

令和元年6月14日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16924

研究課題名(和文) 複層的アプローチによるラセン靭帯線維細胞の電気生理学的機能解析

研究課題名(英文) Electrophysiological analysis of fibrocytes of the spiral ligament in the inner ear

研究代表者

吉田 崇正 (Yoshida, Takamasa)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50600912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：内リンパ液高電位(EP)は聴覚に必須の特性で、蝸牛側壁のイオン輸送に立脚し、その破綻は難聴を惹起する。本課題では、蝸牛側壁のラセン靭帯で生スライス標本を作製してwhole cell記録を行い、Na電流が観察された。これはin vivo実験の結果および数理モデルの予測に合致するものである。ラセン靭帯の線維細胞には、EP成立に重要なNaチャンネルが存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳蝸牛の内リンパ液が持つ+80mVもの高電位は、聴覚の高い感受性を支える「電池」としての役割を持つ。本課題ではこの電池の「電源」に相当する蝸牛側壁を対象として電気生理学的解析を行い、電源の重要な要素としてNaチャンネルが存在する可能性を見出した。今後その分子実体を解明することで、内耳性難聴の病態理解が進み、難聴疾患に対する創薬や再生医療の基盤となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Endocochlear potential (EP) is essential for hearing, and depends on ion transport of the lateral cochlear wall. In this study, we performed slice patch clamp experiments of the lateral cochlear wall, and a Na current was recorded in the spiral ligament. This Na current was consistent with the results of in vivo experiments and a computer simulation analysis. These findings suggested that the fibrocytes in the spiral ligament have Na channels which are important for the EP.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳 蝸牛 電気生理 ラセン靭帯

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景、研究の目的

内リンパ液高電位（EP）と蝸牛 K 循環は聴覚に必須の特性で、蝸牛側壁のイオン輸送に立脚し、その破綻は難聴を惹起する。蝸牛側壁のラセン靭帯と血管条は、発達したギャップ結合の細胞間交通によりカップリングし、外層と内層という2つの上皮層として機能する。ラセン靭帯の細胞成分である線維細胞（SLF）にはタンパク発現パターンの異なるサブタイプ（I-V）があるが、これらの細胞群はギャップ結合によってひとつつながりの大きな細胞膜（以下、SLF 複合膜）として機能し、外層の側底面を構成する（図 1）。この SLF 複合膜は、定常的に +10 mV の膜電位を持つ。この正の静止膜電位に基づく外層の大きな経上皮電位差（90 mV）は、内外リンパ液間の電位差である EP（80 mV）の主要素である。また、研究代表者らは先行研究で *in vivo* 細胞内記録実験を行い、SLF 複合膜が Na 選択的透過性を持つことを見出した（Yoshida, et al. Pflügers Archiv 468: 1609-19, 2016; 図 3A）。

SLF 複合膜（組織レベル）が示すこれらの特性の基盤を細胞・分子レベルで解明することは、正常聴覚機構と難聴病態の理解に有意義である。しかし、SLF の電気生理学的データは極めて乏しい。

2. 研究の目的

SLF の電気生理学的特性の解明

3. 研究の方法

(1) パッチクランプ実験（細胞レベル）

ラセン靭帯はマトリクスが強靭なので、SLF のパッチクランプは胎仔・新生仔でのみ可能とされてきた。一方、EP や K 循環が成立するのは 2-3 週齢（齧歯類）である。正常聴覚における SLF の電気生理学的役割を知るためには、この時期以降の動物の SLF 電流を測定する必要がある。

本課題では、マトリクス深部の SLF を記録するために、スライスパッチクランプ法を成獣の内耳組織に応用した。実体顕微鏡下に急速単離した蝸牛側壁（血管条+ラセン靭帯）の組織片を低触点アガロースで包埋し、厚さ 50 μm の生スライスを作成した。SLF 表面の残存マトリクスを酵素消化し、パッチ電極を当てて whole cell 記録を行った。

