

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870210

研究課題名(和文) 蝸牛上皮層イオン輸送分子の生理的役割に対する総合的解析

研究課題名(英文) A comprehensive analysis of ion transport molecule for the physiological role in the cochlear epithelial layer.

研究代表者

緒方 元気 (OGATA, GENKI)

新潟大学・研究推進機構・助教

研究者番号：80707232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：内耳蝸牛を満たす「内リンパ液」は、常に+80 mVの高電位を示し、内リンパ液高電位が失われると難聴が惹起される。この高電位は、内・外2層の上皮層から成る「血管条」の電位とイオン濃度動態に依存する。本研究によって、血管条イオン動態に関連する、104個のイオン輸送分子を同定した。さらに、生理実験及び、コンピュータ・シミュレーション解析の結果より、この高電位維持には、外層のナトリウムイオン輸送機構が重要である事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Endolymph, which is the fluid contained in the inner ear, always shows the high potential of +80 mV. The decrease of endocochlear potential cause the hearing loss. This high potential is dependent on both of the potential and the ionic concentration behavior of the stria vascularis, which consists of two layer of epithelial tissues, the inner and the outer layer. In this study, we identified 104 ionic transport molecules which contribute to the ionic behavior of the stria vascularis. In addition, we identified that the sodium ionic transportation of the outer layer of the stria vascularis is important for maintaining the endocochlear potential by using the electrophysiological experiments and the computer simulation analysis.

研究分野：生理学一般 / 薬理学一般

キーワード：蝸牛 血管条 内リンパ液 チャンネル トランスポータ

1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛の「内リンパ液」は、+80 mV の高電位と 150 mM の高 K⁺濃度を常に示す特殊な細胞外液である(図 1)。内リンパ液高電位・高 K⁺濃度は、聴覚機能に必須であり、これらの破綻は難聴を惹起する。内リンパ液環境の成立には、内・外 2 層の上皮細胞層から成る「血管条」の K⁺動態が深く関わる(図 2)。さらに外層の +5 mV の膜電位は、内リンパ液の高電位の成立に不可欠である。しかしながら、その環境の維持機構は不明である。一般に、生体の細胞内は、静止状態で細胞外液に比べて数 mV から数十 mV の負電位を示し、血管条の外層のように常に正值を呈するものは殆どない。

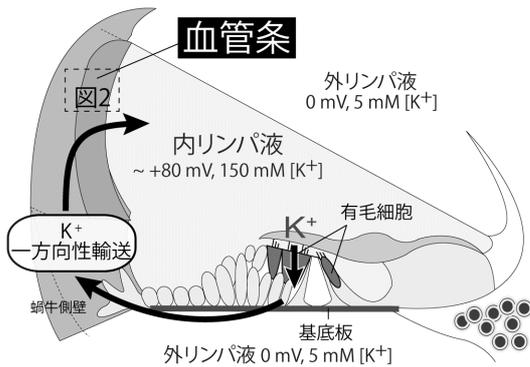


図 1 蝸牛の構造と K⁺一方向性輸送

2. 研究の目的

「内リンパ液高電位」は、聴覚機能に必須である。血管条外層の +5 mV の膜電位は、内リンパ液の高電位成立に不可欠である。しかしながら、その膜電位環境の維持機構は不明である。そこで本研究では、実験的手法と理論的アプローチを用いて、外層の環境の成立機構と機能的役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* イオン電極法を用いた外層基底膜の輸送体の生理的意義の検討

麻酔下モルモット内耳蝸牛血管条外層、に K⁺濃度と電位を同時測定するための 2 連管電極を刺入し、外層を浸す外リンパ液の Na⁺, K⁺, Cl⁻それぞれのイオン組成を変化させ、内リンパ高電位との関係を調べた。

(2) シミュレーションによる実験結果の再現

(1) の結果より、当研究室の内耳蝸牛数理モデルである NHK モデルを用いて、外層基底膜上 Na⁺透過性を変化させシミュレーション及び、それぞれのパラメータの最適化を行った。

