

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34431

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591892

研究課題名(和文) 蝸牛内リンパ腔電位の調節における辺縁細胞Ca²⁺透過性チャネルの役割

研究課題名(英文) Role of calcium-permeable channels in marginal cells on the regulation of endocochlear potential.

研究代表者

森 禎章 (Mori, Yoshiaki)

関西福祉科学大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70268192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛内リンパ腔は蝸牛血管条で発生する正の電位(蝸牛内直流電位：EP)を有している。無呼吸負荷ではEPが低下するが、内リンパ腔に膜透過性カルシウムキレート剤、L型カルシウムチャネル阻害剤、Cキナーゼ(PKC)阻害剤、フォスホリパーゼC(PLC)阻害剤を投与すると、無呼吸負荷によるEP低下が著明に抑制される。したがって、無呼吸負荷による酸素欠乏に伴うEP低下は、血管条細胞においてPLCが活性化することでPKCの活性化が生じ、これによりL型カルシウムチャネルが開孔して細胞内にカルシウムイオンが流入し、血管条細胞機能が変化した結果であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：A large positive potential in the endolymph, named the endocochlear potential (EP) has been considered to occur at cochlear stria vascularis. In the previous study, we reported that the decrease in EP induced by transient asphyxia was result from the increase in intracellular calcium ion induced by the activation of L-type calcium channels in the basolateral membrane of the marginal cells. In the present study, we demonstrated that a fall in the EP induced by transient asphyxia was suppressed by the administration of calcium-chelator, L-type calcium channel inhibitor, C kinase (PKC) inhibitors, or phospholipase C (PLC) inhibitors to the endolymph. Thus, asphyxia induced decrease in the EP was induced by the increase in calcium ion in the cells of stria vascularis, through the activation of L-type calcium channels mediated by the PKC activation result from the PLC activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：蝸牛内直流電位 辺縁細胞 細胞内情報伝達機構 L型カルシウムチャネル Cキナーゼ フォスホリパーゼC

1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛中央階には+80 mV 程度の蝸牛内直流電位 (EP) が存在し、この電位は音刺激により有毛細胞の感覚毛が屈曲して伸展刺激受容チャネルが開孔した際、内リンパ液中の K^+ を有毛細胞内に流入させる駆動力として働いている。この電位と有毛細胞の静止膜電位による電位勾配により K^+ が有毛細胞内に流入すると、有毛細胞は脱分極し側基底膜の電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開孔して、有毛細胞内に Ca^{2+} が流入することで神経伝達物質が聴神経に対して放出され、聴神経において活動電位が発生する。したがって、EP は聴力の発生にきわめて重要な意義を有しており、内耳における虚血性病変では EP が低下することで聴力が低下し、突発性難聴の病因のひとつであると考えられている。また、加齢に伴う難聴においても、血管条を構成する細胞の代謝が低下した結果 EP が低下して、聴力損失が生じる可能性も示唆されている。

EP が血管条細胞において発生することには疑いの余地は無いが、その発生機構についてはこれまで複数の仮説が提唱されており、古典的には血管条の最も内リンパ腔側に存在する辺縁細胞で EP が発生するとされてきた。しかし、近年では 1987 年に Salt らにより唱えられた two-cell model 仮説が主流となっており、Wangemann や Nin らによって多くの支持データが報告されている。蝸牛血管条は、内リンパ腔側から辺縁細胞、中間細胞、基底細胞の三種の細胞により構成されており、辺縁細胞と中間細胞の間には intrastrial space と呼ばれる空間が存在して、ここに毛細血管が走行している。また、中間細胞と基底細胞はギャップ結合により密な関係を維持している。Intrastrial space は辺縁細胞の $Na^+/K^+/2Cl^-$ 共輸送体の働きにより K^+ 濃度が低値に保たれており、two-cell model は中間細胞の intrastrial space に面した細胞膜から K^+ が拡散することで +80 mV 以上の電位を発生する、とするものである。