(2) *in vivo* 細胞内記録実験（組織レベル）

麻酔したモルモット蝸牛において SLF の細胞外（外リンパ腔）を灌流しつつ、微小電極で細胞内記録を行い、SLF 複合膜のイオン透過性や薬剤感受性を調べた。

(3) 数理モデル（器官レベルの電気生理現象を再現）

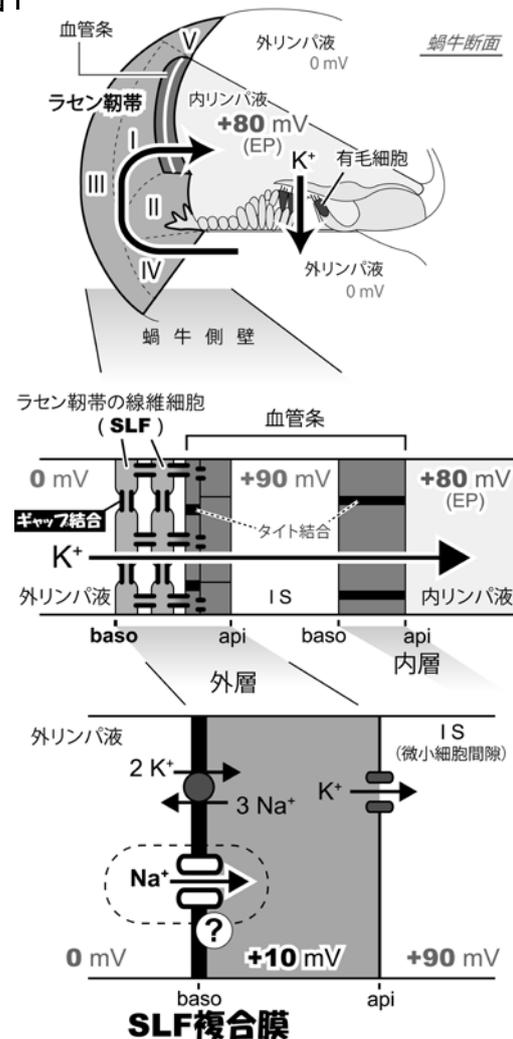
内耳蝸牛の各構成要素を数式化したモデルを用いて、正常および各種負荷条件下における反応をシミュレートした。

4. 研究成果

(1) パッチクランプ

成獣ラセン靭帯のコラーゲンマトリクスが予想以上に強靭で、実験の条件設定に難渋した。高濃度・長時間の酵素処理によってスライス断面に露出した細胞のうち、少数だがギガシー ル可能な細胞が得られた。これにより、従来不可能とされてきた、成獣 SLF のパッチクランプに成功した。Whole cell 測定ができた細胞の一部では、不活性化しない（定常的に開状態の）Na 電流が記録された（図 2）。SLF に Na チャネルの存在が示唆されるが、細胞の状態が悪く記録が不安定で、得られた電流の薬剤感受性を調べるには至らなかった。

図 1

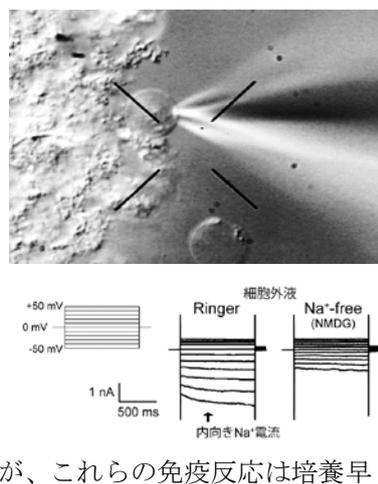


なお、SLF のサブタイプはスライス中の位置によって概ね推測できるが、最終的には細胞内色素によるマーキングとマーカー分子の免疫染色を組み合わせ、記録した細胞のサブタイプを確定する予定であった。しかし、強い酵素処理のためか、whole cell 記録後の免疫染色には成功しなかった。

今後、安定した whole cell 測定と記録後の免疫染色を両立できるような、細胞障害の少ない酵素処理条件を追究して、目的とする Na 電流の解析を進める予定である。

また、パッチクランプ実験の効率化を目的として、急速単離したラセン靭帯組織から初代培養・継代を行った。マーカー分子の免疫染色によるサブタイプ同定ではほとんどが type I であり、whole cell で測定されたのは小さなリーク電流のみであった。一部の細胞は Na/KATPase あるいは NKCC1 が陽性で、type II, IV あるいは V 由来と考えられたが、これらの免疫反応は培養早期に消失した。研究期間終了時点では、I-V の各サブタイプのタンパク発現パターンを維持した培養細胞系の確立には至っていない。今後、栄養因子やホルモン等、培養の条件検討が必要と考えられた。

