

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18734

研究課題名（和文）正常聴覚に不可欠な蝸牛ナトリウム輸送機構の解明

研究課題名（英文）Electrophysiological analysis of cochlear Na transport mechanism

研究代表者

吉田 崇正（Yoshida, Takamasa）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50600912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：内リンパ液高電位（EP）は聴覚の高い感受性にとって重要で、その破綻は難聴を惹起する。In vivoでは、蝸牛側壁の最外層を構成するラセン靭帯はNa依存性の正の静止膜電位を有する。この正の膜電位はEPに不可欠であるが、その基盤となるNaチャネルははまだ明らかではない。本研究課題では急速単離組織片を用いた細胞内記録により、ラセン靭帯の膜電位をin vitroで実測することに初めて成功した。Naチャネル同定に必要な膜電位のイオン・薬物感受性の知見が得られた。また、比較的簡易な手法なので各種モデル動物に応用可能であり、今後の蝸牛機能解析に有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳蝸牛の内リンパ液が持つ+80mVもの高電位は、聴覚の高い感受性を支える電池としての役割を持ち、その破綻は難聴を惹起する。この生体電池の電源として不可欠の役割を担う「ラセン靭帯」は、in vivoにおいてプラスの静止膜電位という特異な性質を有するが、その成立機序は未解明である。本研究課題では、ラセン靭帯の静止膜電位をin vitroで実測することに初めて成功した。今後、各種モデル動物に応用可能な手法であり、内耳性難聴の病態理解や、軟膏疾患に対する治療法の開発に寄与すると考えられる。

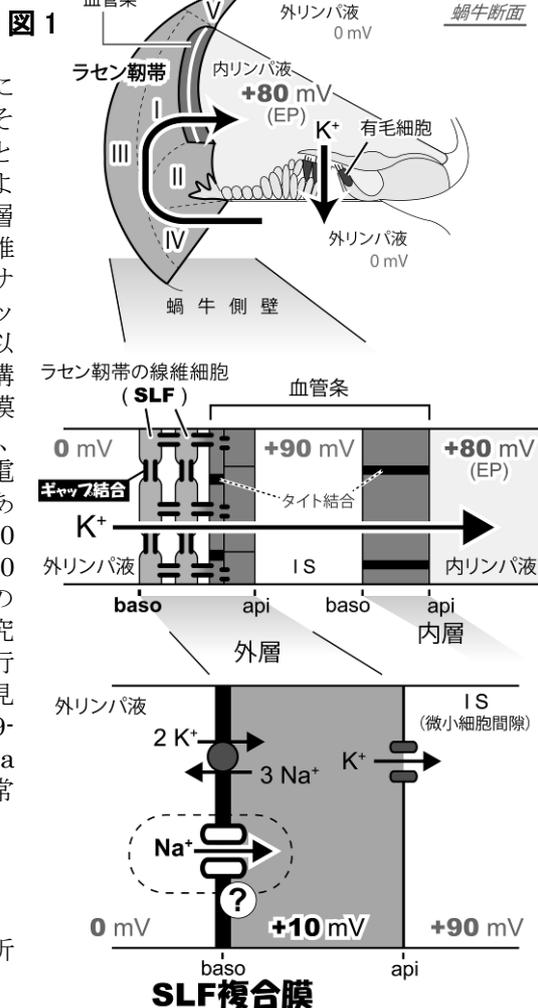
研究成果の概要（英文）：Endocochlear potential (EP) is important for hearing. In vivo, spiral ligament in the lateral cochlear wall has a Na-dependent positive resting membrane potential which is an essential component for EP. However, the molecular basis of the Na channel in the ligament remains to be identified. In this study, we successfully recorded its membrane potential in vitro for the first time using acutely isolated tissue fragments. Ionic and drug sensitivities of the potential were obtained, which would be useful for identification of the Na channel. Also, this method would be applicable to other animal models.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：蝸牛 聴覚 電気生理 ラセン靭帯

