

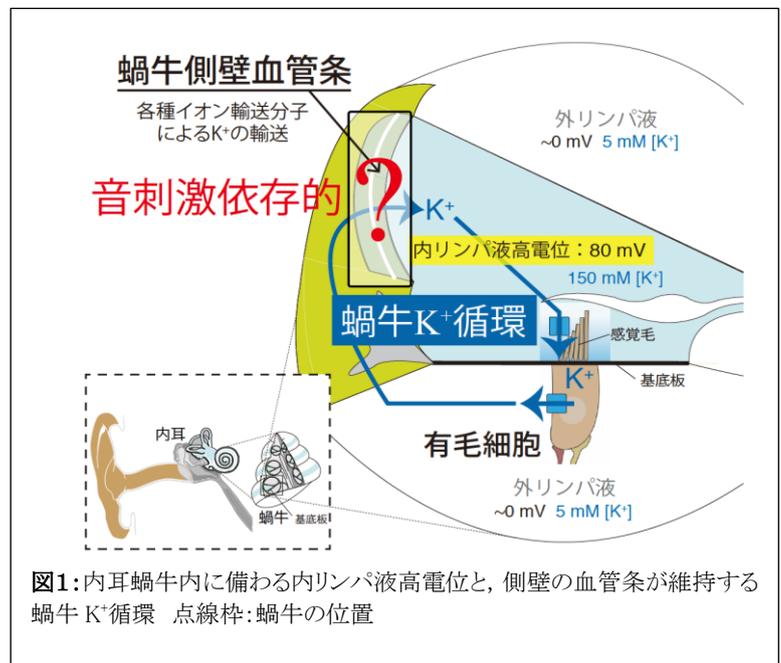
蝸牛側壁血管条カリウム輸送機構の音刺激依存性の解析

任 書晃, 張 奇, 日比野 浩

新潟大学大学院医歯学総合研究科分子生理学分野

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 $+80\text{ mV}$ 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ンネル(METチャンネル)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^+ チャンネルを通じて放出される。内リンパ液高電位は音刺激時に変動し、有毛細胞がその主要な要因とされる。そのため、有毛細胞機能の検査として、この電位変動を心電図のように測定する「蝸电图検査」が臨床的に活用されてきた。

我々はこれまでに、内リンパ液高電位には、有毛細胞だけでなく蝸牛の上皮組織「血管条」を含めた K^+ 輸送「蝸牛内 K^+ 循環」が必須であることを、貴財団からの助成により明らかにしてきた(Nin *PNAS* 2012, Nin *npj Syst Biol Appl* 2017)。このコンセプトに基づけば、蝸电图検査には、有毛細胞だけでなく血管条機能が反映すると予測された。そこで、本研究では、蝸电图検査における計測結果の成立機構を解明する基礎研究を行った。まず、音刺激による電位変化が血管条のカリウム動態に依存するという仮説を立てた。これを実証するため、生きた動物に様々な音圧レベルの音を負荷しながら、血管条内の電位と K^+ イオンを同時に計測した。その結果、上で、内リンパ液電位の変化が、蝸电图検査で計測される「加重電位」と同じ挙動を示すことが証明された。従来、「加重電位」は有毛細胞機能を反映するものと理解されてきた。そこで、オプトジェネティクスにより血管条に光により開口するチャンネルロドプシン2を発現させた遺伝子操作マウスを活用し、「加重電位」が血管条機能に依存することを実証した。成果は、難聴の医学・生理学に寄与するだけでなく、蝸电图検査の意義が見直されることで、臨床において再び難聴の診断に活用されることが期待される。



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や、後天的に不可逆

な疾患である突発性難聴や音響外傷も内耳疾患であり、これらの疾患の治療が進まないことにより、多くの患者の生活の質が損なわれている。したがって、難聴病態の解明と治療法の開発は急務である。

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てきた。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)、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)。また、27年度の助成研究では、これらの実験結果に依拠して血管条およびらせん靭帯の新規数理モデルを構築した。さらに、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(Nin *NPJ Syst Biol Appl* 2018:業績3)。これらの成果から、過去に臨床で用いられてきた蝸電図検査には、有毛細胞だけでなく血管条機能が反映することが予測された。