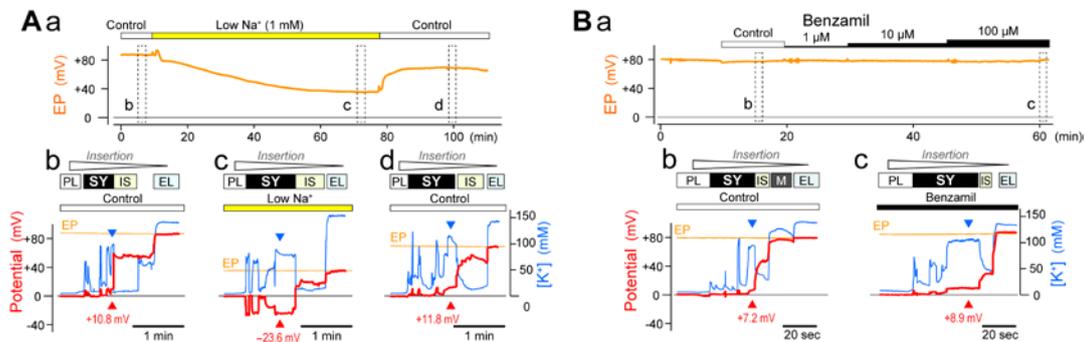
図 2



(2) in vivo 細胞内記録

SLF 複合膜を持つ正の静止膜電位が Na 選択的チャネルによって生み出されているのであれば、チャネルを阻害すると SLF 複合膜の膜電位が過分極し、結果として EP が低下すると推測される。そこで、モルモット蝸牛で外リンパ灌流を行い、電位依存性 Na チャネルの阻害薬であるリドカイン・テトロドトキシン、上皮型 Na チャネルの阻害薬であるアミロライド・ベンザミルを SLF の細胞外に投与した。いずれの場合も、SLF 複合膜の膜電位および EP は大きく変化しなかった (図 3B)。この結果から、SLF 複合膜の Na 選択的透過性と正の膜電位を担うのは、これらの古典的 Na チャネル以外の分子であることが示唆された。

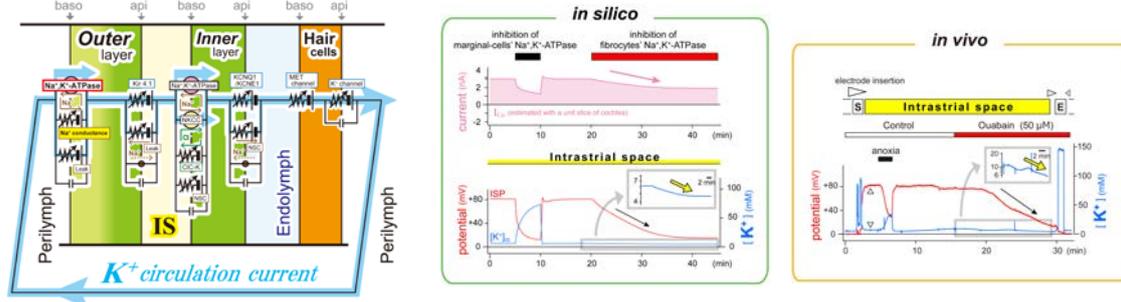
図 3



(3) 数理モデル

従来の蝸牛数理モデル (NHK モデル) を基盤として、SLF 複合膜に Na チャネルを組み込み、モデルを改訂した (fi-NHK モデル)。モルモット蝸牛の in vivo で実測されながら、従来のモデルで再現できなかったいくつかの現象を、改訂モデルによって合理的に再現することができた (発表論文 3; 図 4)。これらの結果は、「SLF の Na チャネル」という仮説を支持するものである。

図 4



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件、いずれも査読あり)