(3) 血管条膜タンパク質の網羅的解析

7 週齢、雄の BN/SsNSIc ラットより、血管条を採取し、血管条サンプルから得た膜画分に対し、LC-MS/MS 解析した。

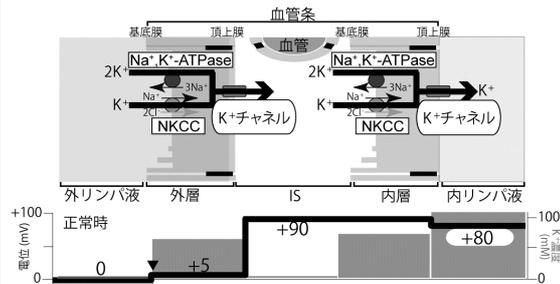


図 2 血管条の K⁺輸送分子と各細胞内・外の電位・K⁺濃度 NKCC: Na⁺, K⁺, 2Cl⁻共輸送体、▼: +5 mV の電位変化

4. 研究成果

(1) *In vivo* イオン電極法を用いた外層基底膜の輸送体の生理的意義の検討

血管条外層の膜電位は、正常状態では常に ~+10 mV を示した。血管条外層は外リンパ液と接している。Na⁺, K⁺, Cl⁻の各イオン濃度を正常状態と逆転させた人工外リンパ液で内耳蝸牛を還流した。その結果、低濃度 Na⁺人工リンパ液を還流した際に、外層膜電位の顕著な低下を示した(図 3)。さらに、外層膜電位変化量(ΔV_{FC})に比例し、内リンパ液電位は低下した(図 4)。

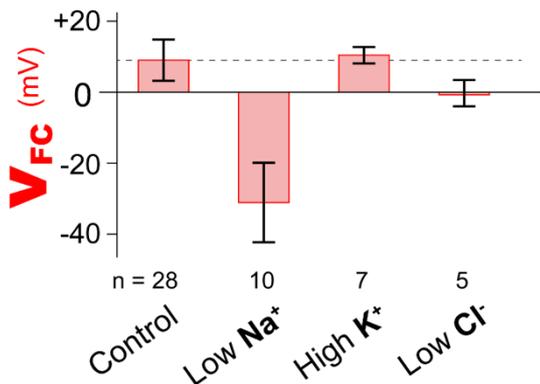


図 3 各イオン濃度組成の人工外リンパ液還流による外層膜電位変化

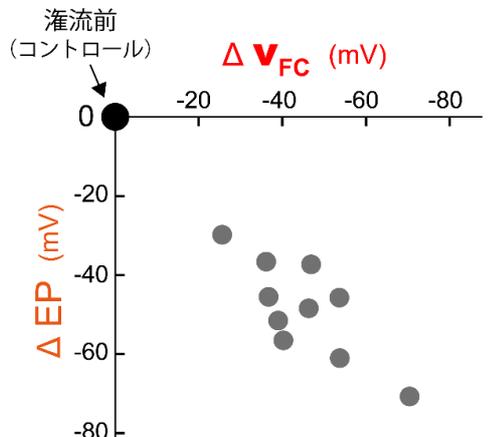


図 4 外層膜電位変化量(ΔV_{FC})と内リンパ液電位変化量(ΔEP)の相関

以上の結果より、血管条外層を Na⁺透過性

を示し、このNa⁺透過性は、内リンパ高電位の維持に重要であることが示唆される。

(2) シミュレーションによる実験結果の再現
血管条外層のNa⁺透過性を、NHKモデルに実装しシミュレーションした。その結果、モルモットを用いた生理実験と同等の現象を数理モデルで再現可能であった。

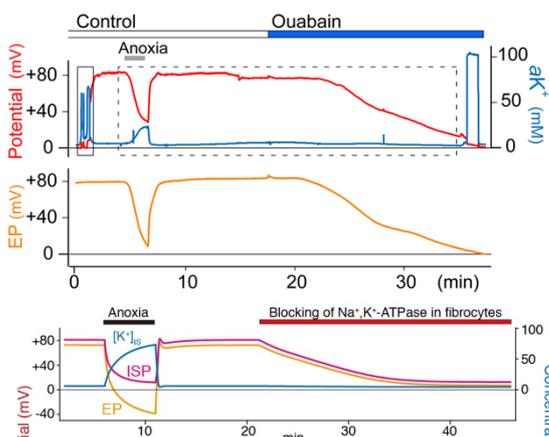


図5 モルモット生理実験結果(上)と改定シミュレーション結果(下)。

(3) 血管条膜タンパク質の網羅的解析
血管条組織から得た膜画分に対し、LC-MS/MS解析を施行した。その結果、3236個のタンパク質を検出した。その内、513個の膜タンパク質を同定し、25個のイオンチャネルと79個のトランスポーターを含んでいた。それらイオンチャネルとトランスポーターの内、血管条に発現の報告のないものとして、16個のイオンチャネルと62個のトランスポーターが含まれていた(業績:雑誌論文(1))。
今後、このデータを元に血管条外層Na⁺透過性を担う分子同定を行う予定である。

