

## 聴覚に必須な蝸牛らせん靭帯におけるカリウムイオン動態の包括的解析

任 書晃, 吉田 崇正, 日比野 浩

新潟大学大学院医歯学総合研究科

**概要** 音を受容する内耳蝸牛は、体液に含まれる塩類の $K^+$ によりシグナル伝達が行われる稀な臓器である。蝸牛を満たす内リンパ液は、細胞外液でありながら 150 mM の高  $K^+$  濃度と +80 mV の高電位「内リンパ液高電位」を示す特殊な体液である(図1)。蝸牛では、音の機械的刺激により、内リンパ液に接する有毛細胞の感覚毛の陽イオンチャネル(MET チャネル)が大きく開口し、 $K^+$ が流入することで細胞が電気興奮する。内リンパ液高電位は、 $K^+$ 流入の駆動力を増大し、聴覚の高感受性に寄与している。 $K^+$ は有毛細胞から基底側膜の  $K^+$ チャネルを通じて放出される。

我々は、これまでの電気生理実験により、内外2層からなる上皮組織「血管条」の特定の  $K^+$  輸送分子が、この高電位の成立に不可欠であることを見出した。また、有毛細胞の  $K^+$  電流の経路と血管条の  $K^+$  輸送分子を介した  $K^+$  電流の経路を、共に数式化した上で、コンピュータ上において一つの回路として繋いだ数理モデルにより、臓器レベルの蝸牛「 $K^+$ 循環」が内リンパ液高電位と  $K^+$  恒常性に必須であることを実証した。

これまで内リンパ液高電位の成立には、主に血管条を対象として実験が進められ、外層を構成する「らせん靭帯」はあまり注目されてこなかった。しかし、この部位を構成する線維細胞に観察される +5 ~ 10 mV の持続的脱分極性電位は、極めて特異的であり、かつ、内リンパ液高電位に不可欠であるにも関わらず、その細胞膜の特性はこれまで十分に明らかにされていない。我々は平成 25 年度のソルト・サイエンス財団からの助成により、らせん靭帯の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase が  $K^+$  循環に寄与することを生動物において実証し(Adachi *J Physiol* 2013:業績 1)、さらに、組織学的に発現が証明されていた  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  共輸送体は殆ど貢献しないことを示した(Yoshida *Pflugers Arch* 2014:業績 2)。本研究では、これらの実験結果に依拠して計算科学を駆使したらせん靭帯の新規数理モデルを構築した。また、数理モデルから得られる予測を、電気生理学的手法を駆使して実験による実証を行った。

これらの成果は、らせん靭帯の異常が原因の一つと指摘されている難聴の病態理解に大きく寄与すると考える。

### 1. 研究目的

#### 1.1 研究の背景

聴覚は生物にとって必須の感覚であり、音を受容・増幅するために分化した器官が、内耳蝸牛である。我国には、現在約 600 万人の内耳性聴覚障害患者が存在する。高齢化の半分が罹患する加齢性難聴も内耳疾患であり、これらの疾患から痴呆の進行、さらには生活の質が大きく損なわれる。高齢化社会を迎え、今後その疾患患者数は増加の一途を辿ることが予想され、病態の解明と治療法の開発が急務である。