1.2 研究目的

これまで血管条の機能と音刺激の関係は不明であった。本研究では、*in vivo* 電気生理実験を駆使して血管条内の電位・カリウム動態を記録しながら、様々な周波数と強度の音を与えた時の変化を記録する。また、過去に蝸牛の非侵襲的生理検査として臨床でも利用されていた「蝸電図(Electrocochleogram)」にも着目する。蝸電図には、音刺激に応じて電位の直流成分が変化する「加重電位(Summing potential :SP)」が含まれることが知られる。音刺激時の内リンパ液電位にも現れるこの加重電位の成因は従来不明であったが、血管条内電位の変化との比較を通して、これを解明する。

1.3 研究の意義

これまで、蝸牛内の聴覚の一時受容細胞である有毛細胞や、そこに投射する神経細胞の機能が、音圧や周波数に依存していることが知られている。そのため、様々な疾患に見られる周波数依存性の難聴は、これらの細胞の障害が主な病因と考えられてきた。一方、我々が着目している血管条の機能は、音圧や周波数による影響を受けるか

否かは現在まで知られていない。血管条機能も音による影響を受けることを K^+ イオン電極法を用いた電気生理実験により定量的に解析することにより、血管条の障害が周波数別の難聴の成立に関わる可能性を明らかにする。また、加重電位の成因が解明されることにより、近年は臨床での活用が減少している蝸電図に新たな臨床的意義を見いだす。

2. 研究方法

2.1 実験材料

電気生理学的手法として、生動物であるモルモットおよび遺伝子改変マウスを用いた。遺伝子改変マウスは、血管条特異的にチャネルロドプシン2を発現させたマウスである。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の実験を行う。

2.2 ダブルバレル・ K^+ イオン電極の作成

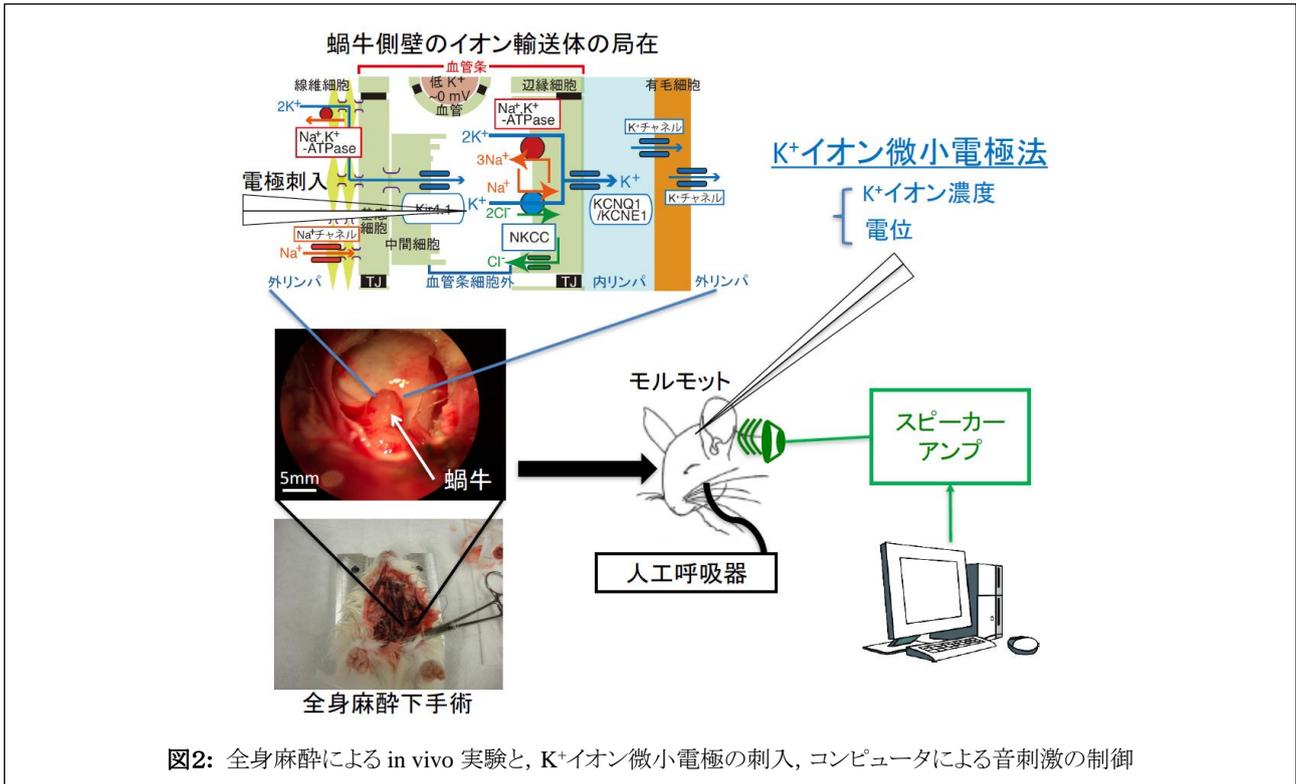
K^+ 濃度と電位を同時に測定することのできるダブルバレル・ K^+ イオン電極を用いた。実験前にそれぞれの電極について、 K^+ 濃度と拡散電位との関係を示す検量線を作成する。