我々は以前の研究において、膜透過性の Ca^{2+} キレート剤である EGTA/AM や L 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤である nifedipine を内リンパ腔に投与すると、無呼吸負荷による EP 低下が有意に抑制されることを見出している (Mineharu A. et al., 2005, Nimura Y. et al., 2007)。内リンパ腔に投与した EGTA/AM や nifedipine が EP に影響するということは、内リンパ腔周囲の細胞、特に辺縁細胞が EP の発生や調節に関わっていることを示唆するものであり、免疫染色法により L 型 Ca^{2+} チャネルの局在を確認したところ、辺縁細胞側基底膜には Cav 1.2 のきわめて強い染色が確認された (Inui T. et al., 2007)。これらの事実は、辺縁細胞が EP の調節・維持・発生のいずれかに関わっていることを示しており、従来報告されている様に中間細胞のみが EP の形成に関与しているとする two-cell model に疑問を投げかけるものである。以上

の事実より、無呼吸負荷による EP の低下は、低酸素により辺縁細胞の L 型 Ca^{2+} チャネルが開孔した結果、細胞内に Ca^{2+} が流入して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、辺縁細胞の正常機能が阻害された結果であると考えられる。そこで、本申請における研究では、無呼吸負荷ともなう L 型 Ca^{2+} チャネルの開孔機序を検討した。

2. 研究の目的

申請者らは、過去の検討において無呼吸負荷における EP 低下の原因を検討し、無呼吸負荷に伴う虚血・低酸素状態では、血管条辺縁細胞側基底膜の L 型 Ca^{2+} チャネルが開孔し、辺縁細胞内に Ca^{2+} が流入することで細胞内の K^+ 濃度が上昇し、これによる辺縁細胞機能の変化が EP に影響を与えることを報告して生きた (Inui T. et al., 2007, Mori Y. et al., 2009)。本申請では、無呼吸負荷に伴う虚血・低酸素状態において辺縁細胞の L 型 Ca^{2+} チャネルが如何なる機構を介して開孔し、EP を低下させるかについての検討を行った。血中の酸素濃度を感知する部位としては、頸動脈洞や大動脈弓の化学受容器が知られているが、頸動脈小体では低酸素により何らかの機序を介して K^+ チャネルが開鎖して脱分極するのみならず、A キナーゼ (PKA) や C キナーゼ (PKC) といったタンパクリン酸化酵素 (プロテインキナーゼ) が活性化して L 型、T 型などの電位依存性 Ca^{2+} チャネルがリン酸化され、これらのチャネル活性を上昇させることが知られている。これによって頸動脈小体のグロムス細胞内へ Ca^{2+} が流入した結果神経伝達物質を放出することで、呼吸中枢への情報が伝達される。そこで、本研究では無呼吸負荷による EP 低下時に L 型 Ca^{2+} チャネルが開孔することに着目し、プロテインキナーゼの活性化に伴う L 型 Ca^{2+} 活性化の可能性を検討することにした。プロテインキナーゼには多数の種類が存在するが、ここでは頸動脈小体において低酸素により活性化することが報告されている PKA および PKC を対象とした。また、PKC には多くのアイソフォームが存在しており、活性化に Ca^{2+} およびジアシルグリセロール (DAG) が必要な conventional PKC (PKC α , PKC β , PKC γ)、活性化に DAG が必要であるが Ca^{2+} は必要ない novel PKC (PKC δ , PKC ϵ , PKC μ , PKC θ)、活性化に Ca^{2+} および DAG が不要な atypical PKC (PKC ζ , PKC ξ) の 3 つのサブファミリーに分類される。

本研究では蝸牛内リンパ腔に PKA 阻害剤と活性化剤、PKC 阻害剤または活性化剤、さらにはフォスホリパーゼ C (PLC) 阻害剤を投与し、薬剤単独による EP に対する効果を観察したうえで、無呼吸負荷時の EP 低下に対する効果を観察した。したがって本研究の目的は、無呼吸負荷による EP 低下におけるプロテインキナーゼを介した L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化機構を明らかにすることで

ある。

3. 研究の方法

実験動物にはプライエル反射陽性の白色モルモットを用いた。これを気管切開による人工呼吸下に蝸牛を露出し、経血管条的にガラス微小電極とガラス微小ピペットを蝸牛中央階に刺入することで、EP を測定するとともに内リンパ腔に各種薬剤を投与した。EP 測定用電極には 0.5 M の KCl 溶液を充填し、電極ホルダーを介してエレクトロメーター (WPI, FD223) に接続し、内リンパ腔の電位を MacLab 8s (ADInstrument) にて記録した (図 1)。また、内リンパ腔注入用ピペットから内リンパ腔に投与した薬剤として、非選択的プロテインキナーゼ阻害剤である staurosporin、PKA 阻害剤である PKAi、PKC 阻害剤である GF109203X、Gö6976、rottlerin、PKC 活性化剤である thymeleatoxin、ingenol、PLC 阻害剤である U-73122、D609 を使用した。

