

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 23日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592160

研究課題名（和文） 蝸牛内有毛細胞カリウム電流特性の温度依存性

研究課題名（英文） Temperature dependence of potassium currents in isolated inner hair cells from guinea-pig cochlea.

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（和文）：

成熟モルモット蝸牛から単離した内耳有毛細胞のカリウム電流の温度依存性について研究を行った。内耳有毛細胞では、脱分極の電圧パルスに対して大きな外向きのカリウム電流、過分極の電圧パルスに対しては小さな内向きカリウム電流が流れ、いわゆる内向き整流性を示した。電流の大きさは外向き電流、内向き電流ともに温度依存性を認めず、温度変化による増減の変化はなかったが、活性化と不活性化の速度は室温と比較し36℃で速くなり、Kチャネルのカイネティクスの変化が示唆された。活性化の half-maximum-time (ms、電流が最大となるまでの時間の半分値) は+10、+20、+30、40 mV で温度による差異を認めた。 $Q_{10}$  は、1.83 であった。不活性過程の時定数 (ms) は36℃では室温と比較して大きく減少しており、-20mV から+60 mV のすべての膜電位において差異を認めた。 $Q_{10}$  は、3.19 であり、不活性化の方が活性化より温度依存性が大きいことがわかった。

研究成果の概要（英文）：

The temperature dependence of potassium currents in isolated inner hair cells (IHCs) from mature guinea-pig cochlea was investigated. IHCs showed outwardly rectifying currents in response to depolarizing voltage pulses, with only a slight inward current when hyperpolarized. The amplitude of both outward and inward currents demonstrated no temperature dependency, however, activation and inactivation rates were faster at 36 °C than at room temperature. Half-time for activation was shorter at 36 °C than at room temperature at membrane potentials of -10, +10, +20, +30, and +40 mV.  $Q_{10}$  for the activation rate was 1.83. The inactivation time constant in outward TEA-sensitive potassium currents was much smaller at 36 °C than at room temperature between the membrane potentials of -20 and +60 mV.  $Q_{10}$  for the inactivation time constant was 3.19.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、内耳有毛細胞、カリウム電流、体温、活性化、不活性

1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛の有毛細胞は、音による機械的振動刺激を電気信号に変換し、聴神経へと伝播する重要な受容器細胞である。最も多い難聴である加齢性難聴や、近年明らかにされつつある遺伝性難聴の多くが内耳性難聴であり、有毛細胞の機能異常の可能性が考えられる。しかし、その解明は充分進んでおらず、有効な治療法も確立されていない。高齢化社会が進むにつれ、QOL向上のためにも内耳機能、特に蝸牛有毛細胞の生理学的特性についての研究は急務とされる。近年、聾患者に対しては人工内耳が開発され大いなる福音をもたらした。蝸牛内有毛細胞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ることが多く、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。

有毛細胞は、哺乳類では内有毛細胞と外有毛細胞が区別されているが、実際の音刺激を中枢へ伝播するのは内有毛細胞であり、受容器としての本質的な細胞である。内有毛細胞に存在する膜イオン電流は mechano-electrical transduction 電流、カリウム電流、カルシウム電流が主で、その中でもカリウム電流は細胞静止膜電位の保持、興奮刺激後の再分極（細胞のリセット）に関与しており、細胞生存のために最も重要な膜イオン電流である。内有毛細胞のカリウム電流は三種類が知られており、速い外向きの  $I_{k, f}$ 、遅い外向きの  $I_{k, s}$ 、静止膜電位付近で既に活性化されている  $I_{k, n}$  である。この中で興奮刺激後の再分極に主として関わるのは  $I_{k, f}$  であり、この速い  $I_{k, f}$  電流が細胞の素早いリセットに重要と考えられている。また  $I_{k, f}$  は不活性化特性を有し、速い反応に効率的に働いている。

これまで living cell に対して行われてきた電気生理学的研究の多くが、室温 (20-25°C) にて行われており、内有毛細胞に対しても室温での報告がほとんどである。哺乳類の生理的体温である

36°C前後での研究はほとんど行われてこなかった。そのため、特にパッチクランプ法で得られた細胞レベルでの膜イオン電流での結果を、ホ乳類で行われてきた *in vivo* の結果と直接比較できないという背景があり、両者の結果に乖離があった場合、その原因が測定温度の差異によるものか、他の原因が存在するのか決めることができないという現状があった。