2.3 K^+ イオン電極法による K^+ 濃度および電位の *in vivo* 測定

生きたモルモットの内耳蝸牛側壁血管条に、ダブルバレル・ K^+ イオン電極を刺入する。その上で、電極を刺入した部位を刺激できる周波数の音を動物に負荷する。この時、音刺激に応じて、電位・ K^+ イオン濃度が変化することを計測する。異なる大きさの音が入力された際に、血管条のイオン・電位環境が如何に変化するかを計測し、仮説を実証する(図2)。

2.4 遺伝子改変マウスを用いた蝸電図(加重電位)の計測

全身麻酔下に遺伝子改変マウスの内耳を露出し、白銀電極を蝸牛頂回転上に留置する。その上で、様々な周波数と音圧の音刺激を加え、計測された電位変化の直流成分を抽出する。さらに、蝸牛に光刺激を与え、その前後で加重電位の変化を記録する。



3. 研究結果

3.1 血管条細胞外空間における音刺激時の電位・K⁺の動態

血管条細胞外空間は, 外リンパ液を基準として+80 mVと高い電位を持ち, かつ, K⁺濃度が低い空間として知られている。我々は, ここにダブルバレル K⁺イオン電極を挿入, 留置し, 電位と K⁺濃度の変化を記録した。蝸牛の電極刺入点に対応した周波数(1 kHz)の音を, 60~100 dBにわたって動物に与えた。その結果, 音圧の変化に応じて, 電位だけでなく K⁺濃度が変化することが計測された(図3)。これらの変化は, 音圧が大きいほど大きい。

過去我々は音刺激のない状況において, 血管条細胞外空間の電位が血管条に発現する K⁺イオンチャンネルを介した K⁺拡散電位に大きく関与することを示した(Nin *PNAS* 2008)。そこで, この関係が音刺激時にも成立するか否かを, ネルンスト電位の計算から検討した。その結果, 計算から予測される電位と, 実測された血管条細胞外空間の電位とは非常によく一致した。したがって, 音刺激時の血管条細胞外空間の電位変化は, 血管条細胞外空間の K⁺濃度の変化に主に起因するものであることが証明された。

3.2 内リンパにおける音刺激時の電位・K⁺の動態

次に, 上記同様の音刺激時の電位・K⁺濃度変化は, 内リンパにおいても観察されるか否かを検討した。ダブルバレル K⁺イオン電極を内リンパまで挿入し, 電位と K⁺濃度の変化を記録した。その結果, 血管条細胞外空間での計測時とは異なり, 音刺激に応じて電位は変化したが, K⁺濃度は変化しなかった(図4)。また, 電位変化は, 血管条細胞外空間において計測された変化とほぼ同じ変化を示すことが判明した。

この結果は, 音刺激時の内リンパ電位の変化が, 血管条細胞外空間の K⁺濃度変化に起因する血管条細胞外空間電位の変化を反映するものであることを示唆した。

3.3 遺伝子改変マウスにおける蝸電図「加重電位」と血管条機能

オプトジェネティクスを駆使して, 血管条に K⁺イオンチャンネルを発現する細胞に, 光刺激により開口する非選択性陽イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン2を発現させた。このマウスを用いて, 蝸電図特に加重電位を計測した。加重電位は, 4,8,16 kHzの3つの周波数, 50~90 dBの5種の音圧において, 光照射により約20~40%前後低下した(図5)。この低下は光刺激の停止により即座に回

