

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17736

研究課題名(和文)内耳蝸牛の特殊電気的環境を規定するイオン輸送の分子実体の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular entities responsible for unique electrochemical property of the cochlear lateral wall

研究代表者

澤村 晴志朗 (Sawamura, Seishiro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10781974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内耳蝸牛を満たす内リンパ液は、+80 mVの高電位を示す特殊な細胞外液であり、聴覚に必須である。これは、内・外2層からなる蝸牛側壁のイオン輸送機能によって維持される。近年、我々は、蝸牛側壁外層がNa⁺透過性を有すること、これが内リンパ液高電位に必須であることを見出した。しかしながら、その分子実体は全くの不明であった。本研究では、外層組織からタンパク質を抽出し、網羅的解析によって候補分子群を同定した。さらに、電気生理学的解析により、その内の1種が蝸牛外層の膜電位においてNa⁺透過性を示すこと、その阻害剤を蝸牛に灌流すると内リンパ液電位が低下することを見出した。以上より、目的の分子実体を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳性障害性難聴に対する効果的な治療法は未だほとんどない。この課題を解決するためには、内耳蝸牛の聴覚機能に関する理解を深めることが重要である。本研究では、これまであまり調べられてこなかった蝸牛側壁外層に発現するタンパク質を網羅的に解析し、聴覚に必須な内耳電位の維持に関わる新たなイオン輸送体を同定した。この成果は、聴覚生理の基礎的知見を広げるだけでなく、難聴の病因解明や治療法の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The cochlea in the inner ear is filled with a unique extracellular solution that exhibits a highly positive potential of +80 mV. This property is essential for hearing and likely to be maintained by ion transport across cochlear lateral wall made up of two epithelial layers. In our earlier work, we found that the outer layer of the lateral wall has Na⁺ permeability which contributes to highly positive endocochlear potential. Nevertheless, its molecular entity remained elusive. In this study, we identified 5 channels and 19 transporters expressed in the outer layer by proteomic analysis. In addition, by in vitro and in vivo electrophysiological experiments, we found that one of the transporters showed Na⁺ permeability and perfusion of its inhibitor to the cochlea decreased endocochlear potential. These results suggest that the identified transporter has essential role in the Na⁺ permeability of the lateral wall and maintenance of electrochemical property of the cochlea.

研究分野：分子生理学

キーワード：内耳蝸牛 イオン輸送 トランスポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

聴覚は重要な感覚の一つである。世界人口の約 10% が有する難聴は、ヒトの生活の質を大きく低下させる。中でも内耳障害性難聴に対する効果的な治療法は未だ殆どない。

音は、外耳・中耳を経て内耳蝸牛に到達する。蝸牛は、音振動を電気信号に変換して脳へと伝達する。この器官は、三本の細長い管を束ねて渦巻き状にした形を示す(図1)。感覚細胞である有毛細胞は、感覚毛を、+80 mV の高電位と 150 mM の高 K⁺濃度を示す特殊な細胞外液「内リンパ液」に浸している。この内リンパ高電位は聴覚に必須であり、その破綻は難聴の主要因となる。この電位環境は、2枚の上皮細胞層、すなわち外層と内層から成る蝸牛側壁のイオン輸送機構に立脚することが知られている(図2)。最近、我々は、側壁外層の側底膜が Na⁺透過性に支配されており、これが蝸牛外層の特異な正の静止膜電位および内リンパ液高電位を維持していると示唆される知見を得た(Yoshida et al., *Pflügers Arch* 2016)。しかしながら、その分子基盤は全く不明であった。

2. 研究の目的

聴覚に必須な内リンパ液高電位成立の仕組みを理解することは、内耳性難聴発症機序の解明に貢献する。本研究では、我々が過去に見出した蝸牛側壁の外層側底膜が有する Na⁺透過性に着目し、その分子的基盤を明らかにする。まず、側底膜を構成する組織を単離し、網羅的解析によって候補分子群を抽出する。次に、これらを培養細胞に発現させて電気生理学的に解析し、候補を絞り込む。最終的に、候補分子の阻害薬を用いた in vivo 実験によって、内リンパ液高電位への寄与を調べる。