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2件)

- (1) Uetsuka S*, Ogata G*, Nagamori S*[#], Isozumi N, Nin F, Yoshida T, Komune S, Kitahara T, Kikkawa Y, Inohara H, Kanai Y, Hibino H[#] (2015). Molecular architecture of the stria vascularis membrane transport system, which is essential for physiological functions of the mammalian cochlea. *Eur J Neurosci* 42(3):1984-2002. [*: equal contributors, [#]: equal corresponding authors] (査読有り)
- (2) Yoshida T, Nin F, Ogata G, Uetsuka S, Kitahara T, Inohara H, Akazawa K, Komune S, Kurachi Y, Hibino H (2015). NKCCs in the fibrocytes of the spiral ligament are silent on the unidirectional K⁺-

transport that controls the electrochemical properties in the mammalian cochlea. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 467(7):1577-1589. (査読有り)

[学会発表] (計28件)

- (1) 任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、上塚学、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 蝸牛らせん靭帯の持続的脱分極性膜電位に関する in silico 解析. 口頭発表: 第62回中部日本生理学会 平成27年11月13日(金)~14日(土)、発表13日(金)、富山大学五福キャンパス、富山
- (2) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚学、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 蝸牛らせん靭帯の線維細胞が示す脱分極性静止膜電位に関する in vivo 解析 口頭発表: 第62回中部日本生理学会 平成27年11月13日(金)~14日(土)、発表13日(土)、富山大学五福キャンパス、富山
- (3) 佐藤 満雄、樋口 大河、任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、堀 かりん、上塚学、増田 正次、渡部 高久、神崎 晶、小川 郁、土井 勝美、田中 謙二、日比野 浩 光遺伝学を駆使した難聴モデルマウスの作成 口頭発表: 第62回中部日本生理学会 平成27年11月13日(金)~14日(土)、発表14日(土)、富山大学五福キャンパス、富山
- (4) 任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、上塚学、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 蝸牛らせん靭帯の持続的脱分極性膜電位に関する in silico 解析 口頭発表: 第17回応用薬理シンポジウム 平成27年9月4日(金)~5日(土)、発表4日(金)、有壬記念館、新潟
- (5) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚学、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 蝸牛らせん靭帯の持続的脱分極性膜電位に関する in vivo 解析 口頭発表: 第17回応用薬理シンポジウム 平成27年9月4日(金)~5日(土)、発表4日(金)、有壬会館、新潟
- (6) 上塚 学、緒方 元気、永森 収志、五十棲規嘉、吉田 崇正、任 書晃、吉川 欣晃、猪原 秀典、金井 好克、日比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する膜輸送系の網羅的タンパク質解析 口頭発表: 第17回応用薬理シンポジウム 平成27年9月4日(金)~5日(土)、発表4日(金)、有壬記念館、新潟
- (7) 佐藤 満雄、樋口 大河、任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、堀 かりん、上塚学、竹林 浩秀、土井 勝美、田中 謙二、日比野 浩 光遺伝学を駆使した難聴モ

