

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25年 5月15日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390047

研究課題名（和文） 内耳内リンパ液特性の生理機能の解析とその破綻に立脚した疾患の探索

研究課題名（英文） Analyses of physiological roles of cochlear endolymph and search for the diseases caused by endolymphatic dysfunction.

研究代表者

日比野 浩 (HIBINO HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：70314317

研究成果の概要（和文）：本研究では、内耳を満たす特殊な細胞外液「内リンパ液」の物性や成分の測定とその制御機構の同定、生理的意義や疾患との関連の理解を目指した。これらの目的の達成には、内リンパ液を純度良く採取することが必要である。二連管電極を用いて正確に内リンパ液を同定して採取を試みたが、十分量を得ることができなかった。内リンパ液の物性が基づく成分にイオン動態は影響する可能性がある。従って、蝸牛の K^+ 動態を詳細に実験で明らかにした。結果を基に数理モデルを構築し、イオン動態の異常で難聴が起こる可能性を理論的に示した。

研究成果の概要（英文）：In this study we focused on cochlear “endolymph”, an unique extracellular solution essential for hearing. We attempted to measure physical property and constituents of the endolymph. We also planned to elucidate physiological significance of the feature of this fluid and its involvement in hearing loss. For these purposes, we tried to purely harvest the endolymph with double-barreled microelectrode, but we could not obtain sufficient amount of the fluid. Ion-transport in the cochlea could affect structure and function of the molecules exhibiting physical property of the endolymph. We therefore analyzed K^+ -transport throughout the cochlear and demonstrated the underlying mechanism by experimental approaches. On the basis of these results, we further developed computational model to simulate cochlear K^+ -transport and the electrochemical property of the endolymph. By using this model, we theoretically showed that one form of deafness would be caused by disorder of local ion-transport in the cochlea.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：チャンネル・輸送系・感覚器・内耳・内リンパ液・イオン・粘性・難聴

1. 研究開始当初の背景

外界からの音は、外耳・中耳を経由し、内

耳の蝸牛に到達する。蝸牛は、種々の細胞と3本の管腔から構成される（図1）。それらの

管腔の中で、上下2本には通常の細胞外液である外リンパ液が、中央の管には**内リンパ液**という特殊な液体が満たされている。内リンパ液は、150 mMの K^+ 濃度と+80 mVの高電位を示す。音波が蝸牛に伝わると、まず基底板上にある有毛細胞は、音の一次受容器であり、感覚毛が分布する頂上膜のみを内リンパ液に浸している。一方で、細胞体は外リンパ液に接しているため、その静止膜電位は-60 mVである。音刺激で発生した基底板振動により感覚毛は屈曲する。その結果、内リンパ液の K^+ は、感覚毛頂部の機械刺激感受性チャンネルを介して有毛細胞へ流入し、それを電気興奮させる。内リンパ液と有毛細胞との間に生じる140 mVの大きな電位差によって、細胞への K^+ 流入は加速されている。これは、聴覚の鋭敏性に寄与している。従って内リンパ液の高 K^+ ・高電位は、聴覚機能に必須の要素である。

内リンパ液環境の成立には、内・外2層の上皮層からなる血管条が中心的役割を果たす。各層には、基底側に Na^+, K^+ -ATPaseや $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -共輸送体などの K^+ 取込み体が、頂上側に K^+ チャンネルが分布する(図2)。内リンパ液高電位については、血管条を介した内リンパ液 - 外リンパ液間の K^+ 循環(図1)や、2層に挟まれた15 nmと狭い血管条の細胞外空間(Intrastrial space: 以下IS)で観察される+90 mVの高電位(図2)が関与するとされてきたが、その成立機構は約半世紀に渡り殆ど不明であった。研究代表者は、本課題より以前の研究において、 K^+ 濃度・電位を同時測定できる K^+ 選択的イオン電極を血管条の各微小区分や内リンパ液に挿入し、種々の条件下でそれらパラメータを測定する実験を行い、内リンパ液高電位の成立機構の解明を目指した。その結果、①ISの高電位が内リンパ液高電位の主要素であること、② K^+ 取込み体により低く保たれるISの K^+ と、外層内の高い K^+ の間に濃度差があるため、外層の頂上膜で K^+ チャンネルKir4.1が大きな K^+ 拡散電位を発生し、それがISの高電位の実体であること、③内層の頂上膜で K^+ チャンネル I_{Ks} が発生する K^+ 拡散電位も内リンパ液高電位に貢献すること、を見出した(PNAS 2008; 図2, 最上段)。故に、内リンパ液高電位は、血管条に発生する2つの K^+ 拡散電位と、その電氣的バリア機構に依存すると結論づけられた。しかし、蝸牛 K^+ 循環との有機的関係は不明のままであった。