復を示した。従来加重電位は有毛細胞機能を反映するも 変化に依存することが明らかとなった。
 の、と理解されてきたが、この結果により、血管条機能の

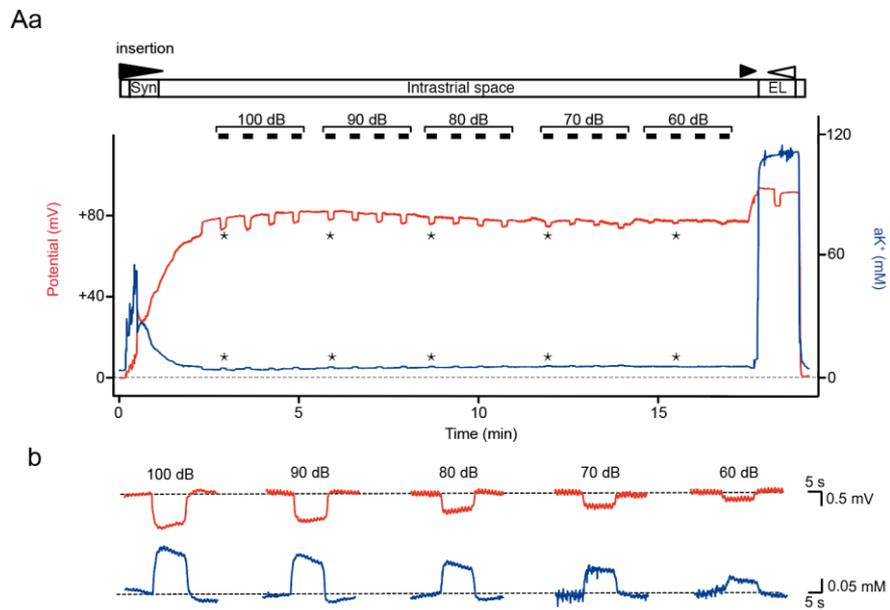


図3: 全身麻酔下のモルモットを用いた in vivo 実験結果。電極は血管条細胞外空間 (Intrastrial space) に留置。Aa は全時間での記録。bは音刺激時の電位・ K^+ 濃度変化の拡大図。

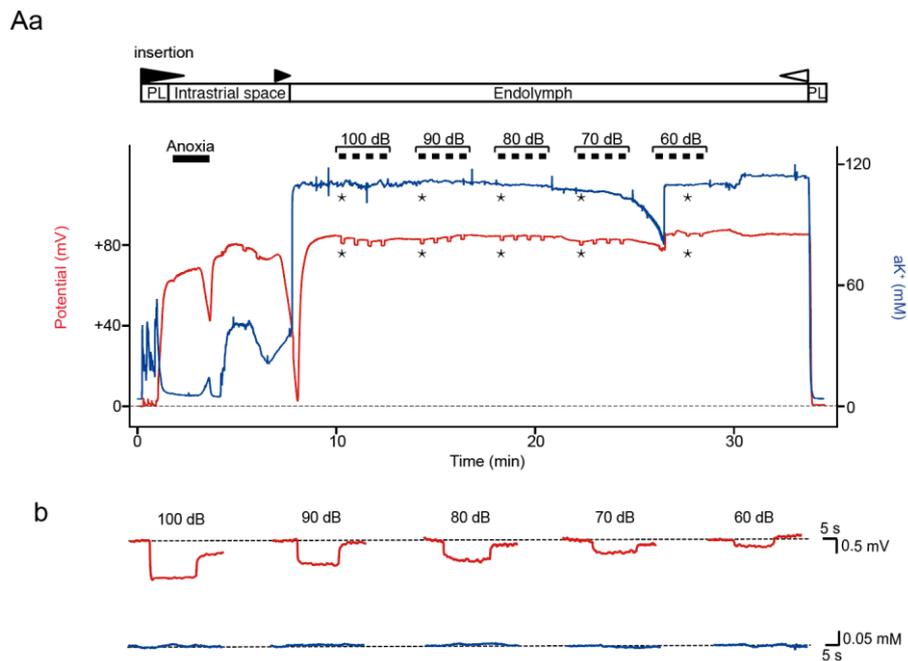


図4 全身麻酔下のモルモットを用いた in vivo 実験結果。電極先端は内リンパ (Endolymph) に留置。Aa は全時間での記録。bは音刺激時の電位・ K^+ 濃度変化の拡大図。