将来的に効果的な治療法を開発するため、未だ不明な

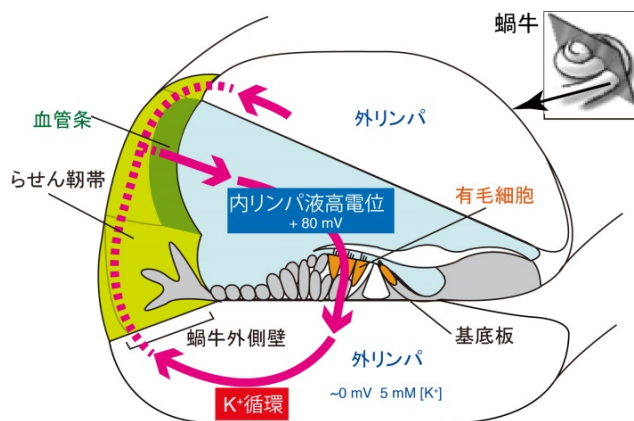


図1. 内耳蝸牛内に備わる内リンパ液高電位と  $K^+$  循環

点が多い聴覚機能の仕組みの解明に取り組んだ。内リンパ液高電位は感覚細胞の鋭敏性を増強し、 $K^+$ 循環は内耳内イオン環境の恒常性維持に不可欠である。本研究では、その内耳機能への寄与が未解明な組織である蝸牛「らせん靭帯」を対象とし、理論科学的・電気生理学を駆使した内耳の基礎的研究を進めた。

## 1. 2 研究目的

らせん靭帯を構成する線維細胞の膜電位は、正常状態で $+5\sim 10$  mVと持続的に脱分極しており、この電位が内リンパ液高電位の基盤となっている。線維細胞に発現する $K^+$ 輸送分子「 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase」を含め、どのようなイオン透過特性によって持続的脱分極性電位が成立するのかを理論科学と電気生理実験により実証する。

## 1. 3 研究の意義

内リンパ液電位の成立基盤とされている線維細胞の膜電位の成立メカニズムを、 $K^+$ 輸送分子「 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase」を含めた数理モデルにより定量的に解明することにより、「らせん靭帯」が聴覚の成立に関わるメカニズムを明らかにし、将来的な難聴疾患の解明に寄与する。

## 2. 研究方法

### 2. 1 実験材料

理論科学的手法として、過去に申請者が構築した内リンパ液高電位の数理モデル「Nin-Hibino-Kurachi モデル (NHK モデル)」を基礎に、らせん靭帯部位をアップデートした。また、電気生理学的手法として、生動物であるモルモットを用いた。局所麻酔にて動物に気管切開を施し、人工呼吸器に繋ぐ。そののち、全身麻酔下に電気生理学的実験を行う。

### 2. 2 改訂 NHK モデルの構築

MATLAB プログラムを用いて、コンピュータ・シミュレーションを実行した。

### 2. 3 ダブルバレル・ $K^+$ イオン電極の作成

$K^+$ 濃度と電位を同時に測定することのできるダブルバレル・ $K^+$ イオン電極を用いた。実験前にそれぞれの電極について、 $K^+$ 濃度と拡散電位との関係を示す検量線を作成する。

### 2. 4 $K^+$ イオン電極法による $K^+$ 濃度および電位の *in vivo* 測定

全身麻酔下のモルモットの内耳を露出し、蝸牛壁に微

小な穴を作成する。その穴から、作成した  $K^+$ イオン電極を挿入する。

## 2. 5 異なるイオン濃度を持つ人工外リンパ液の灌流

線維細胞膜のイオン透過特性を明らかにするため、通常の細胞外液と異なり、高い  $K^+$ 濃度、低い  $Na^+$ 濃度、および高い  $Cl^-$ 濃度を持つ人工外リンパ液を準備し、外リンパへと灌流した。

## 3. 研究結果

内リンパ液高電位の成立には、内・外二層の上皮細胞層から成る血管条が必須である。各層には、基底側膜に  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase や  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$ 共輸送体 (NKCC) などの  $K^+$ 取込み輸送体が、頂上膜に  $K^+$ チャネルが分布する (図 2)。内リンパ液高電位については、2 層に挟まれた幅 15 nm の血管条細胞外空間 (IS: Intrastrial space) で観察される  $+90$  mV の電位が深く関わるとされてきた。近年我々は、実験科学的手法を用い、これまで EP に貢献するとされてきたらせん靭帯の NKCC は、実際にはその貢献は少ないことを明らかにした。この結果を元に、新たな数理モデルを構築した。

### 3. 1 $Na^+$ , $K^+$ -ATPase を含んだらせん靭帯線維細胞膜のイオン透過性モデル

らせん靭帯に発現する  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase がシンシチウムの細胞内  $K^+$ 濃度と電位に貢献していることを明が明らかになったため、これを含みつつ持続性分極性電位が再現できるイオン透過特性をシミュレーションした。 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase が輸送する  $Na^+$ を  $Na^+$ 透過性および Leak 透過