実験動物に対する内耳虚血・低酸素状態の誘発は人工呼吸器停止により無呼吸とすることで行い、人工呼吸器の再稼働により回復させた。

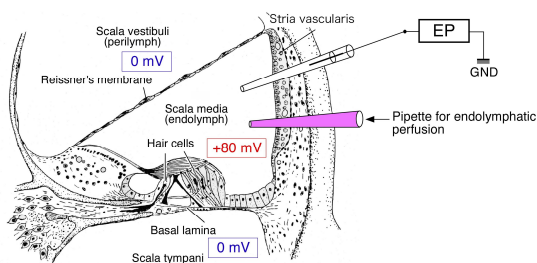


図 1

4. 研究成果

最初に、3 週齢のモルモットを用い実験手技の確立を行った。EP 測定用電極を刺入した状態で内リンパ腔注入用ピペットを実体顕微鏡下に刺入すると、手技が確立されていない段階では EP が大きく低下する例が多数存在した。そこで、ガラス管で作成した内リンパ腔注入用ピペットの先端をマイクロベラーで研磨し、鋭利な状態とすることで EP を低下させることなく内リンパ腔注入用ピペットを内リンパ腔に刺入し、安定して EP を測定することが可能となった。

次に、前年度に確立した手技を用いて非特異的プロテインキナーゼ阻害剤投与群、A キナーゼ阻害剤投与群、C キナーゼ阻害剤投与群の 3 群に対し、薬剤投与前の無呼吸負荷による EP の変化を観察した上で、薬剤投与単独による EP の変化と、無呼吸負荷による EP 低下に対する薬剤の作用を観察した。

ベンチレーターを停止することで無呼吸負荷を行うと、コントロール群では 90 秒以内に EP が 0 mV 以下にまで低下する。内リンパ腔に非特異的プロテインキナーゼ阻害剤である staurosporin を含んだ人工リン

パ液を注入すると、内リンパ腔の圧力が上昇することにより EP は 10 mV 程度上昇するが、5 分程度経過すると薬液注入前とほぼ同じ値になる。その状態で無呼吸負荷を行うと EP 低下が著明に抑制されるため、低酸素状態では何らかのプロテインキナーゼが活性化されることで EP が低下する可能性が示唆された (図 2A)。なお、staurosporin は PKC 阻害剤として注目されてきたが、PKA やカルモジュリンキナーゼ等も阻害することが知られている。

そこで、低酸素状態で活性化されるプロテインキナーゼを同定するために、PKA についての検討を行った。PKA の阻害剤である PKAi を含んだ人工内リンパ液を内リンパ腔に注入しても、EP は圧力の上昇により若干上昇する。この状態で無呼吸負荷を行っても、無呼吸負荷による EP 低下は薬剤投与前と比べて殆ど変化せず、PKA の活性化は無呼吸負荷による EP の低下に関与しないものと考えられた。次に、PKC についての検討を行うため、PKC の阻害剤である GF109203X を用いて、無呼吸負荷による EP 低下に対する PKC の関与を検討した。前述の如く PKC には多数のアイソフォームが存在するが、GF109203X はアイソフォーム非選択的な阻害剤である。GF109203X を含んだ人工内リンパ液を内リンパ腔に投与すると、無呼吸負荷による EP 低下が著明に抑制されたため (図 2B) PKC による蛋白磷酸化過程が無呼吸負荷による EP の低下に関与していることが明らかになった。

