

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ~ 2008  
 課題番号：19790188  
 研究課題名 (和文) 実験・計算科学を駆使した内耳内リンパ液における高電位・高カリウムの成立機構の解明  
 研究課題名 (英文) Analyses of the mechanism underlying high potential and potassium in cochlear endolymph by experimental and computational approaches  
 研究代表者  
 日比野 浩 (HIBINO HIROSHI)  
 大阪大学・医学系研究科・准教授  
 研究者番号：70314317

研究成果の概要：内耳蝸牛の内リンパ液は、+80 mV の高電位を示す。これは聴覚機能の維持に必須の要素である。以前より、高電位の成立には、上皮組織の血管条を介したカリウム輸送が深く関わりと予想されてきたが、そのメカニズムは長年に渡り不明であった。本研究によって、内リンパ液の高電位は、血管条の異なったカリウムチャネルによって発生する2つの拡散電位と電氣的隔絶状態により、主に成立することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：聴覚、蝸牛、高電位、カリウム、血管条、実験科学、シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

聴覚は動物に不可欠な感覚機能であり、内耳蝸牛という末梢器官で受容される。日本には、現在、約600万人もの内耳性の聴覚障害患者が存在しており、病態の解明と治療法の開発が急務であるが、殆ど進んでいない。その基盤となる内耳の基礎研究も、他の研究分野に比べて大きく遅れている。

蝸牛の有毛細胞は、音の一次受容器であり、頂上膜に感覚毛を持つ。感覚毛は、内リンパ液という特殊な液体に触れている。この液は細胞外液でありながら、**150 mM のカリウムイオン(K<sup>+</sup>)**を含み、**+80mV の高電位**を持つ(図1A)。この環境は、他の臓器には

認められず、蝸牛に特異的なものである。内リンパ液のK<sup>+</sup>は、音刺激により、感覚毛の頂部に局在する機械感受性チャネルを介して、有毛細胞へ流入しそれを興奮させる。これが音伝達の端緒となり音は中枢へ伝わる。有毛細胞の細胞体は、通常の細胞外液と同じイオン組成を持つ外リンパ液に浸されており、その静止膜電位は-60 mVである。内リンパ液の高電位は、有毛細胞へのK<sup>+</sup>流入の駆動力を増大し、聴覚の音に対する高い感受性の成立に貢献している。よって、内リンパ液が高電位・高K<sup>+</sup>であることは、聴覚機能に必須の要素であり、その破綻が難聴の病因の一つであると指摘されている。

以前より、高電位・高 $K^+$ の成立には、**蝸牛側壁の線維細胞群（螺旋靱帯）・上皮細胞群（血管条）**を介した、外リンパ液から内リンパ液への **$K^+$ 循環**が重要であるとされてきた（図 1A）。特に**血管条**は、 $K^+$ 循環を駆動し、内リンパ液の環境の維持に中心的な役割を果たしていることが報告されてきた。また、その循環には、蝸牛側壁に分布する種々の $K^+$ 輸送装置が深く関与すると考えられており、近年、徐々にその分子実体が明らかとなってきた。研究代表者らは、これまでに、内向き整流性 $K^+$ チャネル Kir4.1 が血管条に強く分布し、高電位の成立に不可欠であることを見出した（Hibino et al., J Neurosci, 1997）。Kir4.1 を欠損したノックアウトマウスでは高電位が欠如することから（Marcus et al., Am J Physiol, 2002）、このチャネルは蝸牛 $K^+$ 循環を支える根源的分子と考えられた。しかし、内リンパ液の高電位・高 $K^+$ の成立機構は、十分に理解されていなかった。