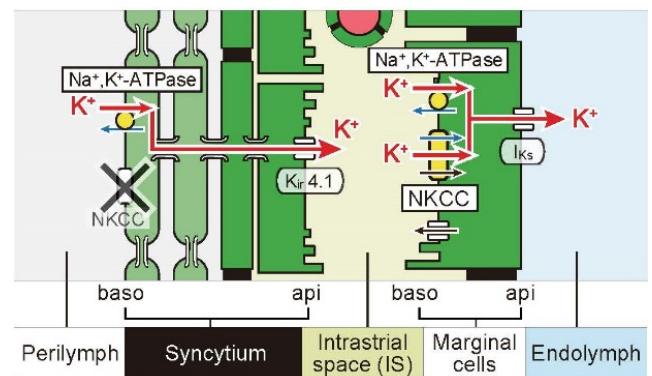


図 2. EP に貢献する蝸牛外側壁の  $K^+$ 輸送分子の新しい模式図

性( $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ を非選択的に透過)がリサイクルすると仮定した(図3)。透過性のコンダクタンス比を $\text{Na}^+:\text{Leak}=2:1$ とした時、実験においてAnoxia時に観察される線維細胞膜電位および $\text{K}^+$ 濃度を再現しえた(図4)。

### 3.2 らせん靱帯線維細胞膜のイオン透過性の電気生理学的検証

数理モデルにおいて仮定した線維細胞膜の特性を実験により検証した。蝸牛外側壁にイオン電極を刺入し、線維細胞の $\text{K}^+$ 濃度と電位を計測した。一方で、通常のガラス電極で内リンパ液電位も同時にモニターした。この状態でイオン濃度組成の異なる人工外リンパ液を灌流した(図5A)。コントロール溶液を灌流すると内リンパ液電位に変化は見られなかった。次に、低い $\text{Na}^+$ 濃度組成を持つ人工外リンパ液を灌流すると、内リンパ液電位は低下した。この時、イオン電極を刺入すると60~70 mM程度の $\text{K}^+$ 濃

