

平成 21 年 6 月 15 日現在

| | |
|-----------|---|
| 研究種目： | 基盤研究(C) |
| 研究期間： | 2007 ~ 2008 |
| 課題番号： | 19590216 |
| 研究課題名(和文) | 蝸牛内リンパ腔電位の調節—血管条辺縁細胞のCa ²⁺ チャネルの役割 |
| 研究課題名(英文) | Regulation of endocochlear potential - Role of Ca ²⁺ -permeable channel in marginal cells of stria vascularis. |
| 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：

①蝸牛内リンパ腔電位(endocochlear potential, EP)の発生源は辺縁細胞の側基底膜のNa⁺拡散電位である。②EPの変化は、主として内リンパ腔周囲細胞における種々のCa²⁺チャネル(主としてL型Ca²⁺チャネルやTRPCチャネル)から細胞内へのCa²⁺流入によって引き起こされる細胞間タイト結合の電気抵抗の低下によるものである。③EP変化の一部は辺縁細胞内のCa²⁺濃度の上昇による側基底膜のNa⁺拡散電位の低下によって引き起こされている。以上、EPの発生機序とその調節におけるCa²⁺の役割に付いて研究成果を得た。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|-----------|---------|-----------|
| 19年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 20年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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：腎生理学

1. 研究開始当初の背景

蝸牛内リンパ腔電位(endocochlear potential, EP)は、蝸牛中心階の血管条組織で作られており、有毛細胞に電流(情報)を送る重要な駆動力を提供している。EPは虚血(低酸素)や利尿剤投与により著明に低下

することが広く一般に認められているが、その発生機序ならびに無呼吸負荷の変化について過去50年にわたり研究されてきたが、未だその解明には至っていない。したがって、虚血性や利尿剤投与による末梢性感音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 年にわたり、無呼吸負荷の時に内リンパ腔液の Ca^{2+} 濃度 ($[Ca]_o$) が著明に増加することを報告し続けているが、国際的には認められていないのが現状である。したがって、論文を受理されたのも 2003 年になってからであった (Takamaki A et al., Jpn J Physiol, 2003)。その後、細胞内 Ca^{2+} のキレート剤やニフェジピンを内リンパ腔から投与すると、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 (Mineharu A et al., Jpn J Physiol, 2005、Nimura Y et al., J Physiol Sci, 2007)。現在では、国際的には EP の発生に関する二つの説が提唱されているが (図 1)、two-cell model が指示されている。しかし、申請者は、EP の発生機序は single-cell model で充分説明出来ると考え、研究を進めている。

Single-cell model

two-cell model

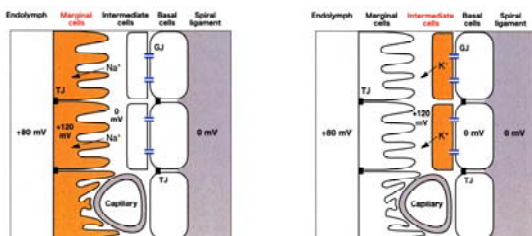


図 1. 蝸牛内リンパ腔電位の発生機序の学説。

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 EP が消失するためであろうと考えられている。申請者は、過去 10 年にわたりイオン電極法を用いて、無呼吸負荷、利尿剤投与などの条件下で蝸牛内リンパ液の組成変化と、EP の関係を調べてきた。その結果、EP 変化と蝸牛内リンパ液の Ca^{2+} 濃度 ($[Ca]_o$) が著しく変化することを見出した (Takamaki A et al., Jpn J Physiol, 2003、