1. 研究開始当初の背景

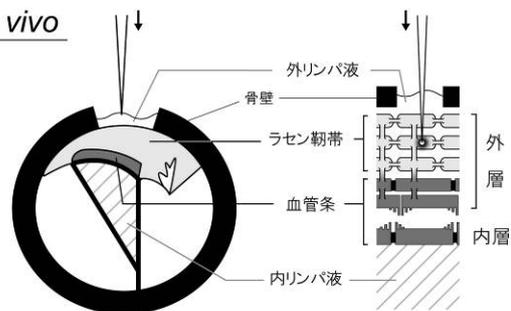
内リンパ液高電位 (EP) と蝸牛 K 循環は聴覚に必須の特性で、蝸牛側壁のイオン輸送に立脚し、その破綻は難聴を惹起する。蝸牛側壁のラセン靭帯と血管条は、発達したギャップ結合の細胞間交通によりカップリングし、外層と内層という 2 つの上皮層として機能する。ラセン靭帯の細胞成分である線維細胞 (SLF) にはタンパク発現パターン異なるサブタイプ (I-V) があるが、これらの細胞群はギャップ結合によってひとつながりの大きな細胞膜 (以下、SLF 複合膜) として機能し、外層の側底面を構成する (図 1)。In vivo において、この SLF 複合膜は正の膜電位 (+10mV) を定常的に有する。一方、血管条の中間細胞が構成する外層の頂上面の膜電位は、一般的な細胞と同様の負電位 (-80mV) である。その結果生じる外層の大きな経上皮電位差 (90 mV) が、内外リンパ液間の電位差である EP (+80 mV) の主成分である。SLF の正の膜電位は EP の必須要素だが、その成立基盤は未解明である。研究代表者らは先行研究で in vivo 細胞内記録実験を行い、SLF 複合膜が Na 選択的透過性を持つことを見出した (Yoshida, et al. Pflügers Archiv 468: 1609-19, 2016; 図 2)。SLF には正の膜電位を生み出す Na チャネルがあると想定され、その解明・同定は正常聴覚機構と難聴病態の理解に有意義である。



2. 研究の目的

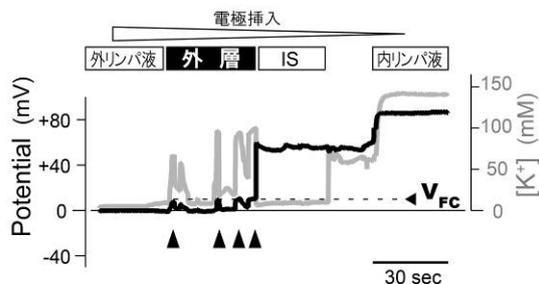
SLF の Na チャネル同定に向けた電気生理機能解析

図 2 in vivo



蝸牛骨壁に小孔をあけて、蝸牛側壁に電極をゆっくりと刺入した。外リンパ液を基準とした外層の細胞内電位が、ラセン靭帯の膜電位  $v_{FC}$  に相当する (黒矢頭、+10.8 mV)。

なお、この in vivo 実験系では、上皮層の極性および内・外リンパの区画は維持されている。



Yoshida, et al. (2016) Pflügers Arch 468: 1609-19

3. 研究の方法

前述のように、in vivo (麻酔動物) では細胞内記録実験により SLF の電気生理学的特性が明らかになってきたが、in vitro (単離組織・細胞レベル) のデータは乏しい。ラセン靭帯はマトリクスが強靭なので、SLF のパッチクランプは胎仔・新生仔でのみ可能とされてきた。一方、EP や K 循環が成立するのは齧歯類では 2-3 週齢である。正常聴覚における SLF の電気生理学的役割を明らかにするために、ラット成獣 (4-10 週齢) を対象として in vitro 実験を行った。

4. 研究成果

(1) パッチクランプ実験

本研究課題の開始当初は、スライスパッチクランプ法による SLF の膜電流測定を行った。実体顕微鏡下に急速単離した蝸牛側壁 (血管条+ラセン靭帯) の組織片を低融点アガロースで包埋し、厚さ 50  $\mu$ m の生スライスを作成した。残存マトリクスを酵素消化してスライス断面