実験の途中で、外リンパ液に比べて内リンパ液は比較的粘性が高いことに気づいた。内リンパ液は高分子ヒアルロン酸や免疫グロブリンを豊富に含むため、粘性がある程度高いと予想できる。例えばヒアルロン酸は、含有イオンの濃度により、その保水量や物性を変化させる。内リンパ液の物性は、基底板上

を伝わる音振動に影響しうるはずであるが、内耳における生理的意義は明らかではない。また、上記成分以外の内リンパ液のタンパク質や脂質などの組成については、十分に明らかではない。さらに、これらの内リンパ液の特性が聴覚に重要であるとすると、その破綻で内耳疾患が惹起されると予想される。しかし、その視点からの研究は全くない。

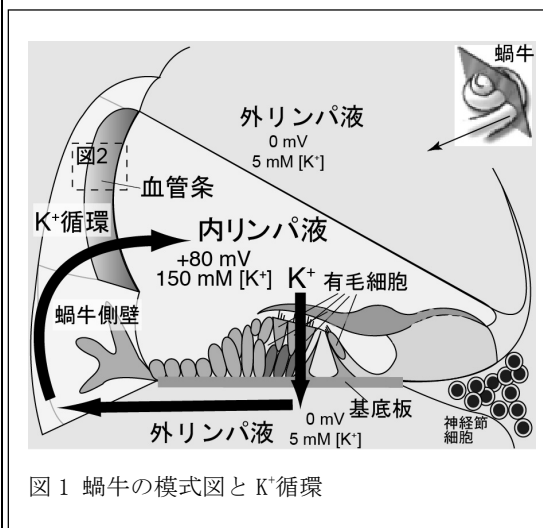


図1 蝸牛の模式図と K^+ 循環

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では、まず、内リンパ液の特性に注目し、①内リンパ液の物性の測定と制御機構・生理的意義の理解、②未知の内リンパ液成分の同定とその役割の解明、を計画した。さらに、③内リンパ液の特性の破綻に基づく疾患を探索する研究も設定した。上記のとおり内リンパ液の物性にも関わると予想される蝸牛のイオン動態も重点的な研究対象とした。実験・計算科学を融合して理論的かつ統合的な理解を目指した。

3. 研究の方法

(1)内リンパ液の高純度採取

内リンパ液の物性測定や成分同定のためには、最初に内リンパ液を純度よく採取することが必要である。そのために、先端の直径を1~2 μm に細くした二連管電極を作製し、使用した。二連管の一方は電極として使用した。もう一方の先端は空とし、末端には微小吸引器を装着した。実験には、全身麻酔薬(ネンプタール: 30 mg/kg)と筋弛緩薬(バクロニウム: 4 mg/kg)の投与下にて人工呼吸を施した健康な雌のモルモット(200~400 g)を用いた。

(2)パッチクランプ法

内リンパ液成分は、内リンパ液のイオン動態を制御するイオンチャンネルに影響することも考えられる。その電気生理学的解析の予

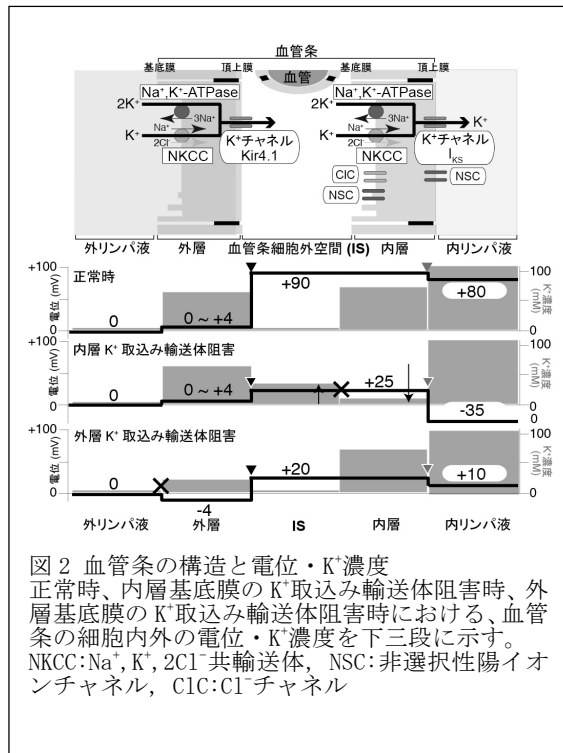
備実験のため、深麻酔で処理した BN ラット (200 g) の血管条を単離し、内リンパ液に直接接する内層の頂上膜へパッチクランプを行った (Axopatch 200B, Axon 社)。

