

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19591978
 研究課題名（和文） 蝸牛有毛細胞の感覚毛能動運動による音伝達機構増幅のメカニズム
 研究課題名（英文） Mechanisms of auditory transmission amplifier by active movement of hair bundle in cochlear hair cells.
 研究代表者
 君付 隆（KIMITSUKI TAKASHI）
 九州大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：50240908

研究成果の概要：

音を認知するためには、空気の音圧振動から鼓膜、耳小骨の固体振動への変換、内リンパ液への液体振動への変換、さらに内耳の音受容器（有毛細胞）から聴神経への電気信号への変換へとその伝達様式が変化していく。それぞれの過程で振動刺激の物理的減衰があるため、内因性の音増幅のメカニズムが存在するが、その中でも内耳蝸牛の音増幅メカニズムが最も重要である。従来蝸牛の有毛細胞の中で外有毛細胞がその役割を担うとされてきたが、本研究は内毛細胞も音増幅に貢献するメカニズムを有することを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：内耳、蝸牛、有毛細胞、細胞単離、感覚毛、トランスデューサー電流、カルシウム

1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛の有毛細胞は、音による機械的刺激を電気信号に変換し、聴神経へと伝播する受容器細胞である。近年、聾患者に大いなる福音をもたらした人工内耳は、この機能を人

工機器によって代行する画期的な治療であり、日本国内でも1000例以上の手術が施行されている。ところが、言語理解はある程度可能となるも、環境音や音楽等の細かい音を聴き分けることは不可能であり、さらなるQOL向

上のために今後改良していく点が多く残されている。また、一般に広く普及している補聴器についても、微細な音の変化については反映することができず、現在の聴覚生理の知識では、機器の開発を行う上でも未だに不十分な点が多い。

ところで、生理学的に内耳蝸牛は“ cochlea amplifier ”と称される音刺激をさらに増幅する正のフィードバックシステムを有することが、近年発見された。このため、微小な音刺激に対する反応や周波数分別能の向上が可能となっている。ホ乳類では内耳蝸牛の有毛細胞は外有毛細胞と内有毛細胞に分類されており、主に外有毛細胞全体が収縮能を有することにより、基底膜の運動が増強され cochlea amplifier の根源とされている。外有毛細胞膜上の運動タンパク、プレスチンも同定されている。ところが、外有毛細胞を有するのはホ乳類に限られており、その他の下等脊椎動物の cochlea amplifier の本質についてはその起源は不明であった。近年、下等脊椎動物で cochlea amplifier は有毛細胞全体の運動ではなく、音の機械的刺激を最初に感知する有毛細胞頂上部の感覚毛の能動的な運動に起因するという報告がなされた。音機械刺激で動く感覚毛に加えて、能動的な運動がさらに感覚毛を刺激し cochlea amplifier の一因となるという説である。ホ乳類においても、外有毛細胞全体の収縮能による cochlea amplifier に加えて、内有毛細胞頂上部の感覚毛の能動的運動により cochlea amplifier が行われるという、全く新しい第2のメカニズムを有する可能性がある。

2．研究の目的

下等脊椎動物で、感覚毛の能動的運動に一致した膜イオン電流を認めており、これは感覚毛の動きにより開くトランスデューサー

電流であることが証明されている。われわれは、同様の電流がホ乳類の内有毛細胞でも存在するという preliminary な報告を行った（2001年）。しかしこの報告は電流の形状が相似するというもので、トランスデューサー電流に特徴的なカルシウムの影響やブロッカーの影響についての詳細は言及できていない。本研究では、急速細胞外還流法によりカルシウム濃度を制御、またアミノ配糖体抗生物質などトランスデューサー電流に特異的に作用する薬剤の影響を調べ、以前報告した電流が一般的なトランスデューサー電流と同様の生理学的特性と一致するか研究する。

初年度経費にて実体顕微鏡を購入、細胞単離に関する研究を行った。次年度にトランスデューサー様電流の Ca 依存性に関する研究を行ったため、「3．研究の方法」「4．研究成果」ともに項目を分けて以下記載する。

3．研究の方法

(1) 細胞単離に関する研究

操作は全て無カルシウムの標準外液を用いる。組成は次のとおりである（mM）。142 NaCl ; 4 KCl ; 3 MgCl₂ ; 2 NaH₂PO₄ ; 8 Na₂HPO₄ ; NaOH にて pH 7.4 に調整。浸透圧は D-glucose にて約 320 mOsm に調整する。あらかじめ酸素にて標準外液をバブリングすることもあるが、単離される細胞の数や生存状態はそれほど変わらないようである。200 - 300 g のモルモットを麻酔後に断頭し、中耳骨包を取り出す。取り出した骨包は全体を溶液内に浸す必要はなく、上記の無カルシウム外液を浸したキムワイプやガーゼ等で包んでおき、冷蔵庫に保存すれば数時間は持つ。骨包を開け、蝸牛壁に囲まれた蝸牛が頂回転から基底回転、蝸牛窓まで全体が明視下におけるようにする。アブミ骨等の耳小骨は摘出した方が、

