

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18738

研究課題名（和文）内耳カルシウム制御に関する新たな分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of new molecular mechanism of calcium regulation in the inner ear

研究代表者

南方 寿哉（Minakata, Toshiya）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：10770612

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）：カルシウム感知受容体（Calcium sensing receptor: CaSR）の内耳での発現を検討した。まずウェスタンブロットング法にて内耳に腎臓での発現と同一の分子量を持つ分子を確認したため内耳でもCaSRが発現していると考え免疫染色を施行した。結果、内耳のラセン靭帯に特異的にCaSRが発現していることを確認した。内耳での発現が機能的なものであるかどうかカルシウムイメージングを施行し、その発現が機能的な発現であることを確認した。次いで聴覚に寄与につきラット内耳へ直接正円窓経由にCaSRの作動薬及び阻害薬を投与し、聴力が低下することを確認し、聴覚への関与が示唆された結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルシウム感知受容体（Calcium sensing receptor: CaSR）は生体内のカルシウム濃度調整に必要な受容体の一つ、腎臓、骨、副甲状腺といった血液内のカルシウム濃度の制御に関わる臓器の他、中枢・末梢神経、血管平滑筋細胞などでも発現が確認されている。本研究では新たにCaSRが内耳のラセン靭帯に発現していることを発見した。ラセン靭帯は内耳のイオンの恒常性維持に重要な役割を果たしている。本研究ではカルシウムイメージングにてラセン靭帯での機能的な発及び内耳への阻害薬、作動薬を投与による聴力低下を発見し、CaSRが聴覚に寄与している可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the expression of calcium sensing receptor (CaSR) in the inner ear. First, we confirmed that molecule that had same molecular weight as that in the kidney by western blotting, so we investigated immunostaining, assuming that CaSR is also expressed in the inner ear. By immunostaining revealed the expression of CaSR in the spiral ligament of the inner ear. We performed calcium imaging whether to confirm the expression in the inner ear was functional and confirmed that the expression of spiral ligament was functional. Next, we administered CaSR agonist and antagonist directory to the inner ear via the round window and confirmed that hearing thresholds was elevated by administration of CaSR agonist and antagonist. These results suggested that CaSR is functionally expressed in the spiral ligament in the inner ear and contribute for hearing.

研究分野：中耳内耳

キーワード：カルシウム感知受容体 ラセン靭帯 カルシウム恒常性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カルシウム感知受容体 (Calcium sensing receptor: CaSR) は生体内のカルシウム濃度調整に必要不可欠な受容体の一つであり、循環血液内のカルシウム濃度の制御に関わる腎臓、骨、副甲状腺といった臓器のみならず、中枢・末梢神経系や血管平滑筋細胞などへの発現も確認されている。一方で内耳において蝸牛では空気の軽微な緻密波である音波をとらえるため他の神経系とは異なる機構を発達させている。内リンパ液の形成もその一つで高いカリウムイオン濃度、低いナトリウムやカルシウムイオン濃度を能動的に維持し、高い内リンパ電位を形成している。特にこの中でもカリウムイオンについて様々な先行研究があり聴覚への関与が示されている。しかし、カルシウムイオンがなぜ内リンパで低濃度に維持されているのかについては不明な点が多い。カルシウムイオンは外リンパ液では数 mM であるのに対し内リンパ液では ~0.02mM と極めて低く維持されており、カルシウム濃度の上昇は高度難聴を生じることが報告されている。そのため内耳において低いカルシウム濃度を能動的に維持するためにはその低い濃度を感知し、調整するフィードバック機構の存在が疑われるが現在までにそうした報告はない。そのため今回 CaSR に着目、ラットを使用したウエスタンブロッティングにて内耳での CaSR の発現が示唆された結果を得たためさらなる検討を行うこととした。

2. 研究の目的

内耳における CaSR の発現及びその機能を解明し、内耳でのカルシウム濃度の恒常性の維持機構を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) ウエスタンブロッティング