(3) *in vivo* 電気生理実験

ヒアルロン酸の立体構造に影響して物性を変化させる可能性がある蝸牛イオン輸送の詳細な解析を行うため、生動物を使った電気生理実験を行った。(1)と同様に麻酔処置したモルモットの蝸牛に、 K^+ 輸送体を阻害する薬物を細いチューブにより灌流した。それと共に、 K^+ 濃度と電位を同時測定するための K^+ 選択的イオン電極 (以降、 K^+ 電極) を蝸牛側壁から内リンパ液へと挿入した (図 1)。

(4) 数理モデルの構築

内リンパ液のイオン動態と液体物性の関係を理論的に理解する準備として、蝸牛イオン輸送の数理モデルを作製した。内層・外層それぞれの基底膜・頂上膜に発現するイオンチャンネルやイオン輸送体などの輸送分子の機能を数式で表し、それを直列で繋ぐことによって、血管条を介した K^+ の一方向性輸送を表現した (図 3)。さらにそれを、有毛細胞における K^+ 輸送と連結させ、蝸牛全体を巡る K^+ 循環をコンピュータ上に再現した (図 3)。



4. 研究成果

(1) 内リンパ液の高純度採取

二連管を外リンパ液から蝸牛側壁を介して内リンパ液へと進めた。電極側で電位をモ

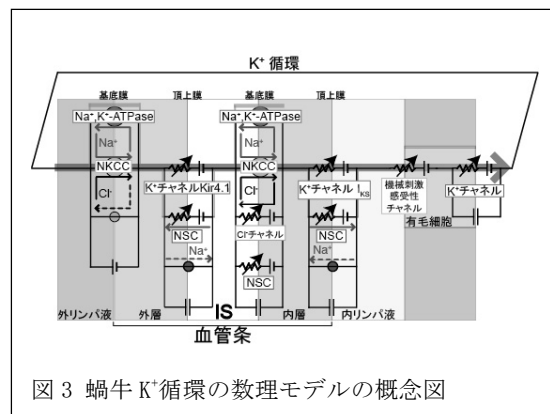
ニターすると、内リンパ液に到達した時に約 +80 mV の高電位が測定された。これを指標にして二連管を固定し、もう一方の管を介して内リンパ液の採取を試みた。しかし、蝸牛側壁を二連管が通過する際に、相当量の外リンパ液が採取管へと混入してしまうことが判明した。得られた内リンパ液の量も非常に少なく、成分分析が不可能であった。

(2) パッチクランプ法による血管条の解析

血管条ではイオン輸送が豊富であり、内リンパ液へとイオンが運搬される。内リンパ液の各種成分は、この液体が接する内層頂上膜のイオン輸送分子の機能に影響すると考えられる (図 2)。この調節機構が、さらに内リンパ液の物性へ働きかける可能性もある。内層の頂上膜のイオンチャンネルを同定するため、ラット血管条を物理的に単離し、チャンバーへ固定した。頂上膜側を顕微鏡下で確認後、パッチクランプを施行したところ、非選択性イオンチャンネルの電流を同定した (図 2)。

(3) *in vivo* 電気生理実験

蝸牛側壁の外層基底膜に分布する K^+ 輸送体がどのように機能しているか、またどのように内リンパ液の特性の成立に寄与しているかは長年不明であった。これは、内リンパ液の物性の制御機構の観点からも重要である。そこで、生モルモットを対象に電気生理実験を行った。まず、正常状態の外層を検討するため、 K^+ 電極を外リンパ液から進め、外層を通過させた。一方で、外リンパ液腔に挿入したチューブより K^+ 輸送体阻害薬を投与した個体に対しても同様な実験を行い、結果を比較した。正常状態では高濃度を示す外層の K^+ が、輸送体の阻害により、大きく減少することが判明した (図 2, 最下段)。IS と外層内の K^+ 濃度は変化しないため、結果として、外層頂上膜の K^+ 拡散電位が縮小し、内リンパ液の電位が降下することが明らかとなった。これは、外層基底膜の輸送体を介して血管条の K^+ 一方向性輸送が達成されていることの、直接的な初めての証明である。