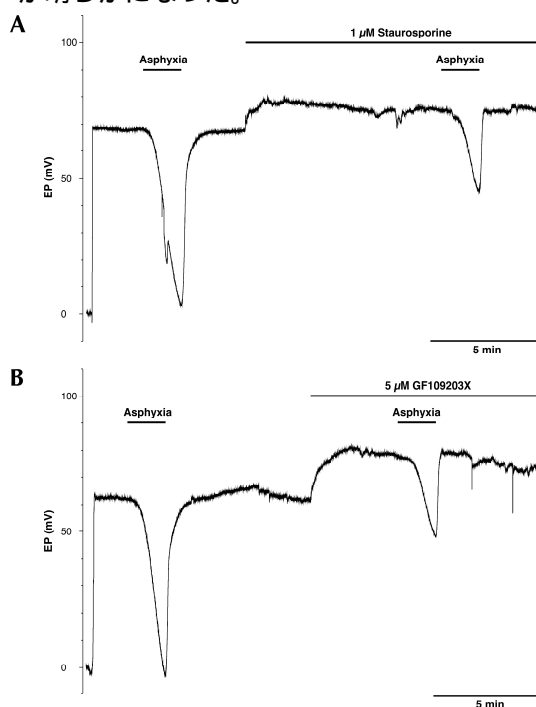


図 2

この結果を踏まえ、多数存在する PKC アイソフォームのうち、どの種類のアイソフォームが無呼吸負荷による EP 低下に関与しているかを検討した。まず、PKC α および β_1 に

特異性を有する阻害剤である G66976 を含んだ人工内リンパ液を内リンパ腔に注入すると、無呼吸負荷による EP 低下は殆ど抑制されなかった (図 3-A) したが、PKC α , β , γ , δ , ϵ , ζ に特異性を有する阻害剤である rottlerin を含んだ人工内リンパ液を内リンパ腔に注入すると、無呼吸負荷による EP 低下の著明な抑制が観察された (図 3-B)。したがって、無呼吸負荷による EP 低下には、PKC α , β ではなく PKC γ , δ , ϵ , ζ の何れかが関与することが明らかとなった。しかし、これ以上を分析するためのアイソフォーム特異性を持った PKC 阻害剤は市販されておらず、PKC 阻害剤を用いた検討ではこれ以上の解析は不可能である。

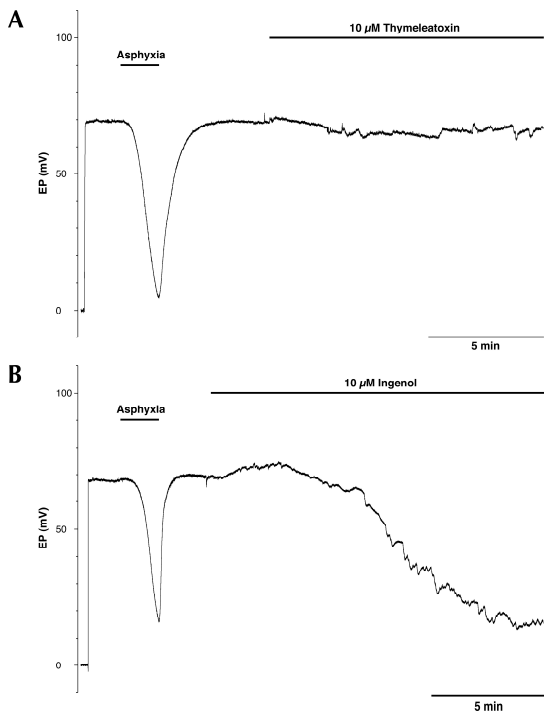


図 3

この問題を解決するために、無呼吸負荷を行わない状態で内リンパ腔にアイソフォーム特異性を持った PKC 活性化剤を投与し、EP の変化を観察した。まず、PKC α , β , γ の活性化剤である thymeleatoxin を含んだ人工内リンパ液を内リンパ腔に注入すると、定常状態の EP は殆ど変化しなかった (図 4-A)。しかし、PKC α , β , γ , δ の活性化剤である ingenol を含んだ人工内リンパ液を内リンパ腔に注入すると、著明な EP の低下が観察された (図 4-B)。このことは、PKC アイソフォームのうち、少なくとも PKC δ が蝸牛血管条における EP の発生・維持・調節に関わっていることを示している。なお、PKC δ は活性化に DAG が必要であるが Ca^{2+} は必要ない novel PKC に属するため、無呼吸負荷による低酸素状態では、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した結果 PKC が活性化したのではなく、何らかの経路を介して PLC が活性化してジアシルグリセロール (DAG) が産生された結果、