$K^+$ 循環および内リンパ液環境の維持に不可欠な血管条は、**辺縁細胞・中間細胞・基底細胞**という3種の細胞で構成される上皮系組織である（図 1B）。辺縁・中間細胞で挟まれた「**血管条細胞外空間**」は、特殊化された電位環境を有する。即ち、**低 $K^+$ であるが、+90 mV の高電位**を示す（図 1B）。この電位が内リンパ液の高電位の起源と予想されていた。研究代表者ら及び他のグループにより、**① $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  共輸送体・ $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase** が辺縁細胞の基底側膜に局在し、内リンパ液の高電位成立に不可欠であること、**②中間細胞及び、それとギャップ結合で繋がる基底・線維細胞の電位は、約-5 mV であること、③ Kir4.1 が中間細胞の頂上膜に豊富に分布し、 $K^+$ チャネル阻害剤である  $Ba^{2+}$ を血管条に投与すると Kir4.1 の機能が抑制されることで内リンパ液の電位が大きく降下すること**（Hibino et al., J Neurosci, 1997; Ando & Takeuchi, Cell tissue Res, 1999）、が明らかとなってきた（図 1B）。

一方で、蝸牛に発現し、 $K^+$ 循環に関わると考えられる幾つかのイオン輸送装置の遺伝子異常が、一部の内耳性難聴の原因となることが報告されてきている。これらの病態生理機構の解明が、疾患の病因理解や新しい治療法の開発に結びつくことは必至である。

以上のような状況にも関わらず、諸分子が、どのように統合され蝸牛機能に関わり、内リンパ液の特殊環境が成立するかの詳細は、大部分が明らかにされていなかった。また、輸送装置の障害がどのような機序で病態を誘引するかは、殆ど解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

上記の背景をふまえ、本研究では、内リンパ液の高電位・高 $K^+$ の成立機構の総合的な解明を目的として、1)種々の実験的手法を用いて、蝸牛 $K^+$ 動態を正確に評価すること、2)測定した数値を元に蝸牛 $K^+$ 循環をコンピューターでモデル化した上で、定量的に内リンパ液環境の成立機構を理解することを計画した。更に、3)蝸牛 $K^+$ 循環に関わる機能分子を *in silico* で破綻させて惹起する病態を予測し、原因不明の聴覚疾患の病因解明や診断・治療法の開発、薬剤の効果や副作用の事前評価を可能にするシステムの構築を目指した。第一に、内リンパ液の高電位の成立機序を解析した。

## 3. 研究の方法

申請者らは、 $K^+$ 選択的イオン電極（二連管）をサブマイクロメーターのオーダーで、生動物（モルモット）の蝸牛側壁へと進めることで、血管条の細胞内外の微小区分の $K^+$ 濃度・電位を測定し、同時に別の電極で内リンパ液の電位変化を経時的に直接観察する系を確立した。また、動物の椎骨動脈へカテーテルを留置し、 $K^+$ 輸送装置に対する種々の阻害薬を血管条の血管へ還流することで、 $K^+$ 輸送装置の機能的役割を *in vivo* で解析した。更に、イオン電極に通電することによって、組織の抵抗値を測定した。

シミュレーションについては、得られた実験データと文献的な知見を基にして、MATLAB を用いて、蝸牛側壁の各微小区分の $K^+$ 濃度と電位の動態を再現した。

## 4. 研究成果

### (1) 実験的手法による検討

以下の結果を得た（図 2）。

① 低酸素負荷・ブメタニドの血管条投与で各々 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase・ $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  共輸送体を阻害すると、内リンパ液の電位低下に呼応して、血管条細胞外空間の $K^+$ 濃度は上昇し、電位は下降する。

② ①と同じ負荷により、辺縁細胞内の $K^+$ 濃度が大きく低下し、辺縁細胞の頂上膜を介した電位差が増大する。

③ 無酸素負荷における中間細胞内、内リンパ液の $K^+$ 濃度は不変である。また、中間細胞の電位は、-5 mV という過去の報告とは異なり、どの条件においても、+4 mV 程度に固定されている。