に露出した SLF のうち、少数だがギガシー爾可能な細胞が得られた。Whole cell 測定ができた細胞の一部では、不活性化しない（定常的に開状態の）Na 電流が記録されたが、高濃度・長時間の酵素処理による細胞障害が強く、実験の成功率・安定性が非常に低い、記録細胞のサブタイプ同定のための免染反応が失われる、という課題が解決できなかった。

## (2) 骨付きの単離組織片を用いた *in vitro* 細胞内記録実験

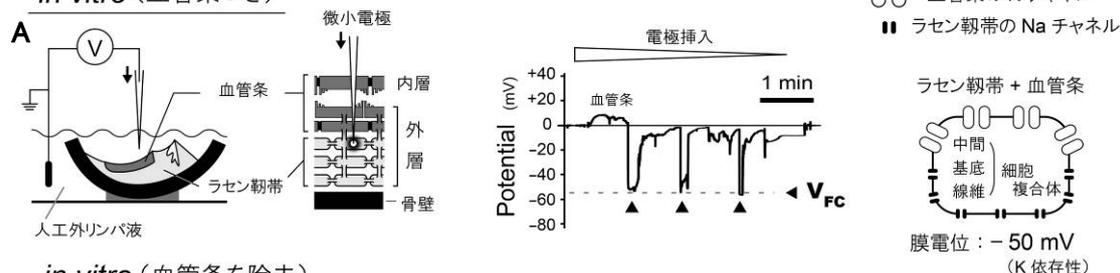
上記課題を克服するために、酵素処理を要しない新たな *in vitro* 実験系を立ち上げた。

急速単離した蝸牛側壁の組織片（骨壁+ラセン靱帯+血管条）をチャンバーの底面にレジンで接着固定し、人工外リンパ液を灌流しつつ真上からガラス微小電極をゆっくりと刺入した。外層の細胞群はギャップ結合で交通しているのではほぼ均一な膜電位を有し、電極先端が細胞内を通過したときの矩形の電位ピークとして記録される。

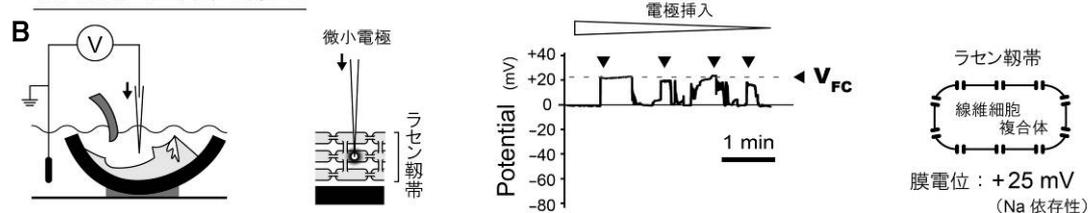
血管条付きの組織片では、外層の細胞群は負の膜電位（ $-20\sim-50\text{mV}$ ）を示した（図 3A）。次に、血管条を除去してラセン靱帯のみとした組織片に再度微小電極を刺入すると、膜電位は  $+20\sim+30\text{mV}$  であった（図 3B）。さらに微小電極から色素を電流注入し、電位測定を行った SLF をマーキングすることにも成功した（図 4）。

図 3

### *in vitro* (血管条つき)



### *in vitro* (血管条を除去)



単離した蝸牛側壁の組織片に、ゆっくりと電極を刺入した。

血管条付きの組織片では、ラセン靱帯の膜電位 ( $v_{FC}$ : 矢頭) はギャップ結合を介して血管条の K チャネルに支配されるため負電位 ( $-50\text{mV}$ ) だが、血管条を除去すると  $v_{FC}$  は正電位 ( $+25\text{mV}$ ) となる。

