法は動物実験の段階では内耳に薬物を効果的に投与し、しかも全身的な副作用は認められなかった。これにより内耳の有効に薬物を投与する方法が開発されたと考えられる。さらに一般への使用の前段階として、急性高度難聴患者に対する薬物使用のプロトコールも作成され、臨床応用への準備段階は確立された。

〔結論〕

内耳には特殊な解剖学的構造があり、内耳保護に効果のある薬物があってもそれが内耳に到達しないことが問題である。今回使用した徐放性ハイドロゲルを用いた IGF-1 投与法は内耳に薬物を効果的に投与する新しい方法である。本法を利用すればこれまで回復困難とされていた内耳障害に対し、効果的な治療方法になりうる可能性がある。

〔参考文献〕

1) 伊藤壽一 内耳への新しい薬物投与方法 - 徐放性ドラッグデリバリーシステム - 耳鼻臨

床 98,1-4, 2005

- 2) 中川隆之, 伊藤壽一 1 2. BDNF 2) 内耳 細胞増殖因子と再生医療 松本邦夫, 田畑
泰彦編 pp346-350 メジカルレビュー社 大阪 2006

12. アミノグリコシドによる有毛細胞死とミトコンドリアの役割

菅原一真, 宮内裕爾, 新井紹之, 橋本 誠,
下郡博明, 山下裕司 (山口大)

[はじめに]

内耳感覚細胞が障害される際, 細胞内シグナル伝達に関わる分子群の活性化が誘導され, その後感覚細胞が死滅する. 我々は, これまで内耳感覚細胞死のメカニズムを明らかにするべく基礎的研究を行い, 有毛細胞がストレスに曝露される際には, 早期に MAP キナーゼの1種である JNK が活性化することが細胞死に深く関わっていることを明らかにした¹⁾. また, 細胞死の最終段階にはカスパーゼ-9 やカスパーゼ-3 が重要な役割を果たすことを報告している²⁾. しかし, これらのシグナル伝達にミトコンドリアがどのように関わっているかは, 内耳感覚細胞では十分に明らかにされたとはいえないのが現状である (図 1). ミトコンドリアに細胞死のシグナルが伝わると, イオンチャンネル蛋白質 (VDAC) が PT pore と呼ばれる構造を形成し, 膜電位の消失, チトクロム C の放出を引き起こし, これがカスパーゼの活性化を誘導し, 細胞死が生じると報告されている. 今回我々は, イオンチャンネル蛋白質 (VDAC) を阻害するとされる Bcl-xL の有毛細胞死に対する効果について検討したので, 報告する.

[対象と方法]

生後 6 週の CBA/N マウスを用いた. ペントバルビタールによる深麻酔下に, 無菌操作で両側の卵形嚢を摘出し, 培養液 (BME/EBSS 2:1 %v) に浮遊させ, CO₂ インキュベーター内で培養した. 有毛細胞死を誘導するためには培養液に 2 mM のネオマイシンを加えた. また, ミトコンドリア内の voltage-dependent anion channel (VDAC) を阻害する目的で, Bcl-X_L (Calbiochem, 30-3000 pM) を培養液に溶解させて用いた. 培養終了後, 組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定し, PBS で洗浄した後, シリンジポンプと 27G の注射針による水流にて卵形嚢膜や耳石膜を除去し, 感覚上皮を露出させた. その後, 標本は以下の検討に用いた.

1. 残存有毛細胞数の評価

組織を, ブロック液 (1% アルブミン, 0.4% 正常ヤギ血清, 0.4% 正常ウマ血清, 0.4% Triton X-100 を含む) に浸した後, 抗カルモデュリン抗体 (Sigma, 1 : 150), 抗カルビンディン抗体 (Chemicon, 1 : 250) に反応させた. 2 次抗体として, Alexa 488 抗マウス Ig-G 抗体, Alexa 594 抗ヤギ Ig-G 抗体を用いて, 感覚細胞を標識した. 洗浄後, スライドガラス上に封入し, 蛍光顕微鏡下に単位面積あたりの残存有毛細胞数を評価した.

2. Caspase-3 の活性化の評価

卵形嚢培養を修了する 1 時間前に, 蛍光物質でラベルされたカスパーゼ-3 阻害剤 (CaspaTag : Chemicon) を, 培養液に追加した. 洗浄後, 4%パラホルムアルデヒドで固定し, Texas-Red labeled Phalloidin にて有毛細胞を標識, 蛍光顕微鏡下に観察した.

3. c-Jun kinase の活性化の評価

抗リン酸化 JNK 抗体を用いた免疫組織化学染色にて評価を行った. 抗カルモデュリン抗体を用いた 2 重染色にて有毛細胞を標識し, 蛍光顕微鏡下に観察した.