

## 148. 加齢性難聴の病態解明を志向した蝸牛イオン動態の解析

任 書晃

新潟大学 医学部 分子生理学

Key words : 蝸牛内リンパ液高電位, 蝸牛 K<sup>+</sup>循環, 数理モデル, 電気生理学

### 緒 言

「内耳蝸牛」は、音の受容のため高度に分化した臓器である。蝸牛は内・外二種類の異なるリンパ液で満たされている。外界から内耳蝸牛に達した音は、基底板を振動させる (図 1A)。音の一次受容器である基底板上の有毛細胞は、基底側膜が通常の細胞外液である外リンパ液に、感覚毛を有する頂上膜が内リンパ液に浸っている。内リンパ液は、150 mM の高 K<sup>+</sup>濃度と + 80 mV の高電位を示す<sup>1)</sup>。音刺激による基底板の振動により感覚毛が屈曲すると、内リンパ液の K<sup>+</sup>は感覚毛頂部の陽イオンチャネルの開口を介して有毛細胞へ流入し、細胞を興奮させる。これが音伝達の端緒となり、音の機械的刺激は電気信号に変換され、脳へ伝播される。内リンパ液高電位は、有毛細胞体との間に大きな電位差を作ることで K<sup>+</sup>流入を増幅し、有毛細胞の鋭敏性を保っている。この電位の消失により難聴が惹起される。有毛細胞に流入した K<sup>+</sup>は、基底側膜の K<sup>+</sup>チャネルを通じて外リンパ液へ放出され、上皮組織である血管条によって内リンパ液へ循環すると指摘されている。このイオン輸送システム「K<sup>+</sup>循環」は、内リンパ液高電位を維持する機構である。

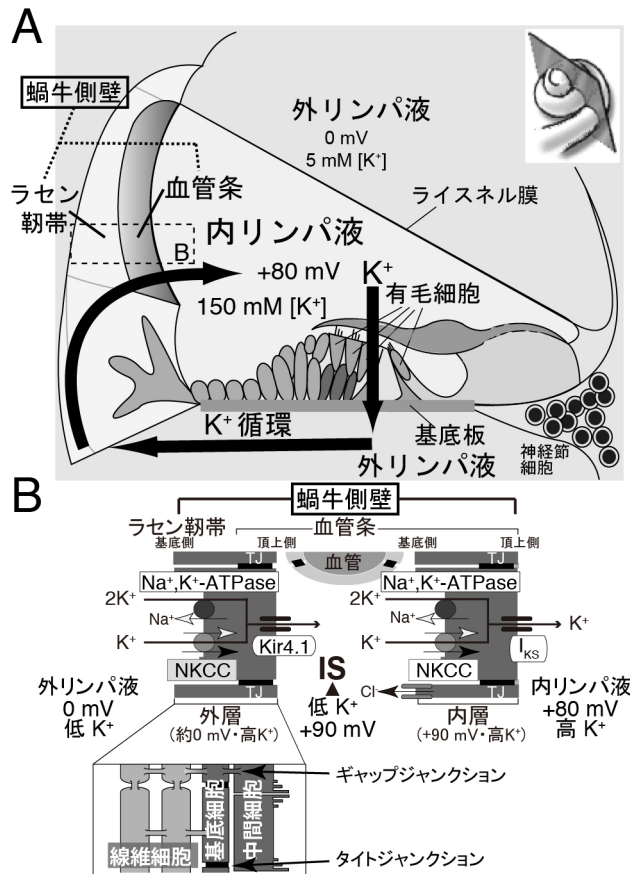


図1. 内耳蝸牛と血管条の構造

(A) 蝸牛を縦切り（右上図）にした断面図。(B) 血管条の拡大図（点線四角）。K<sup>+</sup>循環・内リンパ液高電位の維持に関わる血管条の輸送分子も示す。血管条は、機能的に内外二層から構成される。IS: intrastrial space、NKCC: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup>共輸送体、TJ: タイトジャンクション。文献9から改変。