(4) 数理モデルの構築

3. の(4)で示した方法により、蝸牛イオン輸送の数理モデルを構築した (PNAS 2012: 発表論文④)。コンピュータ上で、正常状態の内リンパ液や血管条の電位・イオン濃度の実験値が、ほぼ再現された。無酸素により病的状態を動物に負荷した際、ISのK⁺濃度の上昇と外層内のK⁺濃度の低下が実験では観察され、その結果、内・外層頂上膜のK⁺拡散電位が変化して、内リンパ液の電位降下が起こり、難聴となる(図2, 下から二段目)。コンピュータシミュレーションを行うと、この内・外層のイオン濃度変化は、血管条のK⁺一方向性輸送が駆動する蝸牛K⁺循環が深く関わっていることが理論的に示された。また、上記(3)の実験結果も数理モデルで再現され、その表現系もK⁺循環電流に依存することが明らかとなった。さらに、遺伝性難聴の病態生理も示された。内層基底膜に分布するCl⁻チャンネル(図2, 最上段)の遺伝子異常で内リンパ液の電位の低下が起こり、難聴が惹起されると推察されている。シミュレーションでCl⁻チャンネルの電流量を0.1%にすると、同じ膜上にある非選択性陽イオンチャンネルに異常な電流が流れ(図2, 最上段)、それによって、膜を介した電位降下が生じることが判明した。その結果、内リンパ液のイオン環境の変化も誘引され、内リンパ液の物性に影響する可能性も考えられた。

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10件)

- ① 日比野 浩、池田 勝久. (2013) 革新的難聴治療の夜明け 序文. 日本薬理学雑誌 141: 183. (査読無し)
- ② 任 書晃、日比野 浩、倉智 嘉久 (2013) 数理モデルによる内耳蝸牛内イオン・電気環境の再現. 日本薬理学雑誌 141: 224. (査読無し)
- ③ 日比野 浩、任 書晃、村上 慎吾、土井 勝美、鈴木 敏弘、久 育男、倉智 嘉久 (2013) 内耳内リンパ液の特殊電位環境の成立機構の理解. 日本耳鼻咽喉科学会会報 116: 60-68. (査読無し)
- ④ Nin F, Hibino H[#], Murakami S, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y[#] (2012) Computational model of a circulation current that controls electrochemical properties in the mammalian cochlea. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(23):9191-9196. [[#]: equal corresponding authors] DOI: 10.1073/pnas.1120067109 (査読有り)

- ⑤ Fukuda J, Goda M, Fujimoto C, Ikezono T, Nakagawa T, Hibino H, Kitamura Y, Abe K, Tamura K, Takeda N (2012) A case of suspected perilymphatic oozer with CTP-positive cerebrospinal otorrhea. *Otol Jpn* 22(3):274-279. (査読有り)
- ⑥ 日比野 浩 (2011) 内耳における音伝達機構. 新潟市医師会報 489:1-9. (査読無し)
- ⑦ 日比野 浩、任 書晃、山口 聡一郎、倉智 嘉久 (2011) 内リンパ液の電位・イオン環境と聴覚. *Clinical Neuroscience* 29(12):1344-1347. (査読無し)
- ⑧ 日比野 浩 (2011) 内耳を満たす特殊液体の電位環境の成立機序. 新潟医学会雑誌 125(6):295-301. (査読無し)
- ⑨ Mitsuma T, Tani K, Hiroaki Y, Kamegawa A, Suzuki H, Hibino H, Kurachi Y, Fujiyoshi Y (2010) Influence of the cytoplasmic domains of aquaporin-4 on water conduction and array formation. *J Mol Biol* 402(4):669-681. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.07.060 (査読有り)
- ⑩ 日比野 浩 (2010) 内耳内リンパ液高電位の成立機構の解析. 新潟県医師会報別冊 723:1-7. (査読無し)

[学会発表] (計12件)

- ① 吉田 崇正、任 書晃、足立 直子、山口 聡一郎、倉智 嘉久、日比野 浩 内耳機能に重要な蝸牛外側壁の電気化学的解析ポスター発表: 第90回日本生理学会大会 平成25年3月27日(水)~29日(金)、発表27日(木)、タワーホール船堀、東京
- ② 吉田 崇正、任 書晃、足立 直子、山口 聡一郎、倉智 嘉久、日比野 浩 内耳機能に重要な蝸牛外側壁の電気化学的特性ポスター発表: 第86回日本薬理学会年会 平成25年3月21日(木)~23日(土)、発表21日(木)、福岡国際会議場、福岡
- ③ 任 書晃、日比野 浩、鈴木 敏弘、久 育男 Bartter症候群モデルマウスにおける蝸牛内高電位消失の数理モデル的検討 (ポスター発表) 第22回日本耳科学会. 平成24年10月4日(木)~6日(土)、発表4日(木)、名古屋国際会議場、名古屋
- ④ 日比野 浩 聴覚のおもしろい話 招待講演: 第31回聴覚生理研究会 平成24年10月4日(木): 名古屋国際会議場、名古屋
- ⑤ 日比野 浩、任 書晃、倉智 嘉久 内耳カリウムイオン動態と聴覚機能 招待講演: シンポジウム「他山の石~ミネラルが関わる健康と病気: そのメカニズムに

