

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 6 月 5 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22590217
研究課題名（和文）	蝸牛内直流電位の調節に対する細胞間タイト結合（クローディン）の役割
研究課題名（英文）	Role of tight junction (claudin) in the regulation of endocochlear potential
研究代表者	
	窪田 隆裕 (Kubota Takahiro)
	大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：	10084906

研究成果の概要（和文）：クローディン 14 の遺伝子異常は、難聴や尿管結石を引き起こすと報告されている。本研究では、クローディン 14 knockout mice (KO マウス) を作成した。従来の報告とは異なり、内リンパ腔電位 (EP) は KO マウスでは低下していた。さらには、内リンパ液の pH および K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} の濃度測定し、内リンパ腔周辺細胞のタイト結合の役割について検討を加えている。現在、実験途中であり、研究成果の発表は次年度になると考えている。

研究成果の概要（英文）：It had been reported that mutations in the gene encoding claudin-14 cause deafness and nephrolithiasis. In this experiment, we made the claudin-14 knockout mice to examine the functional role of tight junctions in the endolymphatic surface cells. The obtained experimental results were as follows; 1) endocochlear potential (EP) in the endolymph in knockout mice was lower than that in wild type mice. In the present, we are trying to measure the H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} concentrations in endolymph. All above experimental results will be published in the next year.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
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：基礎医学・生理学一般

キーワード：内リンパ腔電位、クローディン、タイト結合、血管条辺縁細胞、 Ca^{2+} 濃度

1. 研究開始当初の背景

EPは虚血（低酸素）や大量のループ利尿剤投与により低下することが一般に広く認められているにもかかわらず、EPの発生機序ならびにその変化について過去50年の研究において、未だその解明には至っていない。

したがって、末梢性感音難聴の一つである急性虚血性難聴の治療に対しても有効な手段も発見されていないのが現状である。

申請者は過去10年以上にわたり、EPの維持には、内リンパ腔周辺細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca]_i$) が適度の濃度に保たれることが重要

であることを報告し続けているが、国際的に広く認められていないのが現状である。2003年(Jpn J Physiol, 2003)にCa²⁺のEP調節に対する最初の論文が受理された後、細胞内Ca²⁺のキレート剤やニフェジピンの内リンパ腔投与により、EPの上昇や、無呼吸負荷によるEPの低下が著明に抑制されることを報告した(Jpn J Physiol, 2005; J Physiol Sci, 2007)。

申請者は、2年間(2007~2008)の科学研究費補助金で研究を伸展させ、1) single-cell modelの根拠となる上皮性Na⁺チャネル(ENaC)の阻害剤の有効性を確認し(J Physiol Sci, 2007)、2)免疫組織化学法によって辺縁細胞にENaCやL型Ca²⁺チャネル、TRPCチャネルの存在を認め(J Physiol Sci, 2009)、3)酸塩基平衡障害によるEPの低下はCa²⁺チャネル阻害剤で抑制されることを見出して来ている(J Physiol Sci, 2007)。また、上皮細胞間結合に重要な役割を果たすタイト結合の機能についても検討を加えた(J Cell Sci, 2004; J Physiol Sci, 2007、J Physiol Sci, 2009)。今後、これらの研究をより発展させて、急性虚血性および薬剤性難聴の治療に役立たせていきたい。

2. 研究の目的

急性末梢性感音難聴の原因の一つに血流障害によるものが挙げられるが、これは主として+80mVの蝸牛の内リンパ腔内電位(EP)が消失するためであろうと考えられている。

上記の申請者等の実験結果から、無呼吸負荷によるEPの低下は内リンパ腔周辺細胞内(特に血管条辺縁細胞やラセン隆起の線維芽細胞)のCa²⁺濃度上昇による辺縁細胞内の+電位の低下とタイト結合の電気的抵抗の低下ではないかと考えている。

事実、内リンパ腔周辺細胞の細胞間結合に共通のクローディン14の先天性異常は難聴を来すことが報告されており(Wilcox et al., Cell, 104, 2001、Kitajiri et al., Hear Res, 187, 2004)、この動物モデルを作製して得られた電気生理学的実験結果は末梢性感音難聴の解明に新たな知見を提供するものと考えられる(Wilcox等はクローディン14はコルチ器の細胞にのみ発現していると報告しているがKitajiri等は内リンパ腔周辺細胞に共通に発現していると報告している)。

以上より、本研究では、1. +のEPの発生に内リンパ腔周辺細胞のタイト結合がどのように関与しているかどうかを電気生理学的手法を用いて調べる。2. クローディン14 KOマウスを用いてEPの調節や内リンパ液のpHおよびCa²⁺濃度測定し、wild typeに比較して変