日本生理学会・細胞と分子生理の集い・上皮膜研究グループ優秀論文賞)。その後のクローディン 11 のノックアウトマウスを用いた研究により (Kitajiri S et al., J Cell Sci, 2004)、血管条の基底細胞や中間細胞のみならず、細胞辺縁細胞が正の EP 発生に少なからず関与している可能性を示唆する結果が得られた。さらに、内リンパ腔に直接面している細胞内にカルシウムキレート剤 (EGTA, BAPTA) を注入すると、無呼吸負荷や利尿剤投与による EP の低下が抑制された (Mineharu A et al., Jpn J Physiol, 2005)。最近では、無呼吸負荷による EP 低下が血管もしくは内リンパ腔からのニフェジピン投与で抑制されることや血管状組織 pH 変化による EP の低下もニフェジピン投与で抑制されることを見出した (Nimura Y et al., J Physiol Sci, 2007)。現在、免疫組織化学法を用いて内リンパ腔周辺細胞の Ca^{2+} 透過性チャネルの存在部位を調べている。興味あることに、EP 発生源の場所と考えられている血管条組織においてはある種の Ca^{2+} 透過性チャネルは辺縁細胞のみに染色され、EP の発生と調節に辺縁細胞内の Ca^{2+} が深く関与している可能性が示唆されている。以上の研究結果から、急性虚血性末梢性感音難聴の原因の一つに、内リンパ腔に直接面している辺縁細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca]_i$) の上昇が関与している可能性が考えられた。本研究では、1. +の EP の発生に辺縁細胞の上皮性 Na^+ チャネル (ENaC) が関与しているかどうかを電気生理学的手法と免疫組織化学的手法の両者を用いて調べる。2. $[Ca]_i$ の上昇が急性虚血性や大量の利尿剤投与による末梢性感音難聴にどのように関っているかを EP や $[Ca]_o$ を測定しながら調べる。3. 数種類のカルシウム拮抗剤の効果を検討し、虚血性の急性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

i) 電気生理学的測定 (窪田、森、相馬、大学院生) : 微小イオン電極法・パッチクランプ法を用いた電気生理学測定。

ii) 分子生物学的操作 : 渡辺

血管条細胞における Ca^{2+} 透過性チャネルもしくは ENaC の免疫染色による同定。

iii) 論文作成 (竹中、窪田) : 実験で得られたデータをもとに論文作成を行う。

4. 研究成果

1. L 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤であるニフェジピン投与により、無呼吸負荷による EP 減少が抑制された (Nimura et al., J Physiol Sci 57:15-22, 2007)。さらに、この薬剤の dose-dependent curve を求め、L 型 Ca^{2+} チャネルの局在と辺縁細胞内 Ca^{2+} の EP 調節に関する論文を発表した (Inui et al., J Physiol Sci 57:287-298, 2007、日本生理学会・細胞と分子生理の集い・上皮膜研究グループ優秀論文賞)。

2. 内リンパ液の Ca^{2+} 濃度が無酸素負荷により急激に上昇することを見出していたが、それが内リンパ液に面している細胞群の tight junction の変化により起こっている可能性を指摘した。また、L 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤であるニフェジピン投与だけでは、急性虚血性の EP の低下は完全に抑制されず、他の Ca^{2+} 透過性チャネル (TRP チャネルなど) の関与の可能性が考えられる (Inui et al., J Physiol Sci 57:287-298, 2007)。

3. 内リンパ腔より上皮性 Na^+ チャネル阻害剤投与により、EP が殆ど 0 mV まで低下した。このことから、EP は血管条辺縁細胞の側基底膜の Na^+ 拡散電位が起源となっていると考えられた。

急性虚血性の EP の低下は L 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤であるニフェジピン投与で有意に抑

制されたが、代表的な利尿剤であるフロセミドによる EP 低下は TRPC チャネル阻害剤である BTP2 で有意に抑制された。このことから EP 調節には辺縁細胞に存在する種々の Ca^{2+} チャネルを介する Ca^{2+} 流入が EP の発生を調節していると考えられた (Mori et al., J Physiol Sci, 59; 2009, in press)。

以上、本研究では L 型 Ca^{2+} チャネルと TRPC チャネルの EP 調節に対する関与を中心に研究を進めた。結論 : ① EP の発生源は辺縁細胞の側基底膜の Na^+ 拡散電位であり、② 一過性無呼吸負荷による EP の変化は、主として内リンパ腔周囲細胞が保持している種々の Ca^{2+} チャネル (主として L 型 Ca^{2+} チャネル) からの細胞内への流入によって引き起こされる細胞間タイト結合の電気抵抗の低下によるものである。また、③ EP 変化の一部は辺縁細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇による側基底膜の Na^+ 拡散電位の低下によって引き起こされている、と考えられた。これら結論を模式図にしたものが図 2 である。

