

## 実験・計算科学による内耳臓器内カリウムイオン循環の機能解析

任 書晃, 吉田 崇正, 上塚 学, 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 mV の高電位「内リンパ液高電位」を示す特殊な体液である。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、2 つのチャネルを介して無音状態にも観察される有毛細胞の  $K^+$  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」が内リンパ液の高電位と  $K^+$  恒常性に必須であることが示唆された。しかし、聴覚に極めて重要と考えられるこの  $K^+$  循環の経路は、未だ十分かつ詳細には決定・実証されていない。

本研究では、蝸牛  $K^+$  循環の経路である「らせん靭帯」組織を対象に、らせん靭帯に発現する  $K^+$  輸送分子「 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase」と「 $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  共輸送体 (NKCC)」の「内リンパ液高電位」と「 $K^+$  循環」への寄与をそれぞれ調査した。 $K^+$  イオン電極を用いたユニークな電気生理学的アプローチにより、 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase は内リンパ液高電位と  $K^+$  循環に寄与する一方、これまでその貢献が想定されていた NKCC は内リンパ液高電位と  $K^+$  循環に寄与しないことが明らかになった。

### 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。高齢化の半分以上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。これまでに、蝸牛側壁の組織「血管条」が両者に重要な役割を果

たすことが知られてきたが、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、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

らせん靭帯に発現する  $K^+$  輸送分子「 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase」と「 $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  共輸送体 (NKCC)」の「内リンパ液高電位」と「 $K^+$  循環」への寄与をそれぞれ実証する。

#### 1.3 研究の意義

内リンパ液電位と  $K^+$  循環を構成すると想定されている  $K^+$  輸送分子「 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase」と「 $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  共輸送体 (NKCC)」の詳細な生理学的機能を解明することにより、これらを含む「らせん靭帯」が難聴に関わるメカニズムを明らかにする。

### 2. 研究方法

## 2. 1 実験材料

生動物であるモルモットを用いる。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的実験を行う。

## 2. 2 ダブルパレル・K<sup>+</sup>イオン電極の作成

K<sup>+</sup>濃度と電位を同時に測定することのできるダブルパレル・K<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>イオン電極法によるK<sup>+</sup>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<sup>+</sup>イオン電極を挿入する。

## 2. 4 K<sup>+</sup>輸送体阻害薬の灌流

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase と NKCC をそれぞれ阻害するため、ウアパンとブメタニドを人工外リンパ液に溶解する。

## 3. 研究結果

内耳蝸牛に達した音は、まず基板 (Basilar membrane) を振動させる (図 1)。基板上の有毛細胞は、音の一次受容器であると共に増幅器でもあり、基底側膜を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を内リンパ液に浸す。内リンパ液は、150 mM の高 K<sup>+</sup>濃度と +80 mV の高電位を常に示す特殊な細胞外液である。基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ンネル (MET チャンネル) の開口を介して有毛細胞へ流入し、細胞を興奮させる。この結

果、音の機械的刺激は電気信号に変換され、脳へ伝播される。有毛細胞体との間に約 140 mV もの電位差を作る内リンパ液高電位は、いわば「生体電池」として K<sup>+</sup>流入を加速させ、有毛細胞の鋭敏性を保っている。この電池が破綻すると難聴になる。有毛細胞に流入した K<sup>+</sup> は、基底側膜の K<sup>+</sup> チャンネルを通じて、外リンパ液へ放出される。有毛細胞から外リンパ液へ放出された K<sup>+</sup> は、上皮組織「血管条」によって内リンパ液へ循環すると考えられている (「K<sup>+</sup> 循環」) (文献2)。

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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase や Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> 共輸送体 (NKCC) などの K<sup>+</sup> 取込み輸送体が、頂上膜に K<sup>+</sup> チャンネルが分布する (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、