3. 研究の方法

(1) 外層側底膜画分のピオチン化と質量分析

40匹の雄BN/SsNSIcラットから、蝸牛を摘出した。実体顕微鏡下で、ラット蝸牛の正円窓と卵円窓を開放し、EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo scientific)を正円窓より注入した。その後、液灌流により、不要なBiotinを除去した。外層側底膜を構成するらせん靱帯と頂上膜を構成する血管条のマーカ分子の抗体を用いて免疫染色を行い、らせん靱帯のみピオチン化されていることを確認した後、単離して膜画分を精製した(図3)。このサンプルをNeutrAvidin beadsにかけることによりピオチン化タンパク質を回収し、質量分析法で解析した。検出されたタンパク質群を、Gene ontologyおよびIngenuity Knowledge Baseにかけて解析し、膜タンパク質を分類した。特に、イオンチャネル・トランスポーターに着目し、候補分子を抽出した。

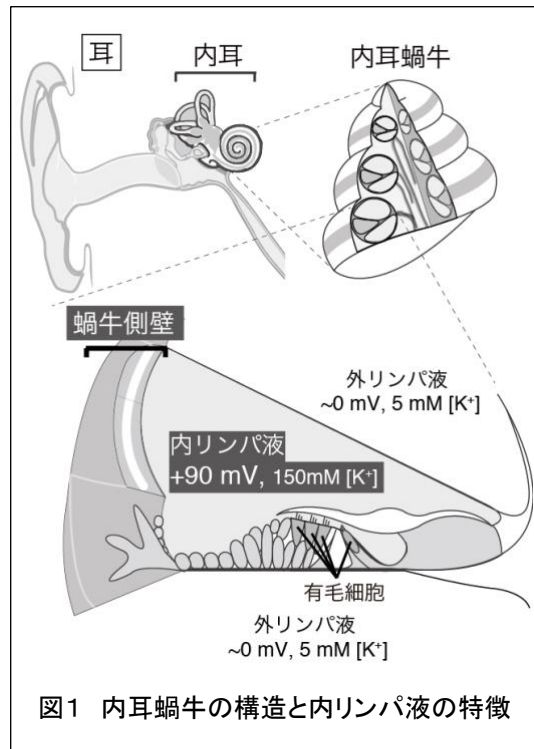


図1 内耳蝸牛の構造と内リンパ液の特徴

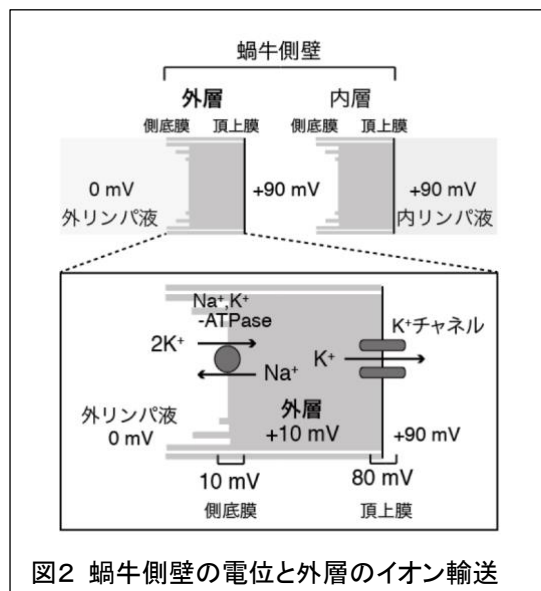


図2 蝸牛側壁の電位と外層のイオン輸送

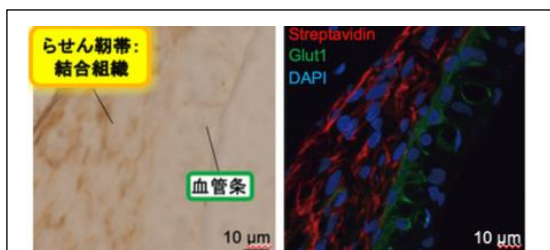


図3 らせん靱帯膜のピオチン化

左図: 褐色のシグナル、右図: 赤色のシグナルがピオチンによる標識を示す。

(2) 候補遺伝子のクローニング

(1)で抽出された Na⁺透過性の候補分子群について、雄の BN/SsNSIc ラットのらせん靱帯より作成した cDNA ライブラリをテンプレートに、PCR で増幅した。それぞれの遺伝子を pCRII T ベクターに TA クローニングし、DNA シークエンサーにより配列の確認を行った後、制限酵素カットして pIRES2-EGFP ベクターにサブクローニングした。