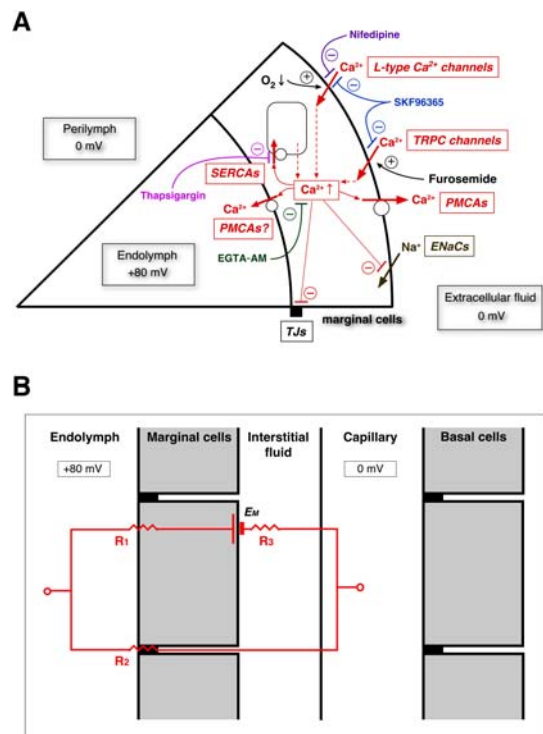


図 2. 血管条辺縁細胞における Ca^{2+} の輸送機構と EP

に対する Ca^{2+} の調節機構 (A)、EP 発生機構を説明する辺縁細胞の等価回路 (B) (Mori et al., J Physiol Sci, 59; 2009, in press 参照)。

更には血管条細胞のみならず、腎尿細管細胞でも細胞内 Ca^{2+} による K^+ チャネルの調節に付いて検討を進めた (Mori et al., J Physiol Sci. 58; 199-207, 2008)。また、胃粘膜上皮における Ca^{2+} の役割に付いても検討を加え (Shimamoto C et al., Am J Physiol. 293: G324-G837, 2007)、上皮細胞における Ca^{2+} 調節の普遍性をも追求した。

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 4 件)

① Mori Y, Watanabe M, Inui T, Nimura Y, Araki M, Miyamoto M, Takenaka H and Kubota T. Ca^{2+} regulation of endocochlear potential in marginal cells.

J Physiol Sci. 査読有. 59, 2009, in press

② Mori Y, Yoshida H, Miyamoto M, Sohma Y and Kubota T.

Constitutive activity of inwardly rectifying K^+ channel at physiological $[\text{Ca}]_i$ is mediated by $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK II}$ pathway in opossum kidney proximal tubule cells.

J Physiol Sci. 査読有. 58, 199-207, 2008

③ Inui T, Mori Y, Watanabe M, Takamaki A, Yamaji J, Sohma Y, Yoshida R, Takenaka H and Kubota T.

Physiological role of L-type Ca^{2+} channels in marginal cells in the stria vascularis of guinea pigs.

J Physiol Sci. 査読有. 57, 287-298, 2007

④ Shimamoto C, Umegaki E, Katsu K, Kato M,

Fujiwara S, Kubota T, and Nakahari T.

$[\text{Cl}^-]$ modulation of Ca^{2+} -regulated exocytosis in Ach-stimulated antral mucous cells of guinea pig. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol), 査読有. 293, C824-C837, 2007

[学会発表] (計 5 件)

① 森 禎章, 渡辺正仁, 乾 崇樹, 竹中 洋, 窪田隆裕.

血管条辺縁細胞に存在する Ca^{2+} チャネルによる蝸牛内直流電位の調節.

近畿生理学談話会.

2008 年 9 月 13 日. 国立循環器センター

② 乾 崇樹, 森 禎章, 二村吉継, 高巻京子, 渡辺正仁, 竹中 洋, 窪田隆裕.

モルモット血管条辺縁細胞に存在する L 型 Ca^{2+} チャネルの役割.

日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会.

2008 年 5 月 16 日. 大阪国際会議場.

③ 乾 崇樹, 森 禎章, 窪田隆裕

蝸牛内直流電位の調節に対する Ca^{2+} 透過性チャネルの役割.

日本生理学会大会.

2008 年 3 月 26 日. 京王プラザホテル.

④ 乾 崇樹, 森 禎章, 二村吉継, 高巻京子, 渡辺正仁, 竹中 洋, 窪田隆裕

蝸牛内直流電位の維持に対する血管条辺縁細胞 L 型 Ca^{2+} チャネルの関与.

日本耳科学会総会・学術講演会.

2007 年 10 月 18 日. 福岡国際会議場.

⑤ 森 禎章, 窪田隆裕

腎近位尿細管細胞膜に存在する K^+ チャネルの $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK II}$ による活性調節機構.

日本腎臓学会学術総会.

2007 年 5 月 26 日. アクトシティ浜松.

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

渡辺 正仁 (Watanabe Masahito)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70084902

森 禎章 (Mori Yoshiaki)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：70268192

(3) 連携研究者

相馬 義郎 (Sohma Yoshirou)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：60268183

竹中 洋 (Takenaka Hiroshi)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：40137162