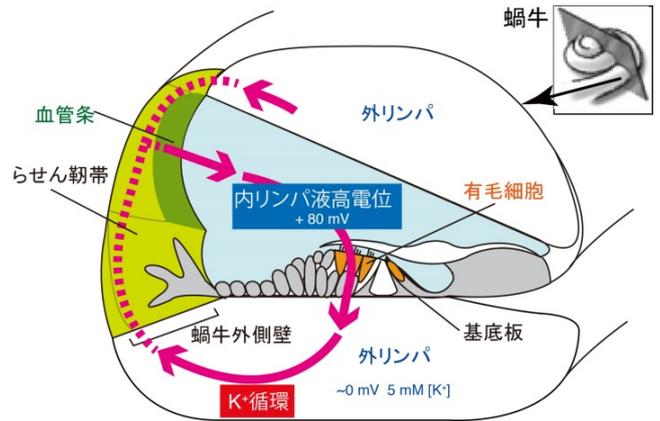


図 1. 内耳蝸牛内に備わる内リンパ液高電位と K<sup>+</sup>循環

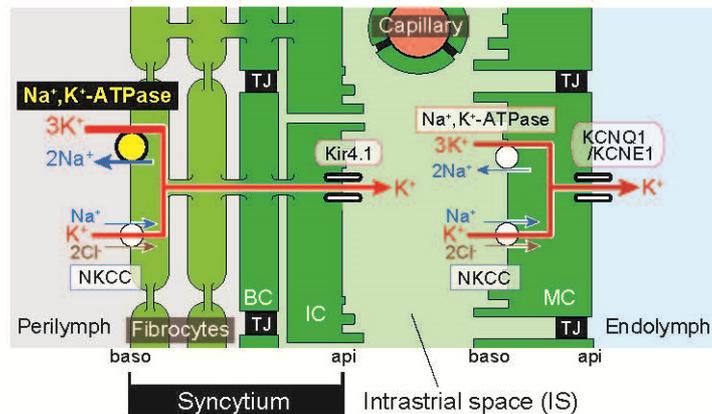


図 2. 蝸牛外側壁に発現する K<sup>+</sup>輸送分子

実験科学的手法を用い、不明であった高電位の成立機構の主軸を示した。即ち、電位と  $K^+$ 濃度を同時測定するイオン電極を生動物蝸牛の細胞内外区分に挿入し、上記の輸送分子の阻害薬の投与による電位・ $K^+$ 濃度への影響を観察した(文献3)。その結果、(1) ISの高電位は外層頂上膜の $K^+$ チャンネルが発生する $K^+$ 拡散電位( $K^+$ 平衡電位)であり、正常時の内リンパ液高電位の主体であること、(2) 内層頂上膜の $K^+$ チャンネルに依存した $K^+$ 拡散電位も内リンパ液の電位に貢献することを見出した。しかし、もう一つの蝸牛内上皮組織である「らせん靭帯」にも  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase や  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$ 共輸送体(NKCC)が発現しているが、内リンパ液高電位および  $K^+$ 循環へ寄与するメカニズムは明らかにされていない。

### 3. 1 $Na^+$ , $K^+$ -ATPase の内リンパ液高電位と $K^+$ 循環への貢献

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らかにするため、我々は *in vivo* 蝸牛側壁においてイオン電極を内耳蝸牛に刺入し、 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase の阻害薬である Ouabain を内耳外リンパ液に灌流し、その影響を調べた(文献1)。

蝸牛外側壁にイオン電極を刺入し内リンパへ押し進めた際の  $K^+$ 濃度と電位の変化を示す(図 3)。正常状態のシンシチウムは、60~70 mM 程度の  $K^+$ 濃度と 10 mV 程度の電位を示し、さらに刺入すると低  $K^+$ 濃度と高電位を示す。これは Intrastrial space の特徴である(ref)。これに対し、Ouabain (50  $\mu$ M, 1 mM) の外リンパ灌流後では、15 mM 程度の濃度まで減少している。