(3) パッチクランプ法による機能解析

pIRES2-EGFP ベクターにサブクローニングした遺伝子を、Lipofectamine を用いて HEK293 細胞へ導入した。緑色蛍光を有する細胞をホールセルパッチクランプ法により解析した。ここでは、電位固定の上、電流を測定した。細胞内ピペット溶液は、110 mM L-グルタミン、110 mM KOH、20 mM KCl、10 mM EGTA、2 mM MgCl₂、10 mM HEPES、1 mM MgCl₂ からなり、KOH で pH7.4 に調整した。細胞外液の組成は、140 mM NaCl、5 mM KCl、10 mM HEPES、10 mM D-Glucose、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、(Tris で PH 7.4 に調整; CO₂/HCO₃⁻ free)とした。全細胞膜電流は電極内液と細胞外液との液間電位 (15 mV) をあらかじめ補正し、-135 mV ~ +65 mV まで 20 mV 刻みのステップパルスを与えた。その後、細胞外液を NMDG-Cl 溶液へ置換し、全細胞膜電流を記録した。これら全細胞膜電流の差し引きにより、NMDG 感受性電流を Na⁺電流として抽出し、解析した。

(4) in vivo 電極法を用いた外層側底膜に発現するイオン輸送体の生理的意義の検討

麻酔下の雄 Hartley モルモット蝸牛に、電位を測定する Ag/AgCl 電極を挿入し、内リンパ高電位を測定した。外層を浸す外リンパ液に 100 μM の 4,4'-ジイソチオシアノ-2,2'-スチルベンジスルホン酸 (DIDS) を還流して、電位変化を追跡した。

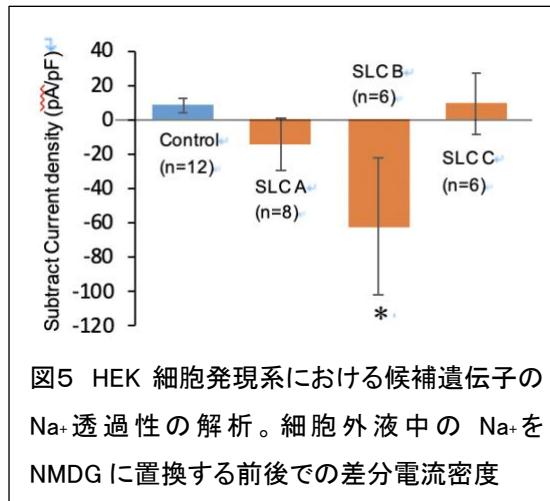
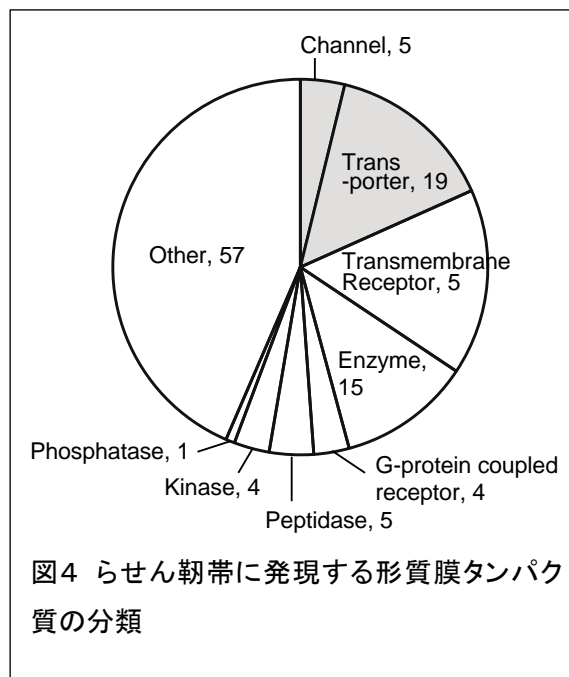
4. 研究成果

(1) らせん靱帯の質量分析

ビオチン化らせん靱帯の膜面分からは 101.7 μg のタンパク質が得られたが、そのうち NeutrAvidin beads で回収できたのは、24.4 μg (24 %) であった。このサンプルを質量分析にかけて 820 種類のタンパク質を同定した。これらの中で、Gene ontology および Ingenuity Knowledge Base を利用した解析から、形質膜タンパク質として分類されたものが 131 種類あった。その中で、イオン透過性に関わると考えられるチャネル分子は 5 種類、トランスポーター分子は 19 種類含まれた (図4)。