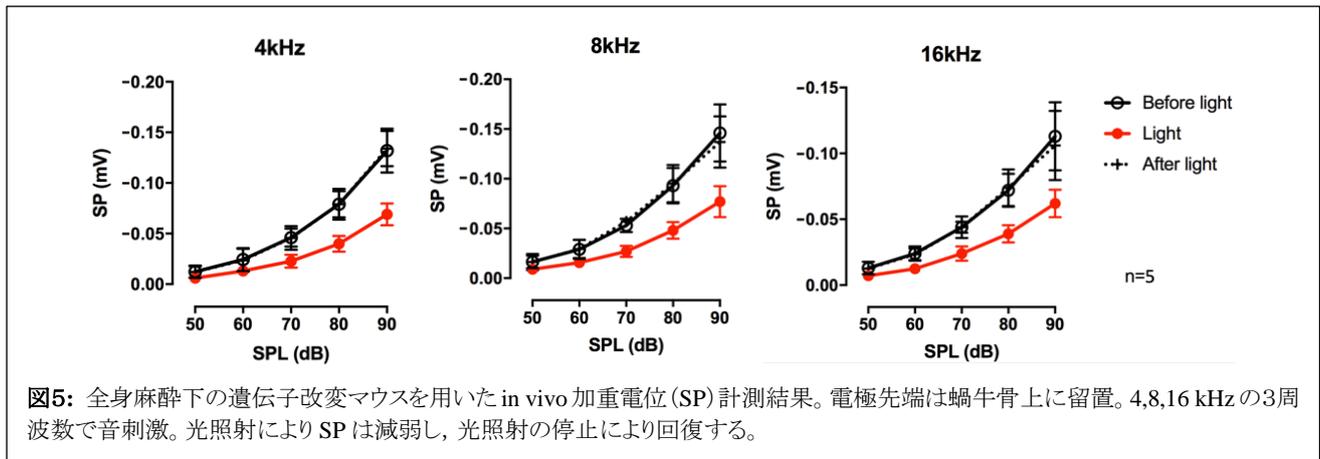


図5: 全身麻酔下の遺伝子改変マウスを用いた in vivo 加重電位 (SP) 計測結果。電極先端は蝸牛骨上に留置。4,8,16 kHz の3周波数で音刺激。光照射により SP は減弱し, 光照射の停止により回復する。

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.
- 3) Nin F, Yoshida T, Murakami S, Ogata G, Uetsuka S, Choi S, Doi K, Sawamura S, Inohara H, Komune S, Kurachi Y, Hibino H. Computer modeling defines the system driving a current crucial for homeostasis in the mammalian cochlea by integrating unique ion transports. *NPJ Syst Biol Appl* Aug 25;3:24, 2017.

Analysis of Sound Stimulus Dependence in K^+ Transport System in the Stria Vascularis of the Cochlear Lateral Wall

Fumiaki Nin, Chan Qi, Hiroshi Hibino

Department of Molecular Physiology, Niigata University

Summary

The cochlear lateral wall controls the electrochemical environment in the endolymph by its K^+ transport and generation of the endocochlear potential (EP) of +80 mV. Although it has been known that its function is indispensable for audition, whether it depends on sound stimuli or not remains uncertain. We previously found that the potential and $[K^+]$ in the intrastrial space mainly contributes to the EP under no sound stimulation. In this study, we examined the potential and $[K^+]$ change in both of the intrastrial space and endolymph in the living guinea pigs with electrodes sensitive to potential and K^+ . Under sound stimulation, potential decreased, whereas $[K^+]$ increased in the intrastrial space. In the endolymph, on the other hand, potential decreased, whereas $[K^+]$ unchanged. Theoretical analysis of the potential and $[K^+]$ change revealed that the potential change was formed by K^+ diffusion potential change through K^+ channels in the stria vascularis. These results indicate that the function of the lateral wall depends on the sound stimulation. We also found that the cochlear summing potential of electrocochleogram reflects these potential and $[K^+]$ changes in the stria vascularis by genetical approach. Functional dependence of the lateral wall on sound stimulation suggests that not only hair cell and auditory neuron but also the lateral wall relates to the pathophysiology in frequency dependent hearing loss.