以前より、この機構は蝸牛側壁の組織である「血管条」が駆動するK<sup>+</sup>輸送に立脚すると考えられてきた（図1A）。血管条は、辺縁細胞・中間細胞・基底細胞の3種類の細胞から構成される（図1B）。中間・基底細胞と、その隣にあるラセン靭帯の線維細胞は、ギャップジャンクションという「穴」で繋がっているため、全て等しい電位・イオン環境を示す合体体と見なすことができる。また、辺縁細胞間と基底細胞間には、腎臓や消化管の上皮と同じくタイトジャンクションというバリア構造が存在している。以上より、血管条は、機能的に2つの上皮層、すなわち、辺縁細胞からなる内層と中間・基底・線維細胞からなる外層から構成されていると見なすことができる（図1B）。本稿では便宜的に外層＝線維細胞とする。組織学的検討や、薬理的・電気生理学の実験などから、各層の基底側には、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase・Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup>共輸送体（NKCC）のK<sup>+</sup>輸送体が、頂上側にはK<sup>+</sup>チャネル（外層：Kir4.1、内層：IKS）が分布していることが明らかになっている<sup>2-6)</sup>（図1B）。これらの輸送分子は、内リンパ液の電気・イオン環境に不可欠であり、それらの阻害薬は実際に難聴を引き起こすことが知られていたが、難聴の機序の多くが謎であった<sup>2)</sup>。

## 方法

本研究計画では、コンピュータシミュレーションを用いた理論科学実験と、モルモットを用いた電気生理学実験とを相補的に活用している。以下にそれぞれの結果を個別に記述する。コンピュータシミュレーションでは、MATLABを用いた数値計算を行った。電気生理実験では、生後5週齢以降のモルモットを用いて、全身麻酔下に蝸牛側壁のK<sup>+</sup>濃度と電位測定を行った。K<sup>+</sup>電極は、電位と同時測定できる二連管のガラス電極を用いた。電極性能をチェックするため、実験の前後において、濃度が既知のK<sup>+</sup>基準溶液を用いて検定した。

## 結果

### 1. 理論科学実験～新規蝸牛 K<sup>+</sup>循環数理モデルの構築

イオン輸送体に依存して変化する膜電位と膜を介した電流の動態は、電気回路で表現できるため、計算式で表すことができる。我々は以前の実験結果をもとに、各膜上の輸送分子を回路で示し、有毛細胞を電球、内リンパ液電位を電池、K<sup>+</sup>循環を電流とみなした、血管条の K<sup>+</sup>輸送と蝸牛の K<sup>+</sup>循環を再現した数理モデル「NHK model」を構築し、動脈経路で阻害薬を投与した際の電位・K<sup>+</sup>濃度動態の再現に成功した<sup>7)</sup>。しかし、このモデルでは外リンパ液経路でウアバインを投与した時の外層（線維細胞）の変化は再現できない<sup>8)</sup>。

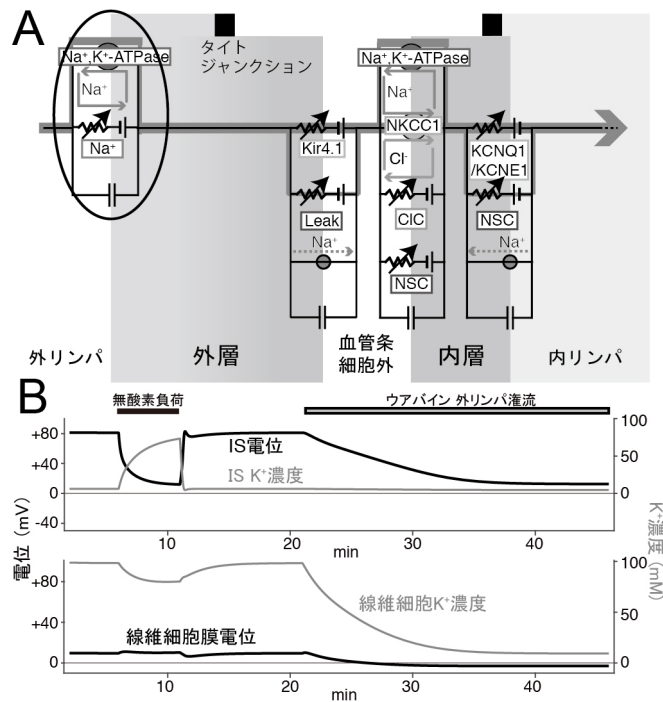


図2. 新規数理モデル (fi-NHK model) による蝸牛 K<sup>+</sup>循環のシミュレーション

- (A) 外層（線維細胞）部を改訂した新規等価電気回路。Na<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup>選択性（電流）チャネル、Leak: Leak（電流）チャネル。  
 (B) 正常時、無酸素負荷、ウアバイン負荷（外リンパ灌流）時における各区分の電位 (a, 黒線) と K<sup>+</sup>濃度 (b, c 灰色線) のシミュレーション結果。