度を確認し線維細胞であることを確認した。この時、電位は-30 mVの大きな過分極性電位を認めた。また、この変化は外リンパに再び正常の組成を持つ外リンパ液を灌流

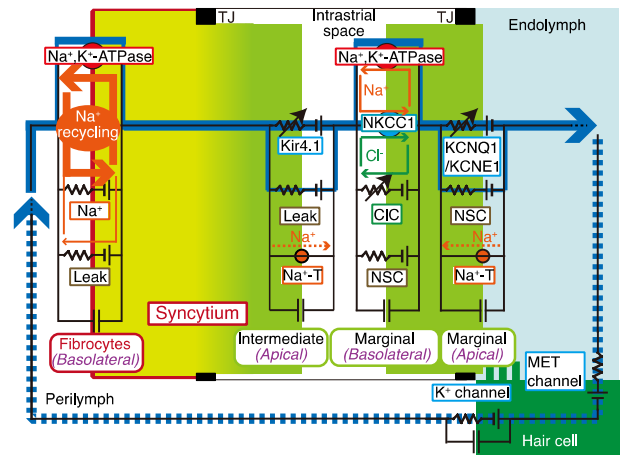


図3. 新しいNHKモデルの回路図

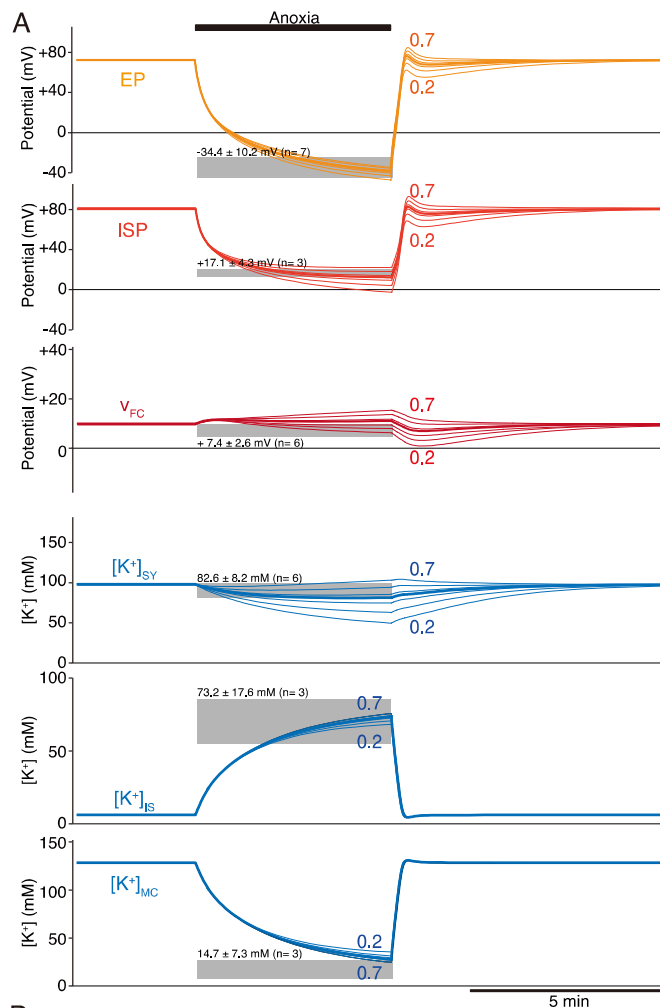


図4. 阻害薬投与時の内リンパ液電位(EP)、血管条内電位(ISP)、線維細胞電位(V<sub>FC</sub>)、線維細胞内、血管条細胞外空間、辺縁細胞の $\text{K}^+$ 濃度のシミュレーション