その後の操作がやりやすい。

ここで蝸牛（骨包）を無カルシウム外液内に浸し、以後の操作は実体顕微鏡下にて行う。蝸牛骨壁を慎重にはずしていき、各回転が明視下におけるまで手前の蝸牛骨壁を切除する。われわれは蝸牛窓に 11 番の尖メスの先を軽く挿入、基底回転から蝸牛壁の骨を少しずつ頂回転方向へ割っていくように壁を切除している。蝸牛周囲の 3 分の 2 程度の蝸牛壁が切除できたら、ここで蝸牛軸の根元をメスにて切断し、蝸牛神経の一部とともに骨ラセン板 (osseous spiral lamina), 基底板、ライスネル膜を一体として蝸牛を摘出する。この段階で、血管条が蝸牛骨壁や骨包の方に残ることがあるが、血管条の細胞を研究の目的としない限りは問題ない。

次にコルチ器、基底板を骨ラセン板よりはずしていく。我々は骨ラセン板をピンセットにて左手で固定、27 番の注射針を使って利き手にてコルチ器、基底板を切離している。操作中の振動等で自然にコルチ器、基底板が骨ラセン板よりはずれていることがあるが、内柱細胞 (inner pillar cell) と外柱細胞 (outer pillar cell) の間のコルチトンネルよりはずれていることが多く、内有毛細胞は骨ラセン板の方に残ってしまう。内有毛細胞の単離を目的とする時は、骨ラセン板の骨のなるべく近くを操作し、内有毛細胞、外有毛細胞を共に含めて採取する必要がある。特に内有毛細胞の単離手技は困難で慎重な操作を必要とし、単離方法についてのみ記載した報告も認められる。2 本のピンセット (forceps) を用いる方法や、細いタングステン電極をマイクロマニプレータを用いて操作する方法が提唱されている。

切離したコルチ器、基底板より各々の細胞を単離する方法として、物理的 (機械的) 単離法、凍結単離法などが試されたが、タンパ

ク分解酵素を用いる方法が最も優れている。我々は、タンパク分解酵素によりある程度細胞間の結合をはずした後に、機械的にパイペッティング (trituration) することで最終的に細胞の単離を行っている。取り出したコルチ器、基底板を細かく短冊状に切断し、0.5 mg/ml のトリプシン (trypsin, T-4665, Sigma) を溶かした無カルシウム標準外液にピペットで移し、室温にて 10~12 分間置いておく。外有毛細胞やダイテルス細胞のみの単離であれば、細胞周囲が疎で細胞同志の結合が少ないため、タンパク分解酵素を用いなくても機械的パイペッティングのみで単離可能である。パイペッティングは、尖端径が約 0.7mm のチップを用い 80 μ l にて 10 回程程度行う。その後カルシウムを含む通常の標準外液で灌流を開始し、溶液中のタンパク分解酵素を洗い流す (wash out)。標準外液の組成は次の通りである (mM)。142 NaCl ; 4 KCl ; 1 CaCl₂ ; 2 MgCl₂ ; 2 NaH₂PO₄ ; 8 Na₂HPO₄ ; NaOH にて pH 7.4 に調整。浸透圧は D-glucose にて約 320 mOsm に調整する。

タンパク分解酵素が洗い流される時間と細胞がチェンバーの底に沈むまでの時間を考慮し、約 10 分間待って実験を開始する。パッチクランプ法にて電極を細胞に当てる場合や、イメージングの実験で細胞を十分に固定する必要がある場合、あるいは細胞外の局所的な灌流法にて細胞が動く可能性がある場合は、4 mg/ml の Concanavalin-A (C-2010, Sigma) をチェンバー底のカバーガラスにコーティングし、細胞が十分に底に固定するようにしている

(2) トランスデューサー様電流の Ca 依存性に関する研究

成熟した白色モルモット (200-350g) を頸椎脱臼させ、中耳骨包を取り出した。コルチ器は、無 Ca 溶液中で細針を用いて分離し、

記録用チャンバーに移してトリプシン (1mg/ml、T-4665、Sigma) にて 12 分間処理した。さらに機械的にパイペティングを行い、細胞を単離した。酵素は、実験開始前に少なくとも 10 分間の標準外液を灌流させることにより洗い流した。内有毛細胞 (IHC) の形状はフラスコ様で、核は中央に位置し、ミトコンドリアの点在を認めた。以前報告されているように、IHC を確認するために最も重要な指標は細い頸部が存在することと、クチクラ板と細胞の軸の間の角度が斜めになっていることである。