novel PKC が活性化した可能性が示唆される。

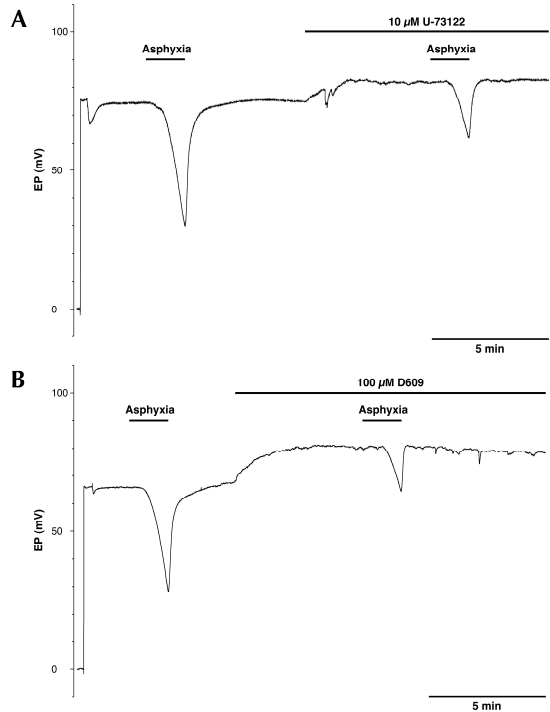


図 4

そこで、低酸素により PLC が活性化された結果として EP 低下が引き起こされた可能性を検討するために、PLC 阻害剤を用いて無呼吸負荷による EP 低下に対する PLC の関与を観察した。

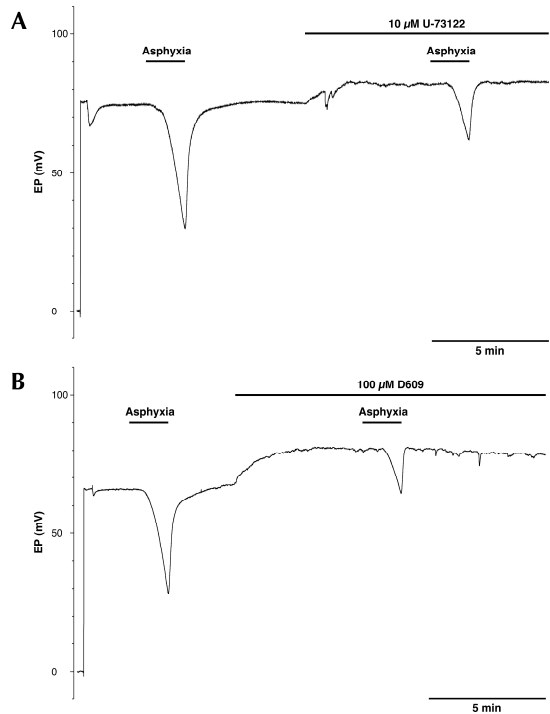


図 5

非特異的 PLC 阻害剤である U-73122 (図 5-A) またはフォスファチジルコリン (PC) 特異的 PLC 阻害剤である D609 (図 5-B) を

含んだ人工内リンパ液を内リンパ腔に投与すると、無呼吸負荷による EP 低下が有意に抑制された。したがって、無呼吸負荷時には低酸素により PC 特異的 PLC が活性化されることにより novel PKC が活性化することが、EP の低下を引き起こす一因となっていることが明らかとなった。低酸素による PLC の活性化については、hypoxia inducible factor (HIF) を介した系が報告されているが、その詳細はいまだ不明である。

以上の研究成果より、無呼吸負荷における低酸素状態では、血管糸を構成する辺縁細胞において何らかの機序により PC-PLC が活性化し、これが novel PKC を活性化させることで L 型 Ca^{2+} チャンネルが燐酸化されて開孔する。この結果、細胞内に Ca^{2+} が流入して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、EP 発生機構に影響をおよぼし EP が低下することが明らかとなった (図 6)。EP 発生の機序として現在主流である two-cell model をもとに考察すると、低酸素により上記のような現象が生じて辺縁細胞の正常機能が失われた結果、中間細胞に影響を与えて EP が低下するものと考えられる。しかしながら、そのメカニズムの全容の解明には、今後の検討が必要である。