実験動物として Wistar/ST ラットを使用して以下実験を施行した。

5 週のラットから蝸牛とコントロールとして腎臓を摘出、タンパク質を抽出した。次いでモノクローナルの抗 CaSR 抗体を使用し検出を行った。内因性コントロールとして アクチンを使用した。

(2) 免疫染色

5 週ラットを灌流固定後に蝸牛を取り出し、凍結切片を作製した。その後モノクローナル抗 CaSR 抗体による免疫染色を施行した。

(3) カルシウムイメージング

4 週のラットを使用 (5 週ラットでは骨化のため) し、内耳のラセン靭帯を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡にてカルシウム濃度の変化を測定した。

(4) ABR による聴力測定

5 週ラットを使用。ラットの耳後部を切開し、耳包を同定、同部に小切開を加え正円窓を露出させた。次いで正円窓経由に小ガラスチップを使用し薬剤を投与、その投与前、後での ABR を測定した。

4. 研究成果

(1) ウエスタンブロッティング

約 130kDa に腎臓と同程度に発現する分子を蝸牛にて認めた (図 1)。CaSR の分子量とも一致し蝸牛での発現を確認した。

(2) 免疫染色

免疫染色にて内耳ラセン軸動脈、ラセン板縁、ラセン靭帯への CaSR の発現を認めた (図 2)。

(3) カルシウムイメージング

次いで、カルシウムの恒常性の維持に関してはラセン靭帯での発現が関与している可能性が高いため同部を使用しカルシウムイメージングを施行した。細胞外カルシウムを負荷することでラセン靭帯内でのカルシウム濃度の上昇を認め、この反応は CaSR 阻害薬である NPS-2143 を投与することでカルシウム濃度の上昇は抑えられた (図 3)。このためラセン靭帯において CaSR は機能的な発現をしていることが確認された。