- デルマウスの作成 口頭発表：第 17 回応用薬理シンポジウム 平成 27 年 9 月 4 日 (金)～5 日 (土)、発表 4 日 (金)、有壬会館、新潟
- (8) 佐藤 満雄、樋口 大河、任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、堀 かりん、上塚 学、土井 勝美、田中 謙二、日比野 浩 光 遺伝学を活用した難聴モデルマウスの作成 口頭発表：第 33 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会 平成 27 年 8 月 29 日 (土)、発表 29 日 (土)、ホテルグランヴィア大阪、大阪
- (9) 任 書晃、吉田 崇正、村上 慎吾、緒方 元気、上塚 学、倉智 嘉久、日比野 浩 聴覚に必須の内リンパ液電位に不可欠な蝸牛線維細胞の持続的脱分極性膜電位のメカニズム ポスター発表：第 38 回日本神経科学大会 平成 27 年 7 月 28 日 (火)～31 日 (金)、発表 29 日 (水)、神戸国際会議場、神戸
- (10) 上塚 学、緒方 元気、永森 収志、五十棲 規嘉、吉田 崇正、任 書晃、北原 紘、吉川 欣晃、猪原 秀典、金井 好克、日比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する上皮イオン輸送の分子構築の解析 ポスター発表：日本プロテオーム学会 2015 年会 平成 27 年 7 月 23 日 (木)～24 日 (金)、発表 24 日 (金)、くまもと森都心プラザ、熊本市
- (11) Takamasa Yoshida, Fumiaki Nin, Naoko Adachi, Genki Ogata, Satoru Uetsuka, Mitsuo Sato, Hidenori Inohara, Yasuo Hisa, Shizuo Komune, Yoshihisa Kurachi, Hiroshi Hibino. The mechanism underlying the potassium transport of the lateral wall in the cochlea. Oral presentation: 30th Politzer Society Meeting. July 1-3, 2015. Toki Messe, Niigata.
- (12) Satoru Uetsuka, Genki Ogata, Shushi Nagamori, Noriyoshi Isozumi, Fumiaki Nin, Takamasa Yoshida, Tadashi Kitahara, Yoshiaki Kikkawa, Hidenori Inohara, Yoshikatsu Kanai, Hiroshi Hibino. Proteomic analysis of membrane transport systems of the epithelial tissue in the mammalian cochlea. Oral presentation: 30th Politzer Society Meeting. July 1-3, 2015. Toki Messe, Niigata.
- (13) 任 書晃、吉田 崇正、村上 慎吾、緒方 元気、上塚 学、倉智 嘉久、日比野 浩 局所性 Na⁺電流は内リンパ液高電位に不可欠な内耳上皮組織の電位環境を形成する ポスター発表：第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会 平成 27 年 3 月 21 日 (土)～23 日 (月)、発表 21 日、神戸国際会議場、神戸
- (14) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚 学、佐藤 満雄、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 蝸牛の電気化学的特性を制御するカリウム循環電流は蝸牛側壁を通過する ポスター発表：第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会 平成 27 年 3 月 21 日 (土)～23 日 (月)、発表 23 日、神戸国際会議場、神戸
- (15) 上塚 学、緒方 元気、永森 収志、五十棲 規嘉、吉田 崇正、任 書晃、北原 紘、吉川 欣晃、猪原 秀典、金井 好克、日比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する上皮イオン輸送の分子構築の解析 ポスター発表：第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会 平成 27 年 3 月 21 日 (土)～23 日 (月)、発表 23 日 (月)、神戸国際会議場・展示場、神戸
- (16) 任 書晃、吉田 崇正、村上 慎吾、緒方 元気、倉智 嘉久、日比野 浩 内耳の多階層イオン輸送モデルによる耳毒性の発生機序の統合的理解 シンポジウム：「生体機能の多階層的理解と創薬研究への応用」第 88 回日本薬理学会年会 平成 27 年 3 月 18 日 (水)～20 日 (金)、発表 20 日、名古屋国際会議場、名古屋
- (17) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚 学、佐藤 満雄、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 カリウム循環電流は蝸牛側壁の電気化学的特性を制御する 口頭発表：第 88 回日本薬理学会年会 平成 27 年 3 月 18 日 (水)～20 日 (金)、発表 20 日、名古屋国際会議場、名古屋
- (18) 上塚 学、緒方 元気、永森 収志、五十棲 規嘉、吉田 崇正、任 書晃、北原 紘、吉川 欣晃、猪原 秀典、金井 好克、日比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する上皮イオン輸送の分子構築の解析 口頭発表：第 88 回日本薬理学会年会 平成 27 年 3 月 18 日 (水)～20 日 (金)、発表 20 日 (金)、名古屋国際会議場、名古屋
- (19) 上塚 学、緒方 元気、永森 収志、五十棲 規嘉、吉田 崇正、任 書晃、北原 紘、吉川 欣晃、猪原 秀典、金井 好克、日比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する膜輸送系の網羅的タンパク質解析 口頭発表：ポスター発表：N-hybrid カンファレンス 平成 27 年 1 月 31 日 (土)、ホテル日航新潟、新潟
- (20) 上塚 学、緒方 元気、永森 収志、五十棲 規嘉、吉田 崇正、任 書晃、北原 紘、吉川 欣晃、猪原 秀典、金井 好克、日