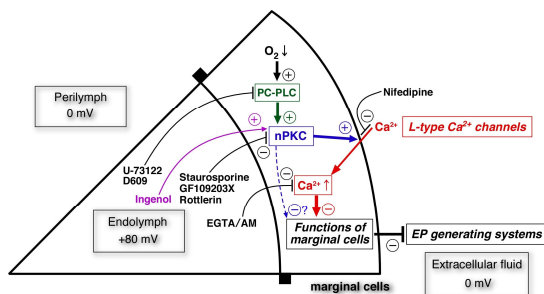


図 6

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 30 件)

1. 森 京子, 萩森伸一, 櫛原崇宏, 金沢敦子, 松村麗, 河田 了: 顔面神経減荷術の聴力に対する影響. Facial N Res Jpn 33: 126-128, 2013
2. 和田晋一, 萩森伸一, 森 京子, 金沢敦子, 櫛原崇宏, 野中隆三郎, 河田 了, 藤岡重和: 正中法 Electroneurography における CMAP 潜時の検討. Facial N Res Jpn 33: 89-91, 2013
3. Watanabe M, Ito Y, Fujioka S, Mori Y: GABA_B receptor immunopositive cells found in the mouse pulmonary alveolar epithelium were Type II cells. J. Allied Health Sci 4 (2): 35-41, 2013
4. Tashiro-Yamaji J, Maeda S, Ikawa M, Okabe M, Kubota T and Yoshida R.: Macrophage MHC and T-cell receptors

essential for rejection of allografted skin and lymphoma. Transplantation 96 (3) : 251-257, 2013

5. Tashiro-Yamaji J, Shimizu T, Hayashi M, Yamana H, Tanigawa N, Uchiyama K, Kubota T and Yoshida R.: Specific binding of HLA-B44 to human macrophage MHC receptor 1 on monocytes. Gene 501 (2): 127-134, 2012
6. 和田晋一, 萩森伸一, 森 京子, 金沢敦子, 櫛原崇宏, 野中隆三郎, 河田 了, 藤岡重和: Electroneurography (ENoG) における神経刺激電極位置についての検討. Facial Nerve Research 32: 122-124, 2012
7. Watanabe M, Mori Y, Watanabe K, Hiroshima R, Fujioka S, and Yanagawa Y.: Expression of GABA system in mouse olfactory mucosa. J. Allied Health Sci 2: 84-89, 2011
8. Kanbara K, Mori Y, Kubota T, Watanabe M, Yanagawa Y, and Otsuki Y.: Expression of the GABA_A receptor/chloride channel in murine spermatogenic cells. Histol Histopathol, 26: 95-106, 2011
9. 森 京子, 萩森伸一, 金沢敦子, 櫛原崇宏, 河田 了: 糖尿病を合併する顔面神経麻痺および突発性難聴患者に対するステロイド大量投与の糖尿病への影響について. Facial N Res Jpn 31: 49-51, 2011
10. Haginomori S, Wada S, Takamaki A, Kanazawa A, Nonaka R, Takenaka H, Takubo T: A novel electroneurography method in facial palsy. Acta Otolaryngol 130: 520-524, 2010

他 20 編

[学会発表](計 57 件)

1. Mori Y, Yamamoto M, Hiroshima R, Nakano T, and Watanabe M: Ca^{2+} -calmodulin/ calcineurin mediated signaling pathways are essential for upregulation of MHC I mRNA level in C2C12 cells. XXXVII Congress of the International Union of Physiological Science. 2013.7.21-26, Birmingham
2. 乾 崇樹, 萩森伸一, 松村麗, 長谷川恵子, 森 京子, 櫛原崇宏, 金沢敦子, 藤山吉更, 荒木倫利, 河田 了: 一側性メニエール病における聴力低下時の頭振り眼振所見と聴力の短期予後の関係. 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2013.5.15-18, 札幌
3. 森 禎章, 山路純子, 山本真紀, 廣島玲子, 中野 禎, 渡辺正仁: リハビリテーションと先端医療の最前線-骨格筋細胞増殖過程における細胞内情報伝達機構の役割-. 第 3 回日総合福祉学学会・シンポジ