④  $Ba^{2+}$ を血管条に投与すると、蝸牛側壁の各微小区分の $K^+$ 濃度は殆ど変化しないが、血管条細胞外空間の電位は大きく下降する。

⑤ イオン電極で血管条細胞外空間を同定し、その部分の抵抗値を測定すると、血液・内リンパ液・外リンパ液より著明に高い値を示す。

①より、血管条細胞外空間の高電位は、内リンパ液高電位の主要因であることが

判明した。中間細胞の頂上膜には  $K^+$  チャンネル以外のチャンネルは多く発現しておらず、③より中間細胞の電位は +4 mV であるので、血管条細胞外空間の高電位は、主に、④から、中間細胞頂上膜の  $K^+$  チャンネル、即ち Kir4.1 を介した拡散電位よりなると示唆される (図 1B)。更に、辺縁細胞の基底側膜には、 $K^+$  チャンネルが殆どない一方で、頂上膜には  $K^+$  チャンネル KCNQ1/KCNE1 が豊富に存在することが報告されていることから (図 1B)、②より、内リンパ液と辺縁細胞の電位差 (つまり辺縁細胞頂上膜を介した電位差) は、 $K^+$  チャンネルにより維持されていることが強く示唆された。実際に、無酸素時における、中間細胞、血管条細胞外空間、辺縁細胞内、内リンパ液の  $K^+$  濃度の実測値から、ネルンストの式を用いて、中間細胞頂上膜と辺縁細胞頂上膜を介した電位差を計算し、電極で測定した実測値、即ち、血管条細胞外空間と中間細胞との電位差・辺縁細胞と内リンパ液の電位差、とそれぞれ比較すると、予想値と実測値はよく合致した。よって、内リンパ液の電位は、中間細胞の電位、中間細胞頂上膜を介した電位差、辺縁細胞頂上膜を介した電位差の和で表され、後二者は主に  $K^+$  チャンネルを介した拡散電位であることが明らかとなった。

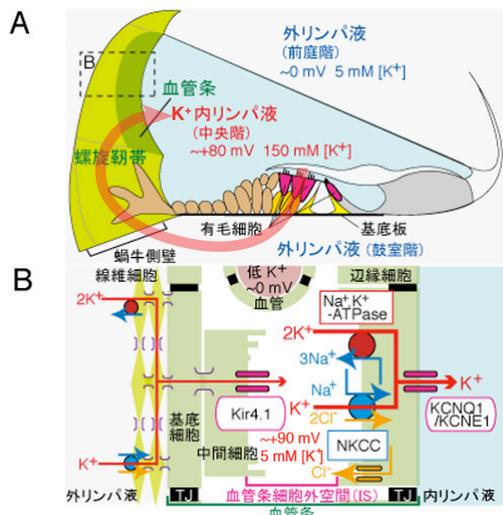


図 1 蝸牛の構造と血管条の  $K^+$  輸送装置

また、⑤より、血管条細胞外空間は、+90 mV と高い電位を保つために、隣り合う血液・内リンパ液・外リンパ液より、電氣的に隔絶されていることが示された。

血管条細胞外空間の電位の成立機序と、内リンパ液高電位における重要性は、約 20 年前に仮説として提唱されたが (Salt et al., Laryngoscope 1987)、今回の①④の

結果は、それを初めて実験的に証明するものである。更に、辺縁細胞頂上膜に発生する  $K^+$  拡散電位②と、血管条細胞外空間の絶縁性⑤も、内リンパ液高電位に深く関わっていることが明らかとなった。これは、内リンパ液高電位の全貌を、定性的にほぼ全て理解する世界で初めての研究結果であり、分野を進展させる大きな成果となった。

## (2) シミュレーションによる解析

(1) の実験結果と、過去の文献によって報告されている種々の  $K^+$  輸送装置の特性を基として、蝸牛  $K^+$  循環を組織レベルで再現し、側壁と内リンパ液の各微小区分の  $K^+$  濃度や電位を、コンピューターで再現できるシステムの基礎を構築した。今後、更に、調整して行き、例えば  $K^+$  輸送装置の遺伝子異常によって蝸牛機能にどのような影響が惹起されるか、などを検討していく。また、内リンパ液の高  $K^+$  の維持機構に関わる分子も *in silico* で予測し、実験で証明するという手法で解析したい。