(2) HEK 細胞発現系による候補遺伝子の Na⁺透過性の解析

(1)で抽出されたチャネル・トランスポーター群の中で、Solute carrier protein family に分類される2種のトランスポーター SLC-A,B は、Xenopus Oocyte を用いた実験で Na⁺透過性を持つ可能性が示唆されていたことから、これらに着目した。さらに同 family に分類される SLC-C については、質量分析では有意なシグナルが検出されなかったが、過去に蝸牛らせん靱帯に発現することが示唆されていたため、これも含めた3種類の SLC トランスポーターをクローニングした。これらを HEK293 細胞に導入し、voltage-clamp mode のホールセルパッチクランプ法により解析した。Na⁺電流の成分は、細胞外液の Na⁺を NMDG に置換した溶液を灌流し、差分電流を取ることで評価した。外層側底膜の膜電位に相当する +5 mV における Na⁺電流成分の電流密度を検討した結果、vector を導入した control 細胞では、+8.53 ± 3.99 pA/pF であるのに対し、SLC-B 発現細胞においては、-61.93 ± 40.01 pA/pF と有意な内向き Na⁺電流の増加が見られた (図5)。このことから、SLC-B は、蝸牛外層側底膜上において Na⁺透過性を示しうる分子であることが示唆された。



(3) モルモット蝸牛における in vivo 実験

(2)に述べた結果から、SLC-B は蝸牛外層側底膜に発現する Na^+ 透過性分子であることが示唆された。過去の文献から、SLC-B に対して阻害効果を持つ分子として DIDS が知られていた。そこで、モルモット蝸牛の内リンパ液電位を測定しながら、DIDS を外層側底膜側の細胞外液に灌流し、電位変化を追跡することで、SLC-B の内リンパ液電位に対する寄与を調査した。まず、麻酔下で蝸牛を露出し、蝸牛骨に微小な穴を開けて電極を刺入した。電極を蝸牛内へと進めると、約+80 mVの高電位が検出された。内リンパ液電位は、 Na^+ , K^+ -ATPase といったイオン輸送体の働きで維持されており、エネルギー供給がなくなると負値まで低下することが知られる。ここで、モルモットの気管に繋いだ人工呼吸器を止めて酸素供給を低下させると、電位が負値まで低下した。これは人工呼吸器を再度稼働させると元の値に戻った。このことから、電極先端は、内リンパ液電位を捉えていることが確認された。次に、蝸牛側壁の外層が浸されている外リンパ液中に、100 μM の DIDS を灌流した。すると、内リンパ液電位は徐々に低下し、15 分後には+40 mV となった(図6)。これは、DIDS 感受性の分子が、内リンパ液高電位の成立に寄与していることを示唆する。