- (1) Tamae A, Ishizu K, Yoshida T, Kubo K, Matsumoto N, Yasui T, Matsutani K, Tsuruya K, Nakagawa T: Evaluation of the effects of chronic kidney disease and hemodialysis on the inner ear using multifrequency tympanometry. *The journal of international advanced otology* 14(3): 447-45, 2018; DOI 10.5152/iao.2018.4736
- (2) Ishizu K, Tamae A, Kubo K, Yoshida T, Matsumoto N, Yasui T, Nakagawa T: Diagnosis and following up of Ménière's disease using multifrequency tympanometry - cutoff values and temporal changes in measurements. *Auris Nasus Larynx* 45 (1): 81-7, 2018; DOI 10.1016/j.anl.2017.05.008
- (3) Nin F, Yoshida T, Murakami S, Ogata G, Uetsuka S, Choi S, Doi K, Sawamura S, Inohara H, Komune S, Kurachi Y, Hibino H: Computer modeling defines the system driving a constant current crucial for homeostasis in the mammalian cochlea by integrating unique ion transports. *NPJ Systems Biology and Applications* 3: 24, 2017; DOI 10.1038/s41540-017-0025-0
- (4) Ogata G, Ishii Y, Asai K, Sano Y, Nin F, Yoshida T, Higuchi T, Sawamura S, Ota T, Hori K, Maeda K, Komune S, Doi K, Takai M, Findlay I, Kusuhara H, Einaga Y, Hibino H: A microsensing system for the in vivo real-time detection of local drug kinetics. *Nature Biomedical Engineering* 1: 654-66, 2017; DOI 10.1038/s41551-017-0118-5
- (5) Yoshida T, Sawamura S, Ota T, Higuchi T, Ogata G, Hori K, Nakagawa T, Doi K, Sato MP, Nonomura Y, Horii A, Takahashi S, Komune S, Nin F, Hibino H: Fibrocytes of the mammalian inner ear; the molecular architecture, physiological properties, and pathological relevance. *Medical Research Archives* 5 (6), 2017; DOI 10.18103/mra.v5i6.1335
- (6) Sato MP, Higuchi T, Nin F, Ogata G, Sawamura S, Yoshida T, Ota T, Hori K, Komune S, Uetsuka S, Choi S, Masuda M, Watabe T, Kanzaki S, Ogawa K, Inohara H, Sakamoto S, Takebayashi H, Doi K, Tanaka K, Hibino H: Hearing Loss Controlled by Optogenetic Stimulation of Nonexcitable Nonglial Cells in the Cochlea of the Inner Ear. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 300, 2017; DOI 10.3389/fnmol.2017.00300

[学会発表] (計6件)

- (1) 平成30年、11月28日～30日、第77回日本めまい平衡医学会総会、山口
吉田崇正、久保和彦、友延恵理、中川尚志
「Multifrequency Tympanometry を用いたメニエール病診断」
- (2) 平成30年10月4日～6日、第27回日本耳科学会総会、大阪
吉田崇正、久保和彦、園田世里夏、中川尚志
「突発性難聴の予後因子としての末梢血白血球数および好中球数に関する検討」
- (3) 平成30年6月10日～13日、30th Barany Society Meeting, Uppsala
Yoshida T, Kubo K, Nakagawa T
“Diagnostic value of the multifrequency tympanometry in the patients with Meniere's disease”
- (4) 平成29年11月29日～12月1日、第76回日本めまい平衡医学会総会、軽井沢
吉田崇正、久保和彦、園田世里夏、中川尚志
「温度眼振検査にて Visual Suppression が効かない症例の検討」
- (5) 平成29年10月19日～20日、第62回日本聴覚医学会総会、福岡
吉田崇正、日比野浩、中川尚志
「ラセン靭帯の線維細胞が in vivo で示す Na 透過性に関する数理モデルを用いた検討」
- (6) 平成29年5月18日～20日、第118回日本耳鼻咽喉科学会総会、広島
吉田崇正、久保和彦、園田世里夏、中川尚志
「Visual suppression の効かない症例の検討」

[図書] (0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

中川 尚志 (NAKAGAWA, Takashi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70274470

日比野 浩 (HIBINO, Hiroshi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：70314317

任 書晃 (NIN, Fumiaki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80644905

緒方 元気 (OGATA, Genki)

新潟大学・医歯学系・特任講師

研究者番号：80707232