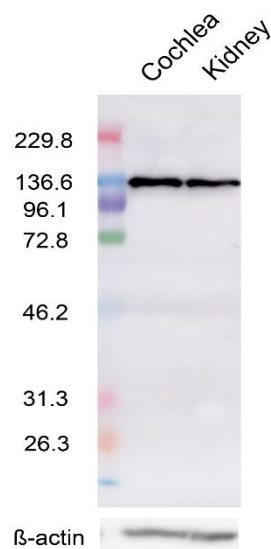


図 1
ウエスタンブロッティング

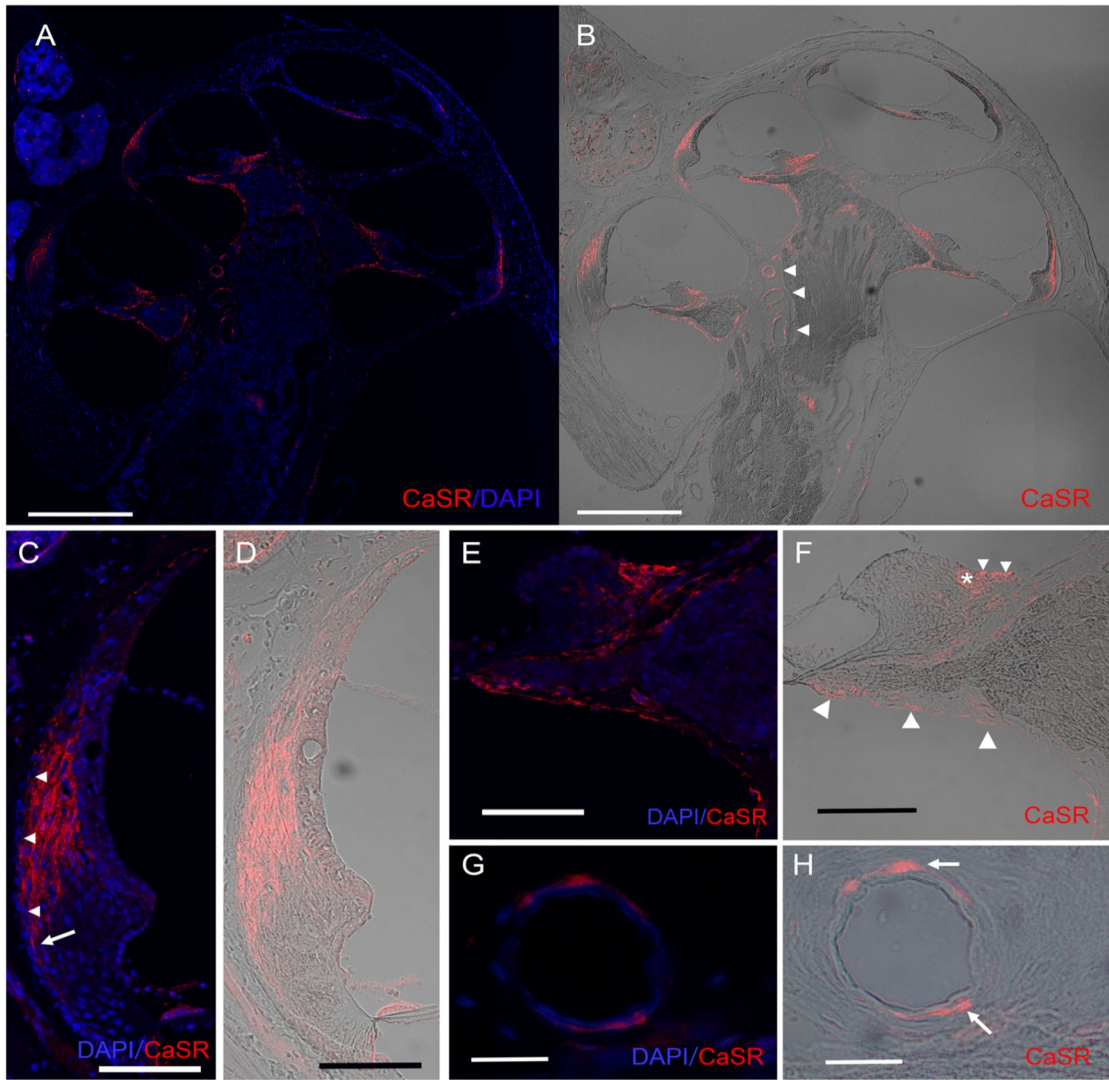


図2 免疫染色

- A, B 全体像 ラセン靭帯、ラセン軸動脈（矢印）、ラセン板縁に発現 scale bar, 500 μ m
 C, D ラセン靭帯での発現 scale bar, 100 μ m
 E, F ラセン板縁での発現 scale bar, 100 μ m
 G, H ラセン軸動脈での発現 scale bar, 25 μ m