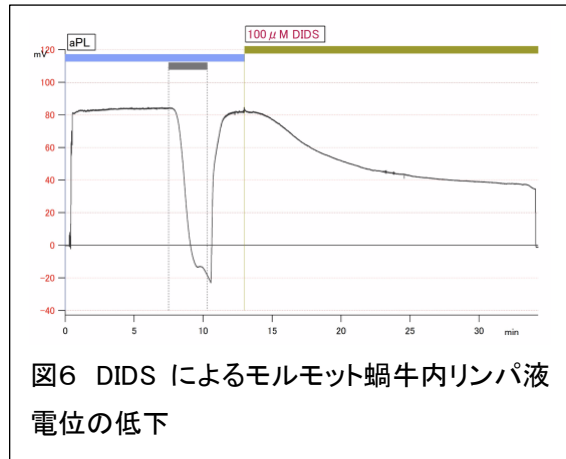


図6 DIDS によるモルモット蝸牛内リンパ液電位の低下

以上の結果から、 Na^+ 透過性を有し、DIDS 感受性を持つ SLC-B が、蝸牛の外層側底膜の Na^+ 透過性を担う分子実態の一つであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nonomura Yoriko, Sawamura Seishiro, Hanzawa Ken, Nishikaze Takashi, Sekiya Sadanori, Higuchi Taiga, Nin Fumiaki, Uetsuka Satoru, Inohara Hidenori, Okuda Shujiro, Miyoshi Eiji, Horii Arata, Takahashi Sugata, Natsuka Shunji, Hibino Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterisation of N-glycans in the epithelial-like tissue of the rat cochlea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-38079-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takamasa Yoshida, Seishiro Sawamura, Takeru Ota, Taiga Higuchi, Genki Ogata, Karin Hori, Nakagawa Takashi, Katsumi Doi, Mitsuo P Sato, Yoriko Nonomura, Arata Horii, Sugata Takahashi, Shizuo Komune, Fumiaki Nin, Hiroshi Hibino	4. 巻 5
2. 論文標題 Fibrocytes in the cochlea of the mammalian inner ear: their molecular architecture, physiological properties, and pathological relevance	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fumiaki Nin, Takamasa Yoshida, Shingo Murakami, Genki Ogata, Satoru Uetsuka, Samuel Choi, Katsumi Doi, Seishiro Sawamura, Hidenori Inohara, Shizuo Komune, Yoshihisa Kurachi, and Hiroshi Hibino	4. 巻 3
2. 論文標題 Computer modeling defines the system driving a constant current crucial for homeostasis in the mammalian cochlea by integrating unique ion transports.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NPJ Systems Biology and Applications	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41540-017-0025-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Genki Ogata, Yuya Ishii, Kai Asai, Yamato Sano, Fumiaki Nin, Takamasa Yoshida, Taiga Higuchi, Seishiro Sawamura, Takeru Ota, Karin Hori, Kazuya Maeda, Shizuo Komune, Katsumi Doi, Madoka Takai, Ian Findlay, Hiroyuki Kusahara, Yasuaki Einaga, Hiroshi Hibino	4. 巻 1
2. 論文標題 A microsensing system for the in vivo real-time detection of local drug kinetics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 654-666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-017-0118-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ota Takeru, Nin Fumiaki, Choi Samuel, Muramatsu Shogo, Sawamura Seishiro, Ogata Genki, Sato Mitsuo P., Doi Katsumi, Doi Kentaro, Tsuji Tetsuro, Kawano Satoyuki, Reichenbach Tobias, Hibino Hiroshi	4. 巻 472
2. 論文標題 Characterisation of the static offset in the travelling wave in the cochlear basal turn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 625 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-020-02373-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato MP., Higuchi T, Nin F, Ogata G, Sawamura Seishiro, 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	4. 巻 10
2. 論文標題 Hearing Loss Controlled by Optogenetic Stimulation of Nonexcitable Nonglial Cells in the Cochlea of the Inner Ear	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2017.00300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Seishiro Sawamura, Yoriko Nonomura, Fumiaki Nin, Satoru Uetsuka, Hidenori Inohara, Arata Horii, Sugata Takahashi, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, Hiroshi Hibino
2. 発表標題 Comprehensive protein analysis of the transport system in a connective tissue of the inner ear.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤村 晴志朗、ラズビナ オリガ、緒方 元気、渡邊 航太、浅井 開、花輪 藍、栄長 泰明、日比野 浩
2. 発表標題 ダイヤモンドセンサによる血漿中の分子標的薬イマチニブの迅速測定
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seishiro Sawamura, Yoriko Nonomura, Fumiaki Nin, Arata Horii, Sugata Takahashi, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, Hiroshi Hibino
2. 発表標題 Proteomic analysis of the transport system in a connective tissue of the mammalian cochlea
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤村晴志朗、野々村頼子、任書晃、上塚学、猪原秀典、堀井新、高橋姿、永森收志、金井好克、日比野浩
2. 発表標題 内耳蝸牛内リンパ液の恒常性に関する らせん靭帯膜タンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第68回北部薬理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 澤村晴志朗、野々村頼子、任書晃、上塚学、猪原秀典、堀井新、高橋姿、永森收志、金井好克、日比野浩
2. 発表標題 内耳蝸牛の特殊体液の恒常性維持に関する 膜タンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第64回中部生理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 澤村 晴志朗	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 464
3. 書名 生き物と音の事典 2-13 内耳の形と働き(ヒト)	

1. 著者名 澤村 晴志朗、任 書晃、日比野 浩	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 Clinical Neuroscience 神経系のトランスポーターupdate -トランスポーターの基礎「カリウム」-	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 難聴の予防および/または治療用医薬組成物	発明者 永田 龍、日比野 浩、森 泰生、澤村 晴志朗、任 書晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-193880	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	日比野 浩 (Hibino Hiroshi)	新潟大学・医歯学系・教授	
研究協力者	任 書晃 (Nin Fumiaki)	新潟大学・医歯学系・准教授	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永森 收志 (Nagamori shushi)	奈良県立医科大学・生体分子不均衡制御学共同研究講座・教授	