## 2. 研究の目的

細胞レベルでの膜イオン電流での結果を、ホ乳類で行われてきた *in vivo* の結果と直接比較し、臨床的に蝸牛機能について検討するために、本研究ではまず実験温度を変化させるための温度コントローラを既存のパッチクランプセットに組み込んで、温度を自由に変えられる実験セットを完成させる。次に蝸牛コルチ器の内毛細胞のカリウム電流をホ乳類体温 (36°C) において記録し、室温での記録と比較検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 内毛細胞の単離とカリウム電流記録

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ッティングを行い、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。内毛細胞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 MgCl<sub>2</sub>; 1 CaCl<sub>2</sub>; 2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; NaOH で pH 7.4 に滴定。パッチ電極溶液 (細胞内溶液) は以下の通りである (mM) : 144 KCl; 2 MgCl<sub>2</sub>; 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.5 EGTA; KOH 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、1.5mm のホウケイ酸ガラス管 (GC-1.5, 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フックス (Tour-DIA, DIAWax, Otaru, Japan) を被覆させた。細胞の電気容量は  $10.1 \pm 4.1$  pF (n=28) で、シリーズ抵抗は  $14.0 \pm 4.9$  MΩ (n=28) であった。細胞外液は 2 方向のペリスタポンプにて持続的に灌流させ、蒸発による溶液のイオン濃度の変化を防いだ。

不活性化特性を有する

tetraethylammonium (TEA) 感受性のカリウム電流は、25mM の TEA (T-2265, Sigma、標準外液の 25mM の NaCl を置き換えた) 投与中の電流記録と標準外液での記録の差を求めることで再建した。TEA 溶液は先端径 2–4 μm の puff 電極に充填し、陽圧 (PMI-200, Dagon, Minneapolis, MN, USA) を加えることで与えた。

### (2) 温度調節

溶液温度は、デュアル・チャネル温度コントローラ (DTC-200, Dagon, Minneapolis, MN, USA) で顕微鏡ステージを暖めることにより調整した。温度は、細胞近くにおいた微小サーミスタにて測定した。初めは室温の細胞群

と 36°C の細胞群に分けてカリウム電流の測定を行ったが、後半では個々の細胞で 36°C から室温まで経時的に温度を変化させることにより電流を比較した。細胞が加熱による溶液の対流のため容易に動くため、チャンバード底になるべく固定された細胞を選んだ。室温から 36°C に温度を上げる際に細胞の動きが大きく、パッチ電極のずれにより記録不能となることが多かったため、多くの実験は 36°C から徐々に室温まで温度を下げる方向で温度を変化させた。

温度依存性は  $Q_{10}$  (temperature coefficient) で示し、下記の Hoff 式により計算した。

$$Q_{10} = (k_2 / k_1)^{10 / (T_2 - T_1)},$$

$k_1$  と  $k_2$  は低温度 ( $T_1$ ) と高温度 ( $T_2$ ) での各因子の値。

#### 4. 研究成果

##### (1) 生理的体温でのカリウム電流

内有毛細胞において、-60mV の保持電位からパルス状の電位を 10mV 毎に過分極から脱分極まで与え、応答するカリウム電流を記録した。室温と生理的体温 (36°C) での電流記録の 1 例を図 1 に示した。脱分極の電圧パルスに対して外向きのカリウム電流 ( $I_{k,f}$ ) が惹起、過分極化刺激では小さい内向きの電流 ( $I_{k,n}$ ) が惹起され、いわゆる外向き整流性を示した。図 1B では、内向き電流をスケールを増大させ示した。外向き電流の電流値は、温度変化による増減の変化を認めず、+110 mV の膜電位での外向き電流は、室温で  $9.2 \pm 3.8$  nA ( $n = 20$ )、36°C で  $8.5 \pm 2.6$  nA ( $n = 11$ ) であった (図 2A)。内向き電流のピーク値の大きさも、温度による変化はなく (図 1B)、-130mV の膜電位での内向き電流は、室温で  $0.63 \pm 0.37$  nA ( $n = 22$ )、36°C で  $0.68 \pm 0.34$  nA ( $n = 11$ ) であった (図 2B)。室温では、電流は直ちに増大するもそれに引き続い

