

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790244

研究課題名（和文） 内耳上皮組織のpH調節機構及びその聴覚機能との協関の研究

研究課題名（英文） Research on the system of pH regulation in endocochlear epithelium

研究代表者

山口 聡一郎（YAMAGUCHI SOICHIRO）

北海道大学・大学院獣医学研究科・特任助教

研究者番号：50596864

研究成果の概要（和文）：

内耳血管条におけるpH調整機構の一端を明らかにするために以下の実験を行った。RT-PCR法により、起電性ナトリウム・重炭酸イオン共輸送体の一つであるNBCe1-Bが血管条に発現することが示された。組織学的実験により、血管条の基底細胞と思われる細胞にNBCe1-Bが発現することが示唆された。麻酔下のモルモットを用いた内リンパ電位測定の実験において、外リンパ液へのNBCe1-B阻害薬であるDIDSの適用により、内リンパ電位が低下したことから、NBCe1-Bが内耳血管条におけるpH環境を正常に保つことに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this research is to clarify the system of pH regulation in stria vascularis in endocochlea. Using RT-PCR technique, transcripts of NBCe1-B, an electrogenic  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  cotransporter, was shown to be expressed in stria vascularis. Results of immunostaining suggested that basal cells in stria vascularis expressed NBCe1-B. Application of DIDS, a NBCe1-B inhibitor, to perilymph reduced endocochlear potential measured from anesthetized guinea pigs. These results suggest that NBCe1-B plays an important role in pH regulation in stria vascularis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：内耳、血管条、陽イオンチャネル、重炭酸イオントランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛を満たす内リンパ液の高 $\text{K}^+$ 濃度・高電位は聴覚に必須であり、血管条の $\text{K}^+$ 輸送に立脚する。種々の輸送分子が駆動するこの $\text{K}^+$ 輸送では、ATP依存性輸送体が主軸となるため、莫大な酸素が消費され、多量の $\text{H}^+$ が生まれる。一般に蛋白質機能を修飾しうる $\text{H}^+$ の濃度調節は、血管条の $\text{K}^+$ 輸送の成立にも極めて重要と予想されるが、そのメカニズムは殆

ど謎であった。

## 2. 研究の目的

本課題では血管条のpH調節機構の分子基盤とその機能を解析し、血管条の $\text{K}^+$ 輸送や内リンパ液環境・内耳器官機能との協関を理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) RT-PCR: BN ラットの血管条を採取し、mRNA を抽出し、その cDNA を鋳型として、PCR 反応を行った。

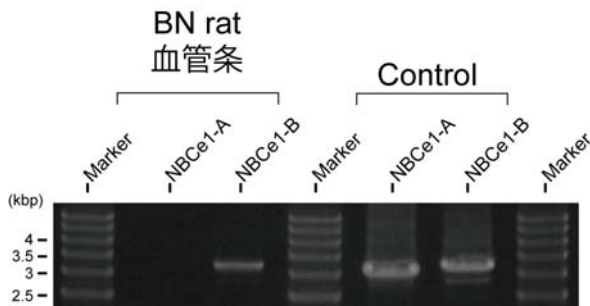
(2) immunostaining: 血管条からコラゲナーゼ処理により分離した細胞、あるいは内耳蝸牛の脱灰凍結切片を用いて、免疫染色を行った。

(3) 内リンパ電位の測定: 内耳蝸牛機能の指標として内リンパ液内の電位、すなわち内リンパ電位を測定した。実験動物はモルモットであり、ペントバルビタールによる深麻酔下において、人工呼吸器による呼吸調節の下で、痛みの制御に格段の注意を払い、動物実験倫理に考慮した上で、手術及び実験を行った。内耳の蝸牛の骨を削り、穴を開けた。そこに細く伸ばしたガラス管に 3M KCl 溶液を詰めたガラス電極を挿入し、内リンパ電位を測定した。外リンパ液に、調べる試薬を含む人工外リンパ液で灌流して、試薬の内リンパ電位に対する効果を評価した。

### 4. 研究成果

内耳蝸牛内リンパ液の pH 環境を整える機構の解明を目指した第一歩として、内リンパ液に接する上皮組織である血管条から mRNA を抽出し、RT-PCR による実験を行った。発現を調べる対象として、細胞や組織における pH 環境に影響を与える  $H^+$  や  $HCO_3^-$  の輸送体の発現を調べた。それにより、起電性  $Na^+-HCO_3^-$  共輸送体の一つである NBCe1-B の mRNA の血管条における発現が明らかとなった。NBCe1 の別のスプライシングバリエントである NBCe1-A の発現は認められなかった。(図 1)