- 迫る」第12回日本抗加齢医学会総会 平成24年6月24日(日):パシフィコ横浜, 横浜
- ⑥ 日比野 浩、任 書晃、村上 慎吾、鈴木 敏弘、久 育男、倉智 嘉久 内耳内リンパ液の特殊電位環境の成立機構 招待講演(ランチョンセミナー):第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 平成24年5月10日(木):朱鷺メッセ, 新潟
- ⑦ 日比野 浩、任 書晃、村上 慎吾、倉智 嘉久 イオンチャネル・トランスポーターの統合的シミュレーション:内耳蝸牛を例として 招待講演:シンポジウム「チャネル・トランスポーターによる生体機能制御とその破綻」第28回日本医学会総会 平成23年4月8日(金)~10日(日)、発表9日(土)、東京国際フォーラム, 東京(東北関東大震災のため誌上開催)
- ⑧ 日比野 浩 内耳機能イントロダクション 招待講演:シンポジウム「内耳の機能研究と難聴治療の最前線」第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会・合同大会 平成23年3月28(月)~30日(水)、発表29日(水)、パシフィコ横浜, 横浜(東北関東大震災のため誌上開催)
- ⑨ 日比野 浩 内耳機能イントロダクション 招待講演:シンポジウム「内耳の機能研究と難聴治療の最前線」第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会・合同大会 平成23年3月28(月)~30日(水)、座長29日(水)、パシフィコ横浜, 横浜(東北関東大震災のため誌上開催)
- ⑩ 日比野 浩、任 書晃、村上 慎吾、鈴木 敏弘、久 育男、倉智 嘉久 内耳血管条と有毛細胞のイオン輸送のモデル化による蝸牛内高電位とカリウム循環の共役関係の解析 ポスター発表:第87回日本生理学会大会 平成22年5月19日(水)~21日(金)、発表19日(水)、盛岡市民文化ホール, 盛岡
- ⑪ 足立 直子、日比野 浩、任 書晃、鈴木 敏弘、久 育男、倉智 嘉久 内耳線維細胞を介したK⁺輸送は内リンパ液高電位に重要である ポスター発表:第87回日本生理学会大会 平成22年5月19日(水)~21日(金)、発表19日(水)、盛岡市民文化ホール, 盛岡
- ⑫ 古谷 和春、稲野辺 厚、日比野 浩、倉智 嘉久 抗うつ薬はATP感受性カリウムチャネルを阻害する ポスター発表:第87回日本生理学会大会 平成22年5月19日(水)~21日(金)、発表19日(水)、盛岡市民文化ホール, 盛岡

[図書] (計5件)

- ① 日比野 浩、任 書晃、倉智 嘉久 (2011) 内耳有毛細胞機能の分子生物学的基盤とそのモデル 音響サイエンスシリーズ3「聴覚モデル」pp58-100, コロナ社, 東京(233頁)
- ② 日比野 浩、倉智 嘉久 (2011) 非興奮性細胞(非興奮性組織)のイオンチャネル. 総論「トランスポートソームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ」pp130-135, 京都廣川書店, 京都(490頁)
- ③ 日比野 浩、内田 信一、野村 尚弘 (2011) 非興奮性細胞(非興奮性組織)のイオンチャネル. 上皮「トランスポートソームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ」pp136-141, 京都廣川書店, 京都(490頁)
- ④ 日比野 浩、倉智 嘉久 (2011) 様々なトランスポートソーム. 内耳の輸送体「トランスポートソームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ」pp367-374, 京都廣川書店, 京都(490頁)
- ⑤ 日比野 浩、倉智 嘉久 (2011) K⁺・水輸送を担う微小膜プラットフォームの同定と解析「トランスポートソーム 生体膜輸送機構の全体像に迫る 基礎, 臨床, 創薬応用研究の最新成果」遺伝子医学MOOK 19 pp224-229, メディカルドウ社, 大阪(274頁)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比野 浩 (HIBINO HIROSI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 70314317

(2) 連携研究者

倉智 嘉久 (KURACHI YOSHIHISA)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 30142011