て緩徐に増大する上昇相を認めた。しかし、36°C では直ちに最大の電流レベルに到達し、非常に速い活性化 (図 1A) を示した。

図 1

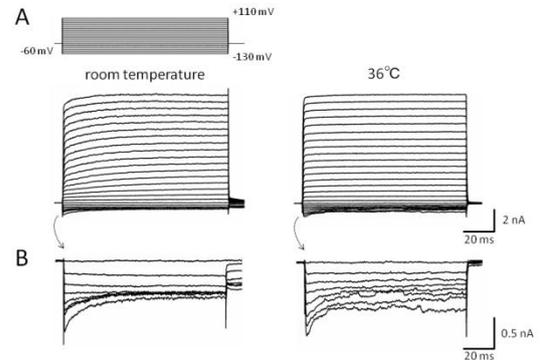
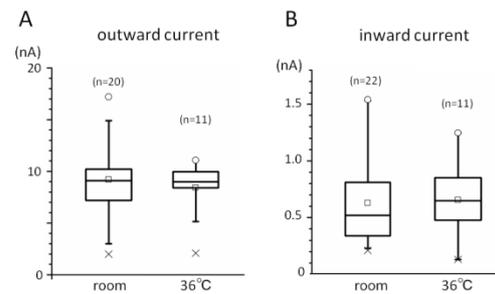


図 2



##### (2) 活性化のカイネティクスの温度依存性

+60 mV の膜電位で惹起される外向き電流の活性化過程を、ピークに達した最大電流値にてノーマライズし、35.8°C と 25.8°C におけるトレースを図 3 に重ね合わせて示した。

25.8°C の活性化の速度は生理的体温

(35.8°C) で記録した速度よりも緩徐であった。活性化のカイネティクスは膜電位に依存しており、脱分極する程速くなることが知られている。カリウム電流の活性化時間の half-time ( $t_{1/2}$ ) を室温と 36°C で測定し、各膜電位 (-20 から +60 mV まで) に対してプロットした (図 4)。活性化過程の時定数 ( $\tau$ ) は  $t_{1/2}$  と直接的に関係することが知られており、 $t_{1/2}$  による比較は妥当と考えられる。すなわち、 $-t_{1/2} = \ln[1 - (0.5)^{1/x}] \tau$  の関係である ( $x = 4$ , Hodgkin-Huxley のカリウム

チャンネルモデル ( $n^4j$ ) より)。活性化速度は、36°Cでは室温と比較してより急速であり  $t_{1/2}$  は低値であった。統計学的に (ANOVA)、-10、+10、+20、+30、+40 mV の膜電位において 36°C と室温で差を認めた。36°C の  $t_{1/2}$  は室温の  $t_{1/2}$  と比較して 1.94 倍であり (-20 から +60 mV までの平均値)、これは  $Q_{10}$  が 1.83 であることを示している (室温は 25°C として計算)。

図3

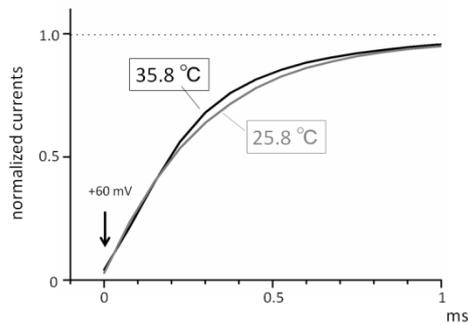
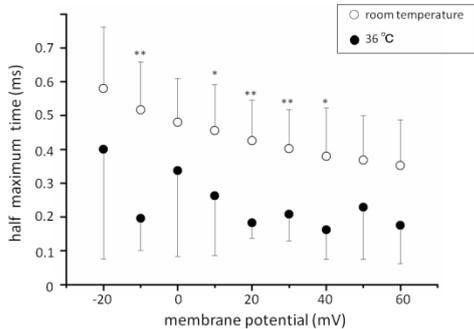


図4



(3) 不活性化のカイネティクスの温度依存性

内毛細胞の TEA 感受性カリウム電流は、速い不活性化特性を有する。不活性化過程は単指数曲線によってフィッティング可能で、その時定数は膜電位に依存している。すなわち、脱分極するほど不活性化の速度は速くなり時定数は小さくなる。TEA 感受性カリウム電流不活性化の時定数を室温と 36°C で測定し、各膜電位 (-20 から +60 mV まで) に対してプロットした (図 5)。不活性化速度は 36°C では室温と比較して非常に速く、時定数はき

わめて低値となった。全ての膜電位において大きな差異を生じ、統計学的にも有意な差を認めた。36°C の不活性化時定数は室温の 3.58 倍であり、これにより  $Q_{10}$  は 3.19 と計算された (室温は 25°C として計算)。