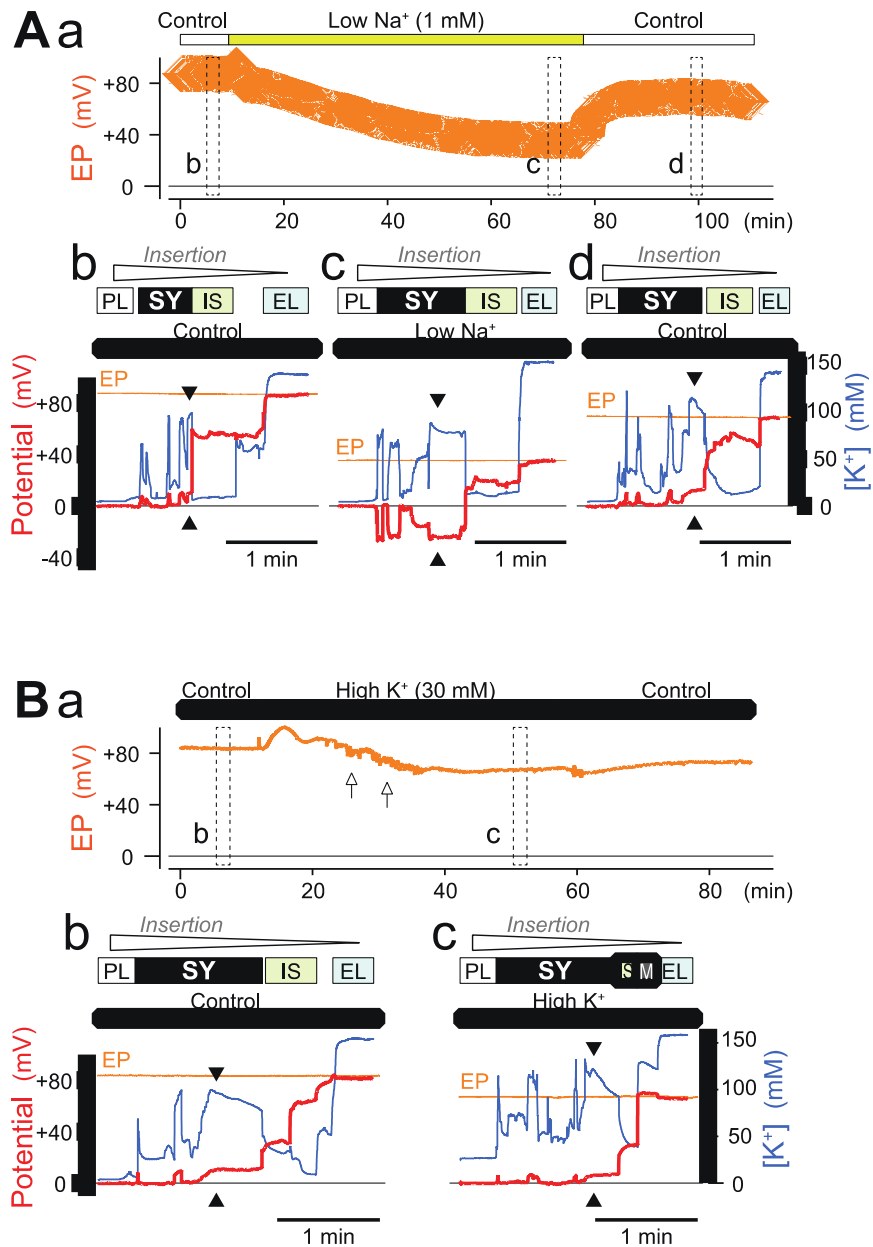


図 5. 種々のイオン濃度の人工外リンパ灌流時の内リンパ液高電位と、繊維細胞内  $K^+$ 濃度と電位

すると、元に戻った。次に、高い  $K^+$ 濃度組成を持つ人工外リンパ液を灌流すると、内リンパ液電位は若干低下した(図 5B)。この時、イオン電極を繊維細胞に刺入すると電位は正常状態と同様の電位を確認した。この変化は、通常の細胞外液と  $Cl^-$ 濃度の異なる人工外リンパ液を灌流した時にも、ほぼ同様の反応であった。

これらの結果は、繊維細胞膜における  $Na^+$ イオン透過性が、 $K^+$ や  $Cl^-$ に比べて大きいことを示唆しており、この事実は、先に数理モデルにおいて予測した繊維細胞膜のイオン透過性とよく合致する。

## 文献

- 1) 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  $K^+$ -transport system in the fibrocytes of the inner ear. *J Physiol.* 591(18): 4459-4472, 2013.
- 2) Yoshida T, Nin F, Ogata G, Uetsuka S, Kitahara T, Inoahra H, Akazawa K, Komune S, Kurachi Y, Hibino H. *Pflügers Arch.* 467(7): 1577-1589, 2015.

## Experimental and Theoretical Analysis of $K^+$ Dynamics in the Cochlear Spiral Ligament Essential for Auditory System

Fumiaki Nin, Takamasa Yoshida, Hiroshi Hibino

Niigata University

### Summary

The endocochlear potential (EP) of +80 mV in the scala media, which is indispensable for audition, is controlled by  $K^+$  transport across the lateral cochlear wall. This wall includes two epithelial barriers, the syncytium and the marginal cells. The former contains multiple cell types, such as fibrocytes, which are exposed to perilymph on their basolateral surfaces. The apical surfaces of the marginal cells face endolymph. The fibrocytes have a unique continuous depolarized membrane potential of +5~10 mV. Although the membrane potential seems to contribute to the EP, the mechanism remains uncertain. We previously found that the  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase in fibrocytes mainly contributes to the EP and  $K^+$  transport in cochlea. Based on the studies, we first developed new mathematical model of the lateral cochlear wall and hair cells which form  $K^+$ -circulation in cochlea.

Simulation produced that the fibrocytes have large  $Na^+$  permeability than the other ion permeability such as  $K^+$  or  $Cl^-$ . We next performed the electrophysiological studies for confirming the results of the simulation. We examined the membrane potential of the fibrocytes of living guinea pigs with electrodes sensitive to potential and  $K^+$  while perfusing into the perilymph artificial perilymph containing various ionic concentrations. Perfusing low  $Na^+$  solution greatly decreased membrane potential of fibrocytes, to the contrary, perfusion of high  $K^+$  or low  $Cl^-$  solutions did not make significant change. These experimental results are consistent with the simulation.