- 比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する上皮イオン輸送の分子構築の解析 口頭発表：第 79 回日本耳鼻咽喉科学会新潟地方部会 平成 26 年 12 月 6 日 (土)、発表 6 日、新潟大学有壬会館、新潟
- (21) Takamasa Yoshida, Fumiaki Nin, Genki Ogata, Shizuo Komune, Hiroshi Hibino. Different Contribution of NKCCs in Two Epithelial Layers of the Lateral Cochlear Wall to the Unidirectional K^+ -transport in the Inner Ear. Oral presentation: Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto. November 1 - 4, 2014. Kyoto International Congress Center, Kyoto.
- (22) Mitsuo Sato, Takamasa Yoshida, Fumiaki Nin, Genki Ogata, Katsumi Doi, Hiroshi Hibino. Evidence of the K^+ -circulation Current that Controls the Electrochemical Properties of the Mammalian Cochlea. Poster presentation: Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto. November 1 - 4, 2014. Kyoto International Congress Center, Kyoto.
- (23) 上塚 学、緒方 元気、永森 收志、五十棲 規嘉、吉田 崇正、任 書晃、北原 紘、猪原 秀典、金井 好克、日比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する膜輸送系の網羅的タンパク質解析 口頭発表：第 21 回みかんの会 平成 26 年 10 月 29 日 (水)、新潟大学旭町キャンパス、新潟
- (24) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚 学、佐藤 満雄、小宗 静男、日比野 浩 ラセン靱帯の線維細胞に発現する $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -cotransporter の K^+ 輸送と内リンパ液高電位成立における役割 口頭発表：第 24 回日本耳科学会総会・学術講演会 平成 26 年 10 月 15 日 (水) ~ 18 日 (土)、発表 18 日 (土)、朱鷺メッセ、新潟
- (25) 上塚 学、緒方 元気、永森 收志、五十棲 規嘉、吉田 崇正、任 書晃、北原 紘、猪原 秀典、金井 好克、日比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する上皮イオン輸送の分子構築の解析 口頭発表：第 24 回日本耳科学会総会・学術講演会 平成 26 年 10 月 15 日 (水) ~ 18 日 (土)、発表 18 日 (土)、朱鷺メッセ、新潟
- (26) 任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、倉智 嘉久、日比野 浩. 聴覚に必要な蝸牛 K^+ 循環に寄与するらせん靱帯 Na^+ 輸送系の理論的解析 第 65 回日本薬理学会北部会 平成 26 年 9 月 26 日 (金) ~ 27 日 (土)、発表 27 日 ; コラッセふくしま、福島
- (27) 上塚 学、緒方 元気、永森 收志、五十棲 規嘉、吉田 崇正、任 書晃、北原 紘、猪原 秀典、金井 好克、日比野 浩 内耳の特殊体液の恒常性が立脚する上皮イオン輸送の分子構築の解析 口頭発表：第 65 回日本薬理学会北部会 平成 26 年 9 月 26 日 (金) ~ 27 日 (土)、発表 26 日 (金)、コラッセふくしま、福島
- (28) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 蝸牛側壁の K^+ 輸送における $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -cotransporter の役割 口頭発表：第 65 回日本薬理学会北部会 平成 26 年 9 月 26 日 (金) ~ 27 日 (土)、発表 27 日 (土)、コラッセふくしま、福島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 元気 (OGATA, Genki)
新潟大学・研究推進機構・助教
研究者番号：80707232

(2) 研究協力者

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

任 書晃 (NIN, Fumiaki)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：80644905

永森 收志 (NAGAMORI, Shushi)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90467572

吉田 崇正 (YOSHIDA, Takamasa)
新潟大学・医歯学総合研究科・大学院生

上塚 学 (UETSUKA, Satoru)
新潟大学・医歯学総合研究科・大学院生