

Title	Quantitative analysis of aquaporin expression levels during the development and maturation of the inner ear(Abstract_要旨)
Author(s)	Miyoshi, Takushi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k20255
Right	許諾条件により本文は2017-12-21に公開; Final publication is available at 10.1007/s10162-016-0607-3
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	三 好 拓 志
論文題目	Quantitative analysis of aquaporin expression levels during the development and maturation of the inner ear (内耳発生・成熟過程におけるアクアポリン遺伝子発現の定量的解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>内耳は聴覚と平衡感覚をつかさどるとともに、水や電解質の調節と機能が密接に関連する器官でもある。内耳は内リンパ・外リンパの 2 つの水分区画からなり、内リンパの過剰はメニエール病や低音障害型感音難聴、一部の先天性難聴を引き起こす。また、内リンパの K⁺蓄積は正常な聴力に不可欠である。内耳における水や電解質の調節機構を解明することは、感音難聴の病態を解明し、治療法の確立につながる。</p> <p>アクアポリン(AQP)は水チャネルとも呼ばれ、細胞膜をまたいだ水分子の移動を可能にする膜タンパクである。哺乳類では 13 のサブタイプ(AQP0~12)が報告され、内耳でも局在が報告されている。AQP は内耳の水・電解質調節を解明する上で重要なターゲットであるが、内耳における各サブタイプの寄与には不明な点が多く、特に近年発見された AQP11, 12 の発現・局在は未知である。そこで本研究では、AQP11, 12 を含めた全てのサブタイプに対し、内耳発生・成熟過程における発現量を網羅的に測定した。さらに、発現量の推移を発生・成熟過程と比較し、各サブタイプの機能を検討した。</p> <p>本研究では、AQP の全てのサブタイプに対して内耳発生・成熟過程における発現量の推移を調べた。胎生 (E) 10, 13, 18 日齢および生後 (P) 3, 10, 21 日齢の C57BL6/J マウス内耳組織から RNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR で発現量を測定した。検量線は基準臓器(腎臓等)を用いて作成し、リファレンス遺伝子は <i>Rplp0</i> を用いた。</p> <p>まず、成熟内耳(P21)における各サブタイプの発現量を基準臓器と比較し、間接的に発現量を比較した。その結果、<i>Aqp1, 4, 9, 11</i> の 4 つが基準臓器の 1% を超えて発現していた。特に AQP11 の局在は未知であったため、<i>in situ hybridization</i> を行ったところ、外有毛細胞への局在が同定された。これは他の AQP に見られない特徴である。さらなる機能解析のため <i>Aqp11</i> ノックアウトマウスで ABR を測定したが、外有毛細胞の機能不全を示唆する難聴は見られなかった。AQP11 が細胞内の膜に局在することから、外有毛細胞内部の恒常性維持を通じてダイナミックレンジの調節に寄与していると推測されるが、機能的な代償もあることが示唆された。</p> <p>次に、発現量の経時変化を追跡するため、各サブタイプの発現量を E10, E13, E18, P3, P10, P21 で測定した。その結果、<i>Aqp</i> の発現量は①発生初期に発現 (<i>Aqp6, 8, 12</i>)、②E18 に発現のピーク (<i>Aqp2, 5, 7</i>)、③単調増加 (<i>Aqp0, 1, 9</i>) の 3 パターンを認めた。①群の寄与は不明であるが、②群は内外リンパ腔を形成するための水分分泌、③群は K⁺分泌や電位といった内リンパの特殊な環境の成立に寄与していると考えられた。特に③群の <i>Aqp9</i> の発現量は P3 から P21 にかけて 70 倍に急上昇していたため、免疫染色で局在の推移を調べた。すると、AQP9 は P3 以降、K⁺再利用経路に沿って発現が現れ、K⁺再利用を通じて電位の形成・維持に寄与していると推測された。</p>			

本研究では、*Aqp11* の局在から、外有毛細胞の細胞内恒常性という AQP の新たな役割を示した。また、AQP を発生・成熟過程における発現量の変化に基づいて分類し、内外リンパ腔の形成や内リンパ電位の成立など、特定の機能と関連するサブタイプがあることを示した。今後は、細胞単位での発現や局在等、より細かな視点で解析を進めることで、本研究は発展し、内耳の水分調節機構の解明に貢献できると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

内耳は内リンパ・外リンパの 2 つの水分区画から構成される。内リンパは高カリウム・高電位の特殊な環境で、その恒常性は内耳の機能に必須である。水チャネルである AQP が内リンパの恒常性に寄与していることは以前から指摘されてきたが、サブタイプごとの機能には不明な点が多かった。特に AQP11, 12 は近年発見された特殊な AQP で、内耳では発現も局在も未知であった。

本研究では、定量的リアルタイム PCR を用いて内耳の発生・成熟過程における AQP 遺伝子の発現を網羅的に定量した。その結果、*Aqp11* の発現量が発生を通じて高いこと、*Aqp* の発現量に内耳の発生・成熟過程に対応したパターンがあることを示した。加えて、*Aqp11* に対して *in situ hybridization* を用い、外有毛細胞に局在する特異な AQP であることを明らかにした。AQP5, 9 に対しては、免疫染色により局在の推移を調べ、発現量に対応する変化を調べた。そして、AQP5 と内外リンパ腔の形成、AQP9 と内リンパ電位の成立など、特定の機能との相関を示した。内耳の発生・成熟過程が水分調節と深く関わっていることに着目し、その過程における変化に着目した点が、本研究の特色である。

以上の研究は、内耳の水分恒常性における AQP の機能の解明に貢献し、感音難聴、特に内リンパの異常に起因する疾患についての病態解明や、治療法の確立に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 13 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降