細胞外標準液は、以下のとおりである (mM): 142 NaCl; 4 KCl; 2 MgCl₂; 1 CaCl₂; 2 NaH₂PO₄; 8 Na₂HPO₄; NaOH で pH 7.4 に滴定。Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphate, 8-Bromo-, Sodium Salt (8-Br-cAMP, 203800, Calbiochem) は、細胞外標準液に溶かした。パッチ電極溶液は以下の通りで、K 電流を抑制するため Cs ベースとした (mM): 144 CsCl; 2 MgCl₂; 1 NaH₂PO₄; 8 Na₂HPO₄; 0.5 EGTA; CsOH で pH 7.4 に滴定。

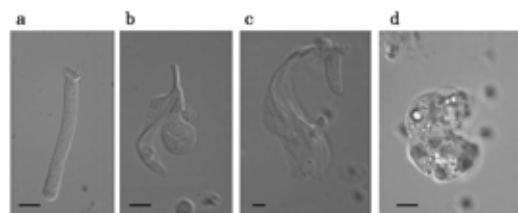
膜イオン電流記録は、EPC-8(HEKA, Lambrecht, Germany)を使用し、conventional whole-cell voltage-clamp 法にて測定した。データ解析は、ソフトウェア PULSE/PULSEFIT (HEKA, Lambrecht, Germany)により行った。パッチ電極は、1.2mm のホウケイ酸ガラス (GC-1.2, Narishige, Tokyo, Japan) を使用し、2-段引きした。パッチ電極抵抗は 5-8MΩ で、電気容量を抑えるためにスキー・ワックス (Tour-DIA, DIAWax, Otaru, Japan) を被覆させた。細胞の電気容量は 10.5 ± 3.8pF (n=11) で、シリーズ抵抗は 21.8 の ± 9.5 MΩ (n=11) であった。細胞外液は持続的に灌流させ、実験はすべて室温 (20-25℃) で行った。

4 . 研究成果

(1) 細胞単離に関する研究

蝸牛より単離された細胞を図 1 に示す。形態にて同定可能な細胞は外有毛細胞、内有毛細胞、ダイテルス細胞、ヘンゼン細胞である。外有毛細胞 (図 1 a) はシリンダー型の細長い細胞で、核は底部に存在する。最上部 (蓋板、クチクラ) に感覚毛を認めるが単離細胞では疎らになっていることが多い。回転別で形態が異なり、基底回転は短く頂回転では細長い。内有毛細胞 (図 1 b) はフラスコ型で、蓋板の直下の頸部がやや細くなっており核は細胞のほぼ中央に存在する。感覚毛は外有毛細胞と比較すると束状に残っており、はっきりと観察される。底部が腫脹し内部構造がはっきりしないことも多いが、細胞膜自体の特性は変化しない。外有毛細胞とは異なり回転別の形態の差は明確に認めない。ダイテルス細胞 (図 1 c) は有毛細胞と比較して大きく、外有毛細胞を支えるアーチ状の形態が保たれている。他の細胞と比較して内部構造が少なく、全体として明るく見える。ヘンゼン細胞 (図 1 d) は完全に単離されていることは少なく、いくつかの細胞がまとまって観察されることが多い。形態は円形に近く、内部に脂肪滴 (lipid inclusion) を有しているのが特徴である。

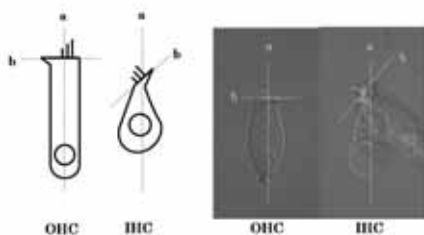
図 1



基底回転の外有毛細胞は短く、さらに膨化すると一見内有毛細胞のように見えることがある。鑑別として、1) 内有毛細胞は蓋板

直下の頸部が細くくびれて見えるが、外有毛細胞は底部から蓋板までそのくびれを認めない、2) 感覚毛が外有毛細胞は疎らで先端に向かって開いているが、内有毛細胞では束状にはっきりと観察されることが多い、3) 内有毛細胞の方が細胞内の構造が密に見える、などがあるが、最も確実な区別は次の特徴と考えている。すなわち、細胞の長軸(図2 a)と蓋板の傾き(図2 b)が、外有毛細胞ではほぼ直交するが、内有毛細胞では斜めの関係である。そのため外有毛細胞では感覚毛が上に向かって突出しているが内有毛細胞では斜めに突出しているように見える。この性質は、種々の条件で細胞の形態が大きく変化しても最後まで変わることはない。