なお、この実験系では内・外リンパの区画および上皮層の極性は失われている。

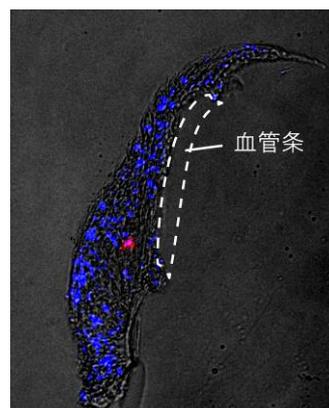
*In vivo* においては、外層の側底面 (SLF 複合膜) は Na 透過性に立脚する正の膜電位を、頂上面 (血管条の中間細胞) は K 透過性に立脚した負の膜電位を有する (図 1)。一方、*in vitro* の系では上皮層の極性が失われているため、血管条付き組織片で外層の細胞群が示した負の膜電位は、側底面・頂上面の膜電位が合算された値だと解釈できる (図 3A)。本研究では、血管条を除去してラセン靱帯のみとした組織片を用いて、SLF 複合膜の正の膜電位を *in vitro* で実測することに初めて成功した (図 3B)。

細胞内記録法は、パッチクランプのように細胞内環境をコントロールしたり膜電流を実測したりすることは不得手である。しかし、蝸牛単離後 10 分余りで測定を開始できるため、24 時間以上の高濃度の酵素処理を要するスライスパッチクランプと比べて細胞障害が少なく済み、成功率・再現性が大きく改善した。膜電位のイオン・薬物感受性に関するデータが得られたため、現在論文投稿中である。

骨付き単離組織片を用いた細胞内記録法は、麻酔動物とイオン電極を用いる *in vivo* 実験ほど煩雑な準備を必要とせず、簡易に施行できる。マウス等の他の動物にも適用可能であり、各種モデル動物においてラセン靱帯の機能を評価する新たな方法として期待できると考えられる。

本研究期間中にはパッチクランプ法による機能解析の継続を断念したが、SLF 複合膜を構成する SLF にはタンパク発現パターンの異なる I-V のサブタイプがあるため、単一細胞の機能評価も重要である。単離条件等を再検討し、パッチクランプ実験系の改良にも取り組む予定である。

図 4 蛍光色素によるマーキング



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhang Q, Ota T, Yoshida T, Ino D, Sato MP, Doi K, Horii A, Nin F, Hibino H	4. 巻 599
2. 論文標題 Electrochemical properties of the non-excitabile tissue stria vascularis of the mammalian cochlea are sensitive to sounds.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Physiol	6. 最初と最後の頁 4497-4516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP281981	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉田崇正、久保和彦、中川尚志	4. 巻 40
2. 論文標題 当科におけるHunt症候群の治療成績	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Facial N Res Jpn	6. 最初と最後の頁 152-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田崇正、中川尚志
2. 発表標題 EPに不可欠なラセン靭帯線維細胞の膜電位のin vitro解析
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田崇正、久保和彦、小出彩佳、中川尚志
2. 発表標題 アニマ社製重視音動揺計におけるニューラルネットとラバー負荷判定
3. 学会等名 第78回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田崇正、久保和彦、中川尚志
2. 発表標題 当科におけるHunt症候群の治療成績
3. 学会等名 第43回日本顔面神経学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田崇正、中川尚志
2. 発表標題 EP の必須要素である ラセン靭帯の膜電位のin vitro 解析
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田崇正、久保和彦、中野貴史、小出彩佳、中川尚志
2. 発表標題 内耳窓閉鎖術によりCatch-up saccadeが消失した1例
3. 学会等名 第79回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田崇正、久保和彦、脇園貴裕、中川尚志
2. 発表標題 内耳窓閉鎖術が著効した89歳外リンパ瘻の1例
3. 学会等名 第80回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中川 尚志 (Nakagawa Takashi) (70274470)	九州大学・大学院医学研究院・教授  (17102)	
研究協力者	日比野 浩 (Hibino Hiroshi) (70314317)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授  (14401)	
研究協力者	任 書晃 (Nin Fumiaki) (80644905)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------