化がないかどうかを調べる。以上の研究成果をもとにして、末梢性感音難聴の治療に役立たせることを目的とする。

3. 研究の方法

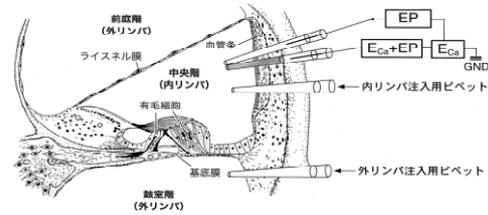


図1. 内耳蝸牛におけるEPと[Ca]_i測定と内外リンパ腔灌流の実験モデル

内リンパ腔に電位測定用ガラス電極とイオン電極を刺入し、内リンパ腔電位とイオン(Ca²⁺など)を同時に測定する。pH, Na⁺, K⁺は2連型電極を用いるのでマウスでも容易に測定出来る。しかし、Ca²⁺電極は2本同時に刺入するかもしくは、一本ずつ刺入する。後者の場合には、Ca²⁺電極を刺入後、再度電位測定用電極を刺入し、電位低下が起きていないかどうかを調べる。

モルモットでは、内外のリンパ腔を灌流出来るがマウスでは困難である。したがって、使用する動物種で実験方法を選択する。

4. 研究成果

クローディン14 KOマウスの蝸牛管表面の骨組織は、血管の走行がwild typeに比べて疎である(特に血管条付近)。したがって、クローディン14 KOマウスでは血管条での血流が低下しており、内リンパ液の産生も低下していると考えられた。

1) 経上皮の電気抵抗(CoTR)の測定

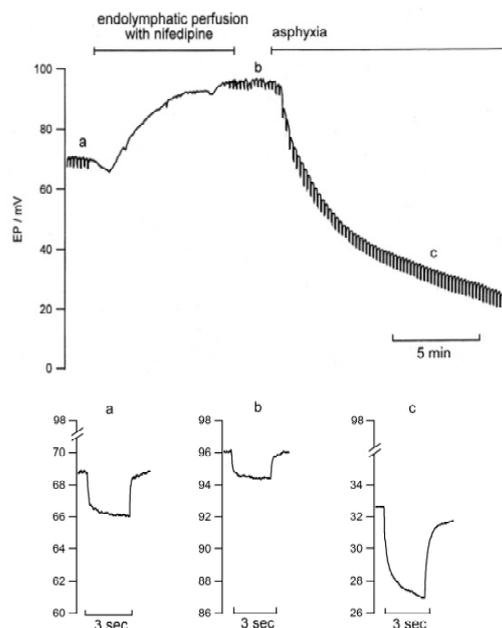


図2. EPとCoTRに対するnifedipineの影響
(Hasegawa et al., 2013)

申請時には、この実験はマウスで行う予定であったが、動物が小さく実験はモルモットに変更して行った。図2に示したごとく、nifedipineはCoTRを下げて、時定数(τ)を低下させたが、無呼吸負荷時にはCoTRを上昇させた。なお、上皮細胞の回路解析の結果、CoTRは主として、辺縁辺縁細胞の側基底膜の抵抗を測定していると考えられた。したがって、EPの発生源は辺縁細胞の側基底膜の上皮性Na⁺チャネルであり、-電位はBKチャネルの活性化によるものと考えられた(Hasegawa et al., 2013)。図3.に示すように、辺縁細胞の側基底膜電位が、EPの調節をしていると考えられる。

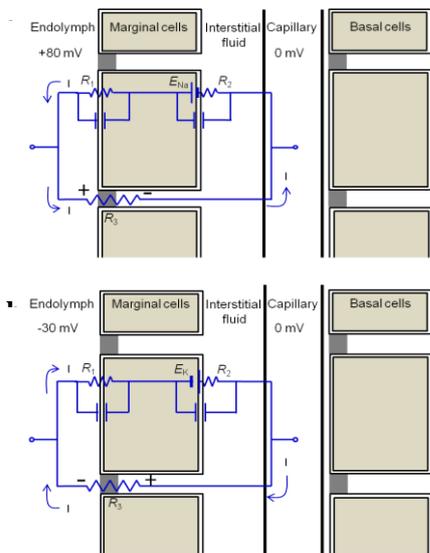


図3. 辺縁細胞での電気的回路

2) Knockout miceの実験

Wild type マウスとKOマウスのデータを被核検討している。実験は8週齢と20週齢のマウスを使用して行った。

1) EPの測定

図4.に示すようにwild typeのEPは100-110 mVで、KOマウスでは80-90 mVであり、ややEPは低下していた。

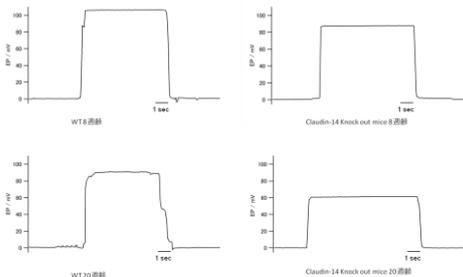


図4. EPの測定(白岩等、未発表データ)