そこで、新たに得られた実験結果に基づいて<sup>9,10)</sup>、線維細胞膜に発現するイオン輸送体を設定した新規蝸牛 K<sup>+</sup>循環数理モデル「fibrocytes-integrated NHK model: fi-NHK model」を構築した (図 2A)。fi-NHK model では、線維細胞膜において Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase が輸送する Na<sup>+</sup> を局所でリサイクルできる Na<sup>+</sup> 選択性（電流）チャネルを仮定し、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase が IS 方向へ K<sup>+</sup> を輸送できるように設定した。正常状態と線維細胞 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の阻害時における内リンパ液と IS の電位、線維細胞電位・K<sup>+</sup>濃度の計算結果を図 2B に示す。無酸素負荷およびウアバイン外リンパ灌流時に見る線維細胞の電位の安定と K<sup>+</sup>濃度低下を上手く再現することができた。

### 2. 電気生理実験～新規数理モデルにおける仮定の検証

確かに、新しい仮定を置いた数理モデルは、これまでに計測された実験結果をよく再現する。しかし、この仮定が妥当であるかを検証する必要がある。この検証のため、我々は再び動物を用いて実験を行った。線維細胞膜に Na<sup>+</sup> 選択性チャネルのみを設定した膜では、細胞外の Na<sup>+</sup> 依存的に膜電位が変化するはずである。そこで、線維細胞を浸す外リンパ液に異なる濃度の Na<sup>+</sup> 溶液を灌流し、この時の線維細胞の膜電位変化を計測した。低 Na<sup>+</sup> 濃度の人工外リンパ液を灌流すると、正常状態では数 mV の正の膜電位を示す線維細胞電位は (図 3A: 矢頭)、-40 mV の大きな負の膜電位として計測された (図 3B: 矢頭)。Na<sup>+</sup> 以外のイオン透過性を検証するため、高い K<sup>+</sup> 濃度や低い Cl<sup>-</sup> 濃度の人工外リン

パ液を灌流し、この時の線維細胞の電位を計測すると、電位に大きな変化は観察されなかった（データ示さず）。これらの実験結果は、線維細胞膜が、特に Na<sup>+</sup>を優位に透過させる膜であることを示唆している。

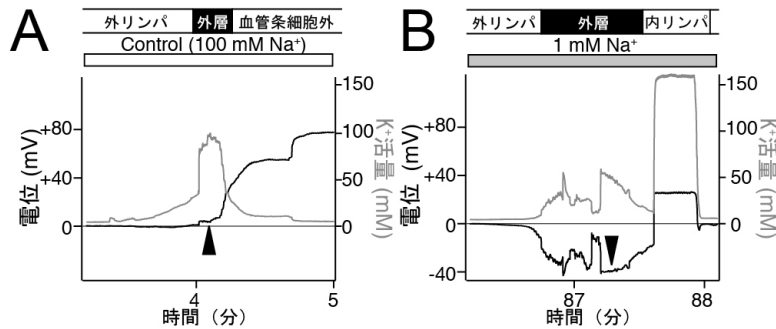


図3. 低 Na<sup>+</sup>溶液を外リンパ灌流時の外層電位変化

(A) 正常状態の K<sup>+</sup>電極による内層 K<sup>+</sup>濃度と電位。(B) 低 Na<sup>+</sup>溶液を外リンパ灌流した時の内層 K<sup>+</sup>濃度と電位。灌流前に比べて、灌流後は電位の著明な低下を示す。