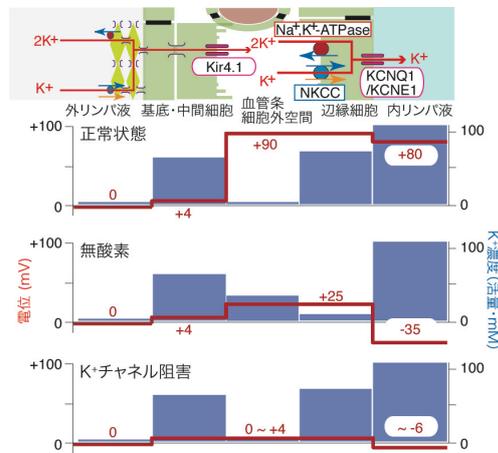


図 2 蝸牛側壁の  $K^+$ ・電位環境

## 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 1 件)

① Nin F\*, Hibino H\*, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. (2008) The endocochlear potential depends on two  $K^+$  diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(5):1751-1756. [\*: equal contributors] (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

① 且比野造. 内耳蝸牛内高電位の成立機構の解明 学術奨励賞受賞講演 第 82 回日本

薬理学会年会 平成 21 年 3 月 16 日 (月) - 18 日 (水) 発表 17 日 (火) パシフィコ横浜

②任書晃、日比野浩、村上慎吾、野村泰伸、倉智嘉久。内耳蝸牛内高電位の成立機構の in silico モデル化 ポスター発表(演者 日比野) 第 82 回日本薬理学会年会 平成 21 年 3 月 16 日 (月) - 18 日 (水) 発表 17 日 (火) パシフィコ横浜

③日比野浩、任書晃、倉智嘉久。内耳蝸牛内高電位の成立機構。シンポジウム「血管条とラセン靭帯機能の新しい展開」第 18 回日本耳科学会総会 平成 20 年 10 月 16 日 (木) - 18 日 (土)、発表 17 日 (金) 神戸国際会議場

④日比野浩、任書晃、村上慎吾、野村泰伸、倉智嘉久。内耳蝸牛内高電位 (EP) の成立機構の解析と in silico モデル化。ハイライトレクチャー。「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 20 年度第一回班会議 平成 20 年 9 月 24 日 (水) - 26 日 (金)、発表 24 日 (水) 淡路夢舞台国際会議場

⑤Fumiaki Nin, Hiroshi Hibino, Shingo Murakami, Yoshihsa Kurachi. Mechanism of formation of endocochlear potential in inner ear and its integration with modeling. Poster presentation 1<sup>st</sup> Joint Workshop on Computational Science. 平成 20 年 7 月 7 日 (月) - 8 日 (火)、発表 8 日 (月) 理化学研究所、和光研究所

⑥日比野浩、任書晃、倉智嘉久。蝸牛内高電位は内耳血管条における 2 つのカリウム拡散電位と電気的隔絶機能によって成立する。Poster presentation 第 85 回日本生理学会大会 平成 20 年 3 月 25 日 (火) - 27 日 (木) 発表 26 日 (水) 京王プラザホテル東京

⑦Fumiaki Nin, Hiroshi Hibino, Katsumi Doi, Toshihiro Suzuki, Yasuo Hisa, Yoshihsa Kurachi. The endocochlear potential depends upon two  $K^+$  diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. (Poster presentation) Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress, 2008 Feb 6, Long Beach, CA, USA

⑧日比野浩、任書晃、倉智嘉久。内耳蝸牛内高電位の成立機構。平成 19 年度生理学

研究所研究会「細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性」平成 19 年 10 月 4 日 (木) - 5 日 (金) 発表 5 日 岡崎コンファレンスセンター 小会議室

[その他]

(1)新聞掲載

①京都新聞：平成 20 年 1 月 22 日・夕刊

②中部経済新聞：平成 20 年 1 月 23 日・朝刊

③高知新聞：平成 20 年 1 月 23 日・朝刊

(2)ホームページ掲載

(社) 全日本難聴者・中途失聴者団体連合会のホームページで成果紹介。

[http://www.zennancho.or.jp/hearing\\_aid/hearing\\_aid.html](http://www.zennancho.or.jp/hearing_aid/hearing_aid.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

日比野 浩 (HIBINO HIROSHI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70314317

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：