上図: 8週齢のマウスの(左図:wild、右図:

KOマウス)

下図: 20週齢のマウス(左右は上図と同じ)

さらに、20週齢のマウスでは、wild typeは80-90 mV、KOマウスは60mV前後であった。以上より、クローディンKOマウスはwild typeに比べてEPは低いことが明らかとなった。

2) 内リンパ液のイオン濃度測定

EPの値により、内リンパ液のpHは少し変動するようである。現在迄のデータではwild typeの内リンパ液pHは-7.9とアルカリ性であった。KOマウスの内リンパ液pHも-7.8とアルカリ性であった。しかし、マウスの内リンパ腔はモルモットに比して小さく、少しでも表面からCO₂が拡散するとアルカリ性になるので、pH測定に関しては、いかに血管条を障害せずに、電極を刺入するか問題になるであろう。結論付けるにはまだ時期尚早と考える。

以上より、クローディン14 KOマウスではEPがやや低下しており、また内リンパ液のイオン組成も異なっている可能性が指摘された。今後、これらのデータを数多く集めてABRも測定し、論文に発表する予定である。しかし、既にEPは変化せず、hair cellの異常による難聴であると結論付けられた論文が一流の雑誌に発表されており、我々の論文が修正論文としての価値だけにならないように、新たな研究結果、特に内リンパ液のCa²⁺濃度の測定を行い、pHとの関係を検討してから論文にする予定である。来年度の発表になる予定である。

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)

- Inoue Y, Tashiro-Yamaji J, Hayashi M, Kiyonari H, Shimizu T, Iбата M, Yamana H, Kubota T, Tanigawa N, Yoshida R: Transgene number-dependent, gene expression rate-independent rejection of D^{d-}, K^{d-}, or D^dK^{d-}-transgened mouse skin or tumor cells from C57BL/6(D^bK^b)mice. Microbiol Immunol 2011; 55, 446-453.
- Kanbara K, Mori Y, Kubota T, Watanabe M, Yanagawa Y, Otsuki Y: Expression of the GABAA receptor/chloride channel in murine spermatogenic cells. Histol Histopathol 2011; 26, 95-106.
- Yoshida H, Hirano C, Shimamoto C, Daikoku E, Kubota T, Sugita M, Shiba Y, Nakahari T: Membrane potential modulation of ionomycin-stimulated Ca²⁺ entry via Ca²⁺/H⁺ exchange and SOC

- in rat submandibular acinar cells. J Physiol Sci 2010; 60,363-371.
4. Shimizu H, Yu YC, Kono K, Kubota T, Yasui M, Li M, Hwang TC, Sohma Y. A stable ATP binding to the nucleotide binding domain is important for reliable gating cycle in an ABC transporter CFTR. J Physiol Sci 2010; 60,353-362.
 5. Shimizu T, Tashiro-Yamaji J, Hayashi M, Inoue Y, Ibata M, Kubota T, Tanigawa N, Yoshida R: HLA-B62 as a Possible Ligand for the Human Homologue of Mouse Macrophage MHC Receptor 2 (MMR2) on Monocytes. Gene 2010; 454,31-38.

[学会発表] (計 17 件)