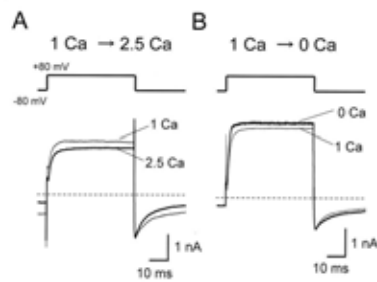
図2



(2) トランスデューサー様電流の Ca 依存性に関する研究

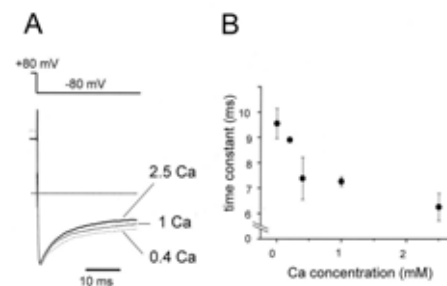
単離した内有毛細胞の感覚毛をフリースタンディングの状態として、-80mV の保持電位から+80mV のパルス状の刺激電位を与えた。脱分極刺激は定常的な外向き電流を惹起し、再分極は一過性的な内向き電流を発生させた(図3)。陽性パフ・にて細胞外 Ca^{2+} 濃度を 1mM から 2.5mM まで交換すると、外向き電流値は減少し、内向き電流の減衰速度が増加した(図3 A)。一方、1mM から 0mM への Ca^{2+} 濃度の減少は、外向き電流値の増加と、内向き電流の減衰速度の減少を引き起こした(図3 B)。

図3

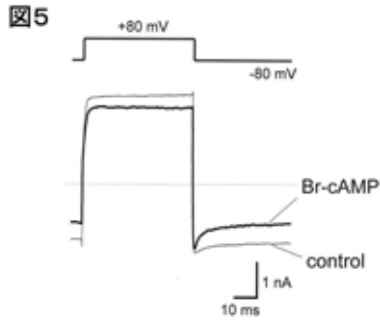


-80mV に再分極した際の内向き電流の減衰過程は、単指数曲線にてフィッティングできた(図4 A)。この減衰過程の時定数を Ca^{2+} の濃度に対してプロットすると(図4 B)、 Ca^{2+} 濃度が増加するに従って時定数が減少することがわかった。

図4



cAMP (感覚毛で合成酵素が報告されている)は、トランスデューサ電流において電流変位曲線に影響を及ぼし、また細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることが知られている。cAMP アゴニストである 8-Br-cAMP の作用を図5に示した。0.1mM の 8-Br-cAMP 投与により、外向き電流値は抑制され、内向き電流の順応速度を増加させた。これらの変化は、高 Ca^{2+} 溶液投与による変化(図3 A)と類似していた。



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3件)

T Kimitsuki, A Nawate, Y Kakazu, N Matsumoto, K Takaiwa, N Komune, T Noda, S Komune: Inactivating potassium currents in apical and basal turn inner hair cells from guinea-pig cochlea. Brain Res 1228: 68-72, 2008, 査読あり

君付 隆 : 形態と細胞機能の研究手法 - 単離細胞実験法 - . Equilibrium Research 64(3) : 161-169, 2008, 査読あり

T Kimitsuki, Y Kakazu, N Matsumoto, T Noda, N Komune, S Komune: Salicylate-induced morphological changes of isolated inner hair cells and outer hair cells from guinea-pig cochlea. Auris Nasus Larynx (in press), 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

君付 隆、蝸牛内有毛細胞のシナプス小胞動態. 第108回日本耳鼻咽喉科学会学会学術講演会. 2007年5月17-19日 金沢市.

君付 隆、感音難聴の程度による各内耳機能検査の陽性率の比較. 第52回日本聴覚医学会総会ならびに学術講演会. 2007年10月4-5日 名古屋市.

君付 隆、蝸牛有毛細胞トランスデューサー電流に対するアミノ配糖体系抗生物質の作用 細胞内への取り込みについて . 第17回日本耳科学会総会学術講演会. 2007年10月18-20日 福岡市.

君付 隆、内耳蝸牛の内有毛細胞 I_{k,n} 電流について. 第109回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会. 2008年5月15-17日 大阪市.

君付 隆、聴覚過敏患者における内耳機能検査の特徴. 第53回日本聴覚医学会総会ならびに学術講演会. 2008年10月2-3日 東京.

君付 隆、モルモット蝸牛内有毛細胞カリウム電流の不活性化過程 - 回転別による差異 - . 第18回日本耳科学会総会学術講演会. 2008年10月16-18日 神戸市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

君付 隆 (KIMITSUKI TAKASHI)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50240908

(2)研究分担者

松本 希 (MATSUMOTO NOZOMU)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 60419596

(3)連携研究者

なし