不活性化の程度は、電位パルスがオフとなる steady の電流値 ( $I_{ss}$ ) とピーク値 ( $I_p$ ) の比 ( $I_{ss}/I_p$ ) で表すことができる。図 6 に各電位における  $I_{ss}/I_p$  を 36°C と室温でプロットし比較した。不活性化の程度では 36°C と室温で差異を認めなかった。

図5

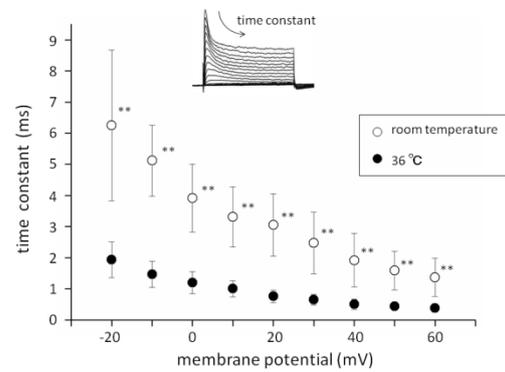
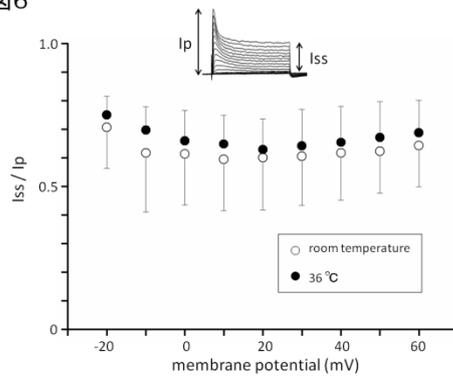


図6



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 5 件)

① Kimitsuki T, Ohashi M, Umeno Y, Yoshida T, Komune N, Noda T, Komune S:

“Effect of salicylate on potassium currents in inner hair cells isolated

from guinea-pig cochlea.”

Neurosci Lett 504: 28-31, 2011. 査読あり

- ② Kimitsuki T, Komune N, Noda T, Takaiwa K, Ohashi M, Komune S.

“Effect of hydrogen peroxide on potassium currents in inner hair cells isolated from guinea-pig cochlea.”

Neuroreport 21(16):1045-1049, 2010. 査読あり

- ③ Kimitsuki T, Komune N, Noda T, Takaiwa K, Ohashi M, Komune S.

“Property of  $I_{K,n}$  in inner hair cells isolated from guinea-pig cochlea.”

Hear Res 261: 57-62, 2010. 査読あり

- ④ Kimitsuki T, Wakasaki T, Nawate A, Komune N, Takaiwa K, Ohashi M, Komune S.

“Dihydrostreptomycin goes through the mechano-electric transduction channel in chick cochlear hair cells.”

ORL 71(3):157-162, 2009. 査読あり

- ⑤ Kimitsuki T, Kakazu Y, Matsumoto N, Noda T, Komune N, Komune S.

” Salicylate-induced morphological changes of isolated inner hair cells and outer hair cells from guinea-pig cochlea.” *Auris Nasus Larynx* 36:

152-156, 2009. 査読あり

[学会発表] (計5件)

- ① 君付 隆、サリチル酸によるモルモット蝸牛内有毛細胞カリウム電流への影響。  
第21回 日本耳科学会総会学術講演会。  
2011年11月24-26日 宜野湾市(沖縄)。
- ② Takashi Kimitsuki, Effect of hydrogen peroxide on potassium currents in inner hair cells isolated from guinea-pig

cochlea. The joint of Meeting of the 88<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan & the 116<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists. 2011年3月28-30日 横浜市。

- ③ 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—温度依存性について—。第19回 日本耳科学会総会学術講演会。2009年10月8-10日 東京。

- ④ Takashi Kimitsuki,  $I_{K,n}$  currents in isolated inner hair cells from guinea-pig cochlea. 36th International congress of Physiological Sciences. 2009年7月27-28日, 京都市。

- ⑤ 君付 隆、蝸牛内有毛細胞の  $I_{K,n}$  電流について—チャンネルブロッカーの作用—。第110回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会。2009年5月14-16日 東京。

## 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

大橋 充 (OHASHI MITSURU)  
九州大学・大学病院・医員  
研究者番号: 70529883

### (3) 連携研究者

なし