- ウム「リハビリテーション最前線」.
2013.3.6, 柏原
4. Inui T, Takamaki-Mori A, Hasegawa-Tsujimura K, Haginomori S, Kawata R, and Mori Y: PKC-dependent Phosphorylation Processes Contribute to the Decrease in the Endocochlear Potential induced by the Transient Asphyxia. The First Asian Otology Meeting & The 3rd East Asian Symposium on Otology. 2012.6.2-3, Nagasaki
 5. 乾 崇樹, 萩森伸一, 松村 麗, 長谷川恵子, 森 京子, 樺原崇宏, 金沢敦子, 藤山吉更, 荒木倫利, 河田 了: 一側性メニエール病における聴力低下時の頭振り眼振所見と聴力の短期予後の関係. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 2012.5.10-22, 新潟
 6. Mori Y, Inui T, Takamaki-Mori A, Hasegawa-Tsujimura K, Tashiro-Yamaji J, Watanabe M, Kawata R, and Kubota T: Role of PLC/PKC signaling cascade on the decrease in endocochlear potential induced by transient asphyxia. 第 89 回日本生理学会大会. 2012.3.29-31, 松本
 7. Inui T, Mori Y, Watanabe M, Hasegawa-Tsujimura K, Takamaki-Mori A, Haginomori S, Kubota T, and Kawata T: Role of L-type Ca²⁺ channels in marginal cells of the stria vascularis during transient asphyxia. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2011.12.8, Kobe
 8. 森 京子, 萩森伸一, 樺原崇宏, 金沢敦子, 河田 了: 大阪医大耳鼻科で治療した中耳真珠腫の進展度と手術成績について. 第 21 回日本耳科学会総会. 2011.11. 24-26, 沖縄
 9. 乾 崇樹, 萩森伸一, 松村 麗, 辻村恵子, 樺原崇宏, 藤山吉更, 金沢敦子, 森 京子, 荒木倫利, 河田 了: メニエール病における頭振り眼振所見の検討. 第 70 回日本めまい平衡以外句会総会. 2011.11.17, 千葉
 10. 乾 崇樹, 森 禎章, 森 京子, 長谷川恵子, 萩森伸一, 窪田隆裕, 河田 了: 蝸牛内直流電位のプロテインキナーゼ C 依存性蛋白磷酸化過程による調節機構. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2011.5.19-21, 京都
 11. 森 禎章, 乾 崇樹, 森 京子, 長谷川恵子, 荒木倫利, 萩森伸一, 河田 了, 窪田隆裕, 無呼吸負荷による蝸牛内直流電位低下における PKC 依存性蛋白磷酸化過程の関与. 第 20 回日本耳科学会総会. 2010.10.7-9, 松山
 12. 乾 崇樹, 森 禎章, 森 京子, 渡辺 正

- 仁, 長谷川恵子, 荒木倫利, 萩森伸一, 窪田隆裕, 河田 了: 蝸牛内直流電位の維持に対する血管条辺縁細胞の Ca²⁺透過性チャネルの役割. 第 20 回日本耳科学会総会. 2010.10.7-9, 松山
13. Tashiro-Yamaji J, Shimizu T, Inoue Y, Kubota T, Yoshida R: Isolation of a human cDNA homologous to a mouse cDNA encoding a receptor for allogeneic MHC (H-2 D^d)[macrophage MHC receptor 1 (MMR 1)]. 14th International Congress of Immunology. 2010.8.25, Kobe
 14. Mori Y, Takamaki-Mori A, Inui T, Hasegawa K, Tashiro-Yamaji J, Miyamoto M, and Kubota T: PKC-dependent phosphorylation pathway(s) contribute to the decrease in endocochlear potential induced by the transient asphyxia. 第 87 回日本生理学会大会, 2010.5.19, 盛岡

他 43 件

〔図書〕(計 1 件)

1. 渡辺正仁, 森 禎章: 超カラー図解 看護自己学習 解剖生理学. 金芳堂, 2013

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 禎章 (Yoshiaki Mori)
関西福祉科学大学・保健医療学部・教授
研究者番号: 70268192

(2) 研究分担者

森 京子 (Atsuko Takamaki-Mori)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40368105

乾 崇樹 (Takaki Inui)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60465614

山路純子 (Junko Tashiro-Yamaji)
関西福祉科学大学・健康福祉学部・准教授
研究者番号: 40340559