1. Yamaji J. et.al., Establishment and analysis of MMR2 knockout mice: the roles of Monocyte/Macrophage MHC receptor (MMR) 1 and 2 in allograft rejection. J Physiol Sci 2013; 63 Suppl 1, S138. The 90th Annual Meeting of the PSJ, March 27, 2013, Tokyo
2. Hasegawa K. et.al., Ca²⁺ concentration in endolymphatic surface cells modulates the endocochlear potential and transepithelial resistance in the guinea pig cochlea. J Physiol Sci 2013; 63 Suppl 1, S144. The 90th Annual Meeting of the PSJ, March 27, 2013, Tokyo
3. Shiraiwa Y. et.al., Role of ClC-5 in the intracellular H⁺ transport in perfused bullfrog proximal tubules cells. J Physiol Sci 2013; 63 Suppl 1, S174. The 90th Annual Meeting of the PSJ, March 27, 2013, Tokyo
4. Saito M. et.al., Effect of daily average steps on lower limb muscle mass after one year in community-dwelling elderly Japanese. J Physiol Sci 2013; 63 Suppl 1, S227. The 90th Annual Meeting of the PSJ, March 28, 2013, Tokyo
5. Hannya N. et.al., No allergen-specific IgE production by the 2nd *s. c.* injection of Mite-Dp feces after total IgE production by the 1st *i. n.* injection into mice. J Physiol Sci 2013; 63 Suppl 1, S249. The 90th Annual Meeting of the PSJ, March 29, 2013, Tokyo
6. Tashiro-Yanahji J. et.al., Characterization of a novel human receptor homologous to mouse macrophage major histocompatibility complex (MHC) receptor (MMR) 1. J Physiol Sci 2012; 62 Suppl 1, S146. The 89th Annual Meeting of the PSJ, March 30, 2012, Matsumoto
7. Mori Y. et.al., Role of PLC/PKC signaling cascade on the decrease in endocochlear potential induced by transient asphyxia. J Physiol Sci 2012; 62 Suppl 1, S186. The 89th Annual Meeting of the PSJ, March 30, 2012, Matsumoto
8. Maeda S. et.al., Autologous or syngeneic skin transplantation makes gray hair. J Physiol Sci 2012; 62 Suppl 1, S189. The 89th Annual Meeting of the PSJ, March 30, 2012, Matsumoto
9. Daikoku E. et.al., Role of vacuolar H⁺-ATPase in the pH regulation of perfused bullfrog proximal tubules. J Physiol Sci 2012; 62 Suppl 1, S199. The 89th Annual Meeting of the PSJ, March 31, 2012, Matsumoto
10. Hasegawa K. et.al., Changes in cochlear partition resistance induced by asphyxia in the guinea pig. J Physiol Sci 2011; 61 Suppl 1, S131. The 88th Annual Meeting of the PSJ/The 116th Annual Meeting of the JAA, March 28, 2011, Yokohama
11. Shiraiwa Y. et.al., Effect of CO₂ on intracellular pH in perfused bullfrog proximal tubules. J Physiol Sci 2011; 61 Suppl 1, S212. The 88th Annual Meeting of the PSJ/The 116th Annual Meeting of the JAA, March 29, 2011, Yokohama
12. Miyachi W. et.al., Macrophages regulate Ig class switching in B cells by controlling IL-4 production in T cells. J Physiol Sci 2011; 61 Suppl 1, S252. The 88th Annual Meeting of the PSJ/The 116th Annual Meeting of the JAA, March 30, 2011, Yokohama
13. Maeda S. et.al., A cancer vaccine: Specific rejection of i.p. or i.m. transplanted tumor cells by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) from mice that had rejected intradermally (i.d.) injected tumor cells. J Physiol Sci 2011; 61 Suppl 1, S252. The 88th Annual Meeting of the PSJ/The 116th Annual Meeting of the JAA, March 30, 2011,

研究者番号：20596605

- Yokohama
14. Yamana H. et. al., Rejection of Dd-, Kd-, or DdKd-transgened skin or tumor cells from C57BL/6 (DbKb) mice. J Physiol Sci 2011; 61 Suppl 1, S253. The 88th Annual Meeting of the PSJ/The 116th Annual Meeting of the JAA, March 30, 2011, Yokohama
 15. Tashiri-Yamaji J. et.al., Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel human receptor homologous to mouse macrophage major histocompatibility complex (MHC) receptor (MMR)1. J Physiol Sci 2011; 61 Suppl 1, S255. The 88th Annual Meeting of the PSJ/The 116th Annual Meeting of the JAA, March 30, 2011, Yokohama
 16. 山路-田代純子 他, マウスマクロファージ MHC 受容体 (MMR) 1・2 の非自己 (同種異系) 識別機構の解析. 第 104 回近畿生理学談話会, 2011 年 10 月, 高槻
 17. 大黒恵理子 他, 食用蛙近位尿細管に対する CO₂ の影響. 第 104 回近畿生理学談話会, 2011 年 10 月, 高槻

(3) 連携研究者：なし

〔図書〕 (計 2 件)

1. 窪田隆裕：生理学 1 概論「医療・福祉系学生のための専門基礎科目 改訂 2 版」金芳堂, 2013; pp115
2. 窪田隆裕：生理学 6 腎・尿路系「医療・福祉系学生のための専門基礎科目 改訂 2 版」金芳堂, 2013; pp148-156
3. 窪田隆裕：5. 腎, 塩と水バランス. 「カラー図解 症状の基礎からわかる病態生理第 2 版 Color Atlas of Pathophysiology 2nd edition 訳」メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2011; pp100-145

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 隆裕 (Kubota Takahiro)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10084906

(2) 研究分担者：

山路 純子 (田代 純子)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：40340559

白岩 有桂
大阪医科大学・医学部・助教