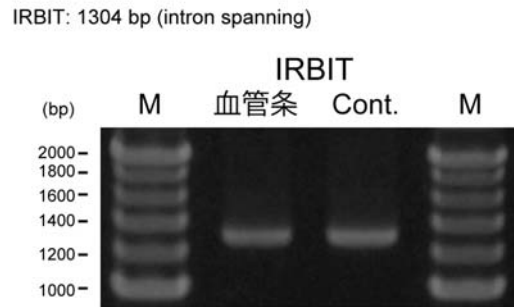
図 1



さらに、RT-PCR 法にて、血管条における IRBIT ( $IP_3$  receptor binding protein released with  $IP_3$ ) の発現を調べた。IRBIT は NBCe1-B の N 端領域に結合し、NBCe1-B の活性を 7 倍ほどにも上昇させる、NBCe1-B の機能調節に極めて重要な役割を果たすタン

パク質である。IRBIT は  $IP_3$  レセプターに結合し、 $IP_3$  と競合するため、細胞内の  $IP_3$  濃度が上昇したときに、 $IP_3$  レセプターから遊離するため、セカンドメッセンジャーとして働くことが想定されている。この IRBIT が血管条においても、少なくとも mRNA レベルでは発現していることが示唆された (図 2)。

図 2



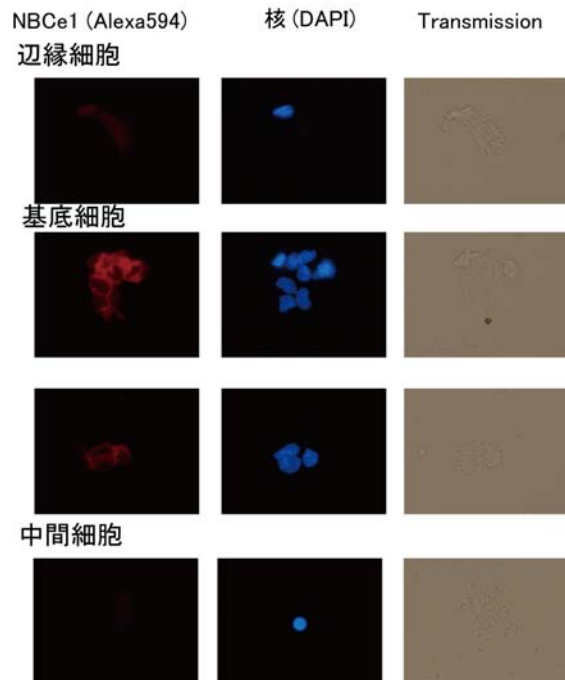
BN rat male

Cont.: Control (brain)

続いて、NBCe1-B の局在を調べる実験を行った。まず、血管条をコラゲナーゼ処理により分離した細胞を NBCe1 に対する抗体で染色したところ、辺縁細胞でも中間細胞でもない細胞、すなわち基底細胞 (あるいは線維芽細胞) に発現が認められた (図 3)。

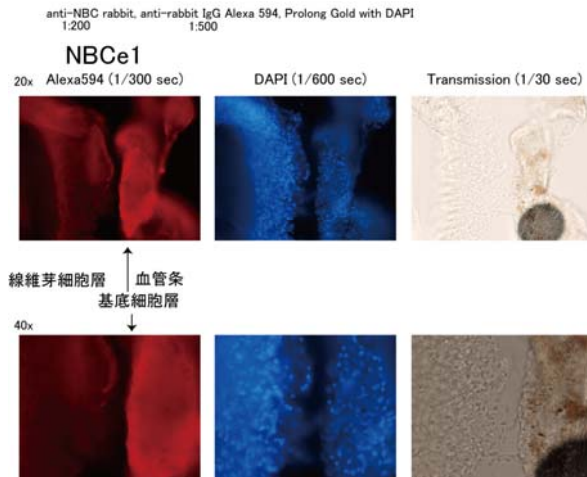
図 3

PLP fixative, BN rat male 9 weeks, Stria vascularis, collagenase +papain isolation  
anti-NBC rabbit, anti-rabbit IgG Alexa 594, Prolong Gold with DAPI  
1:200 1:500