## 考 察

数理モデルによって予測され、実験によって検証された外層の Na<sup>+</sup>選択性（電流）チャンネルとは、一体どのような分子なのであろうか。これまでに、上皮性 Na<sup>+</sup>チャンネル（ENaC）が線維細胞に発現していることが報告されているが、その阻害薬であるアミロライドの灌流実験は内リンパ液電位に影響がない。その他、薬理的に寄与を検証可能な Na<sup>+</sup>チャンネルの関与も現在否定的である。ここに、数理モデルによって薬剤の有無に捉われずに予測を立てる大きな意義があると考えられる。今後より詳細な生命現象を再現できる数理モデルへとアップデートを行えば、様々な病態を理論的に抽出でき、疾患標的分子を予測することも可能となる。標的分子の候補には、近年報告がなされつつあるタンパク質の網羅的解析法による研究成果も今後大きく寄与するであろう。将来的に原因不明の聴覚疾患の病因究明や難聴に対する新しい治療法の開発を進めるには、今回のように実験科学と計算科学を相補的にフィードバックさせる研究手法が極めて有効であると考えられる。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科分子生理学の日比野浩、吉田崇正、緒方元気、上塚学、新潟大学工学部電気電子工学科の崔森悦、大阪大学大学院医学系研究科分子細胞薬理学の村上慎吾、倉智嘉久である。

## 文 献

- 1) Bekesy G. DC resting potentials inside the cochlear partition. *J Acoust Soc Am.* 1952;24: 72-76. doi: 10.1121/1.1906851.
- 2) Kusakari J, Ise I, Comegys TH, Thalmann I, Thalmann R. Effect of ethacrynic acid, furosemide, and ouabain upon the endolymphatic potential and upon high energy phosphates of the stria vascularis. *Laryngoscope.* 1978 Jan;88(1 Pt1):12-37. PubMed PMID: 619186.
- 3) Marcus DC, Rokugo M, Thalmann R. Effects of barium and ion substitutions in artificial blood on endocochlear potential. *Hear Res.* 1985 Jan;17(1):79-86. PubMed PMID: 3997684.
- 4) Sakagami M, Fukazawa K, Matsunaga T, Fujita H, Mori N, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cellular localization of rat Isk protein in the stria vascularis by immunohistochemical observation. *Hear Res.* 1991 Nov;56(1-2):168-72. PubMed PMID: 1663105.
- 5) Ando M, Takeuchi S. Immunological identification of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res.* 1999 Oct; 298(1):179-83. PubMed PMID: 10555552.
- 6) Hibino H, Kurachi Y. Molecular and physiological bases of the K<sup>+</sup> circulation in the mammalian inner ear. *Physiology (Bethesda).* 2006 Oct;21:336-45. Review. PubMed PMID: 16990454.
- 7) Nin F, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. The endocochlear potential depends on two K<sup>+</sup> diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A. 2008 Feb 5;105(5):1751-6. doi: 10.1073/pnas.0711463105. PubMed PMID: 18218777; PubMed Central PMCID: PMC2234216.
- 8) Nin F, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. The endocochlear potential depends on two K<sup>+</sup> diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 5;105(5):1751-6. doi: 10.1073/pnas.0711463105. PubMed PMID: 18218777; PubMed Central PMCID: PMC2234216. doi: 10.1073/pnas.1120067109.
  - 9) Adachi N, Yoshida T, Nin F, Ogata G, Yamaguchi S, Suzuki T, Komune S, Hisa Y, Hibino H, Kurachi Y. The mechanism underlying maintenance of the endocochlear potential by the K<sup>+</sup> transport system in fibrocytes of the inner ear. *J Physiol*. 2013 Sep 15;591(18):4459-72. doi: 10.1113/jphysiol.2013.258046. PubMed PMID: 23836687; PubMed Central PMCID: PMC3784193.
  - 10) Yoshida T, Nin F, Ogata G, Uetsuka S, Kitahara T, Inohara H, Akazawa K, Komune S, Kurachi Y, Hibino H. NKCCs in the fibrocytes of the spiral ligament are silent on the unidirectional K<sup>+</sup> transport that controls the electrochemical properties in the mammalian cochlea. *Pflugers Arch*. 2015 Jul;467(7):1577-89. doi: 10.1007/s00424-014-1597-9. PubMed PMID: 25143138.