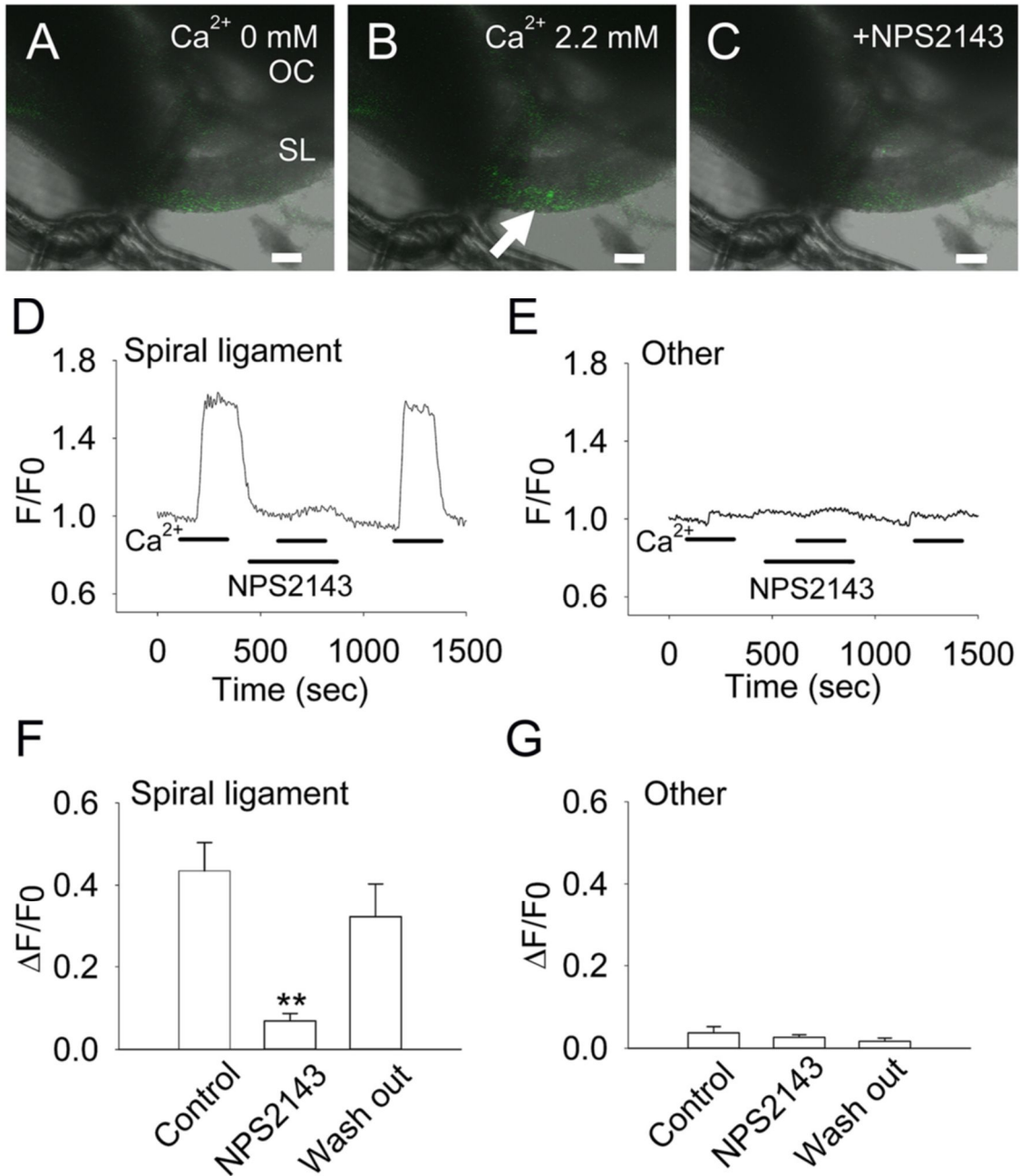


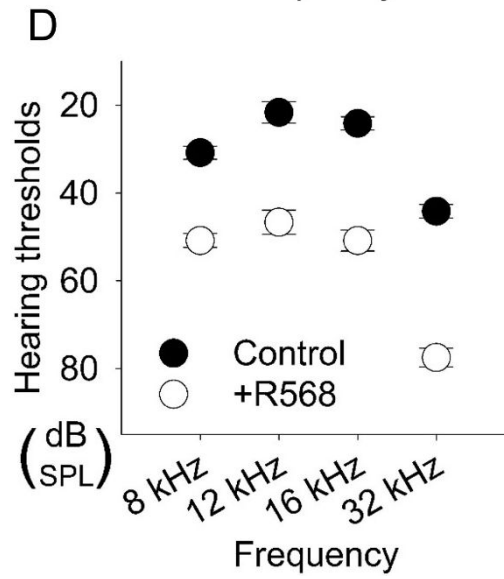
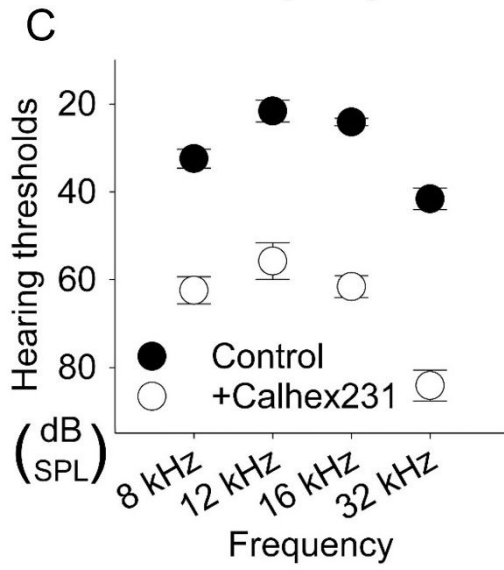
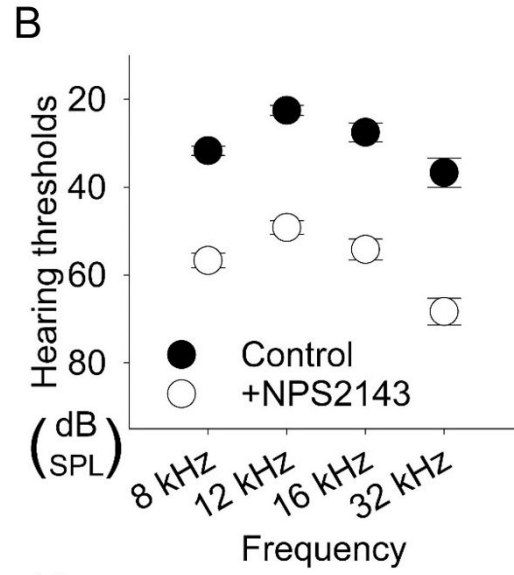
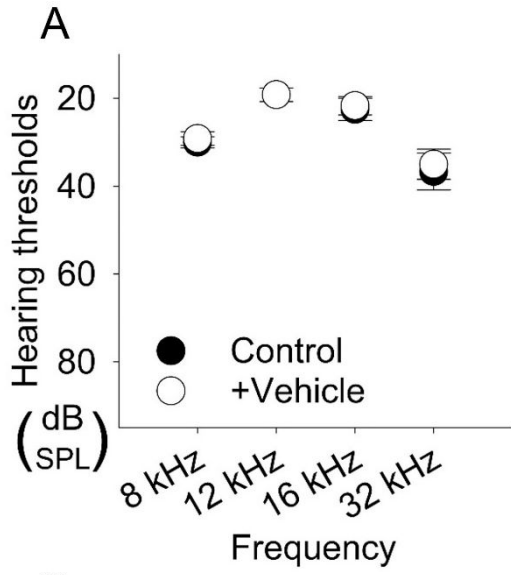
図3 カルシウムイメージング

A, B, C 代表的なイメージング

D, E, F, G 細胞外カルシウム負荷とNPS-2143負荷によるラセン靱帯(D, F)とその他部位(E, G)でのカルシウム濃度の変化。

(4) ABRによる聴力測定

CaSR阻害薬のNPS-2143、CaIhex231、CaSR作動薬のR-568、コントロールとしてDMSOをそれぞれ正円窓経由に投与し投与前及び投与後60分後の聴力閾値を測定した(図4)。コントロール群では投与前と投与後60分後で聴力閾値に差は認めなかったが(図4A)、NPS-2143、CaIhex231、R-568を投与した群ではいずれも聴力閾値の上昇を認めた(図4B-D)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshiya Minakata Akira Inagaki Aya Yamamura Hisao Yamamura Shinji Sekiya Shingo Murakakami	4. 巻 12
2. 論文標題 Calcium-Sensing Receptor is functionally expressed in the cochlear perilymphatic compartment and essential for hearing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2019.00175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------