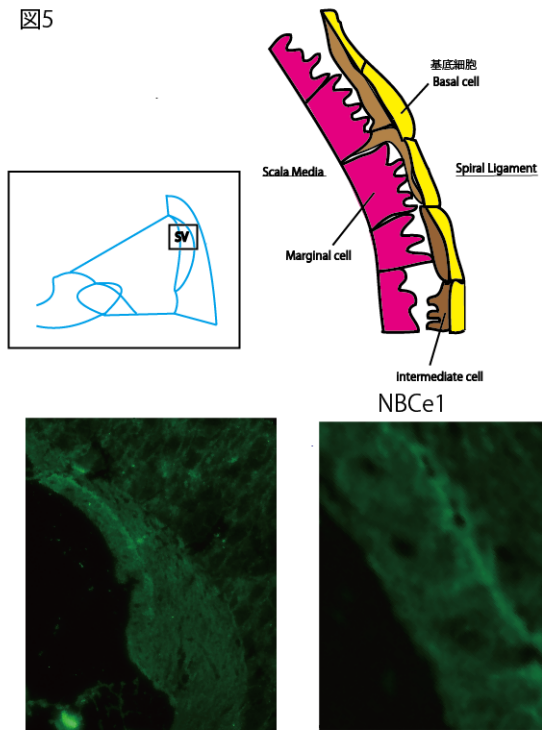
この基底細胞と思われる細胞が線維芽細胞でないことを確かめるため、血管条とその裏にある線維芽細胞層を分離せずそのままNBCe1に対する抗体で染色したところ、血管条の特に基底細胞層側で強いシグナルが観察された（図4）。

図4



さらに内耳の凍結切片を作成し、同じ抗体で染色したところ、基底細胞層と思われる細胞層に発現が認められた。（図5）

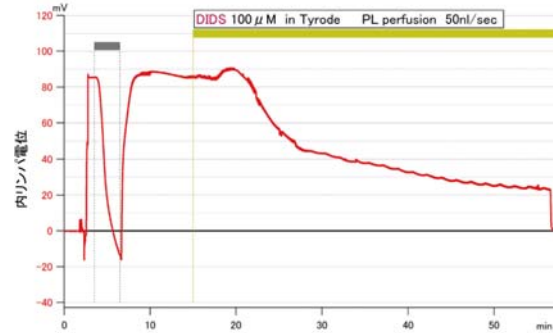
図5



このNBCe1-Bの発現による内耳機能への影響を調べるため、内リンパ電位の測定を行った。基底細胞層が接する外リンパ液に、

NBCe1-Bの阻害薬として最もよく使用されているDIDSを含む人工外リンパ液を灌流した。過去の報告ではDIDSの外リンパ液への適用は内リンパ電位に影響ないとされていたが、予想と反して、DIDSの灌流により内リンパ電位が減少するという結果が得られた（図6）。

図6



ただし、DIDSはNBCe1-B以外のトランスポーターやチャンネルも非特異的に阻害するので、この結果は慎重に解釈しなければならない。すなわち、この見出されたDIDSの効果が実際にNBCe1-Bであることや、さらにはNBCe1-BやIRBITが実際に内リンパ液のpH環境に影響を与えていることを今後、確認しなければならない。

しかし、これらの結果から、本研究により、NBCe1-Bが内耳内リンパ環境の正常な維持のために重要な役割を果たしている可能性が新たに示唆された。今後の展望としては、この知見が、内リンパ液の過剰を伴う厚労省指定難病のメニエール病の病態理解の端緒となる可能性がある。この疾患には7% NaHCO<sub>3</sub>溶液が治療に使われるため、内耳体液のpH異常が関わりと示唆されるが、一次的病因は不明である。本課題にて示されたNBCe1-Bの発現と言う知見は、メニエール病の発症機序や薬物作用点として、NBCe1-Bが関わっている可能性を新たに提唱する物である。この血管条におけるNBCe1-Bの研究を通して、メニエール病の予防法や新たな治療法の開発へとつながっていく可能性が期待される。

##### 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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕（計0件）

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 聡一郎 (YAMAGUCHI SOICHIRO)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・特任助教  
研究者番号：50596864

### (2) 研究協力者

日比野 浩 (HIBINO HIROSHI)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：70314317

山口 賢一 (YAMAGUCHI KENICHI)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：50108023