これらの薬剤による影響を、図 4 に示す。正常状態では高かった  $K^+$ 濃度がらせん靭帯の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase の阻害によって低下し、膜電位も 10 mV 程度低下する(図 4 中段)。辺縁細胞の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase が阻害された時には、Intrastrial space の  $K^+$ 濃度が上昇し、辺縁細胞の  $K^+$ 濃度が低下する現象と比べて、対称的である(図 4 下段)。

### 3. 2 $Na^+$ , $K^+$ , $Cl^-$ 共輸送体の内リンパ液高電位と $K^+$ 循環への貢献

これまでの実験により、NKCC の阻害薬である Bumetanide を外リンパ液に灌流すると、EP が時間とともに低下することが知られてきた(図 5d)。したがって、蝸牛側壁であるらせん靭帯と辺縁細胞両方に存在している NKC

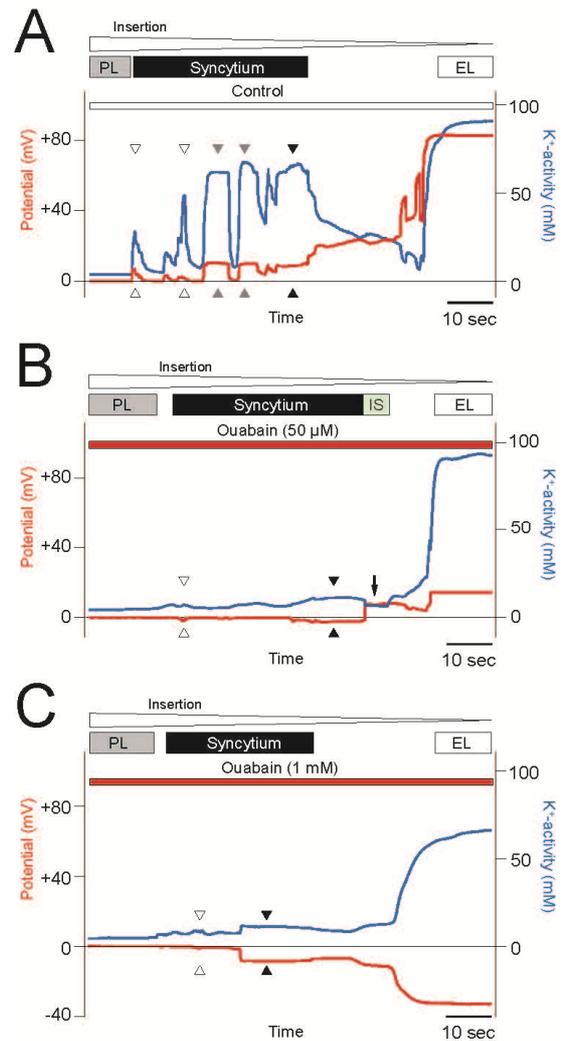


図 3. ウアバイン外リンパ灌流時の蝸牛外側壁の  $K^+$ 濃度と電位

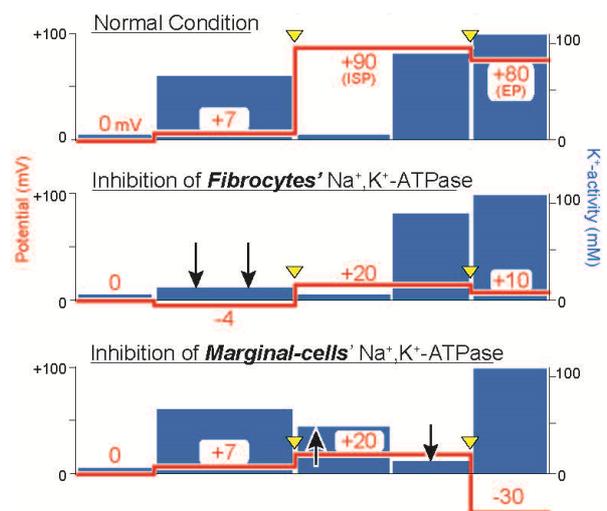


図 4. 阻害薬投与時の蝸牛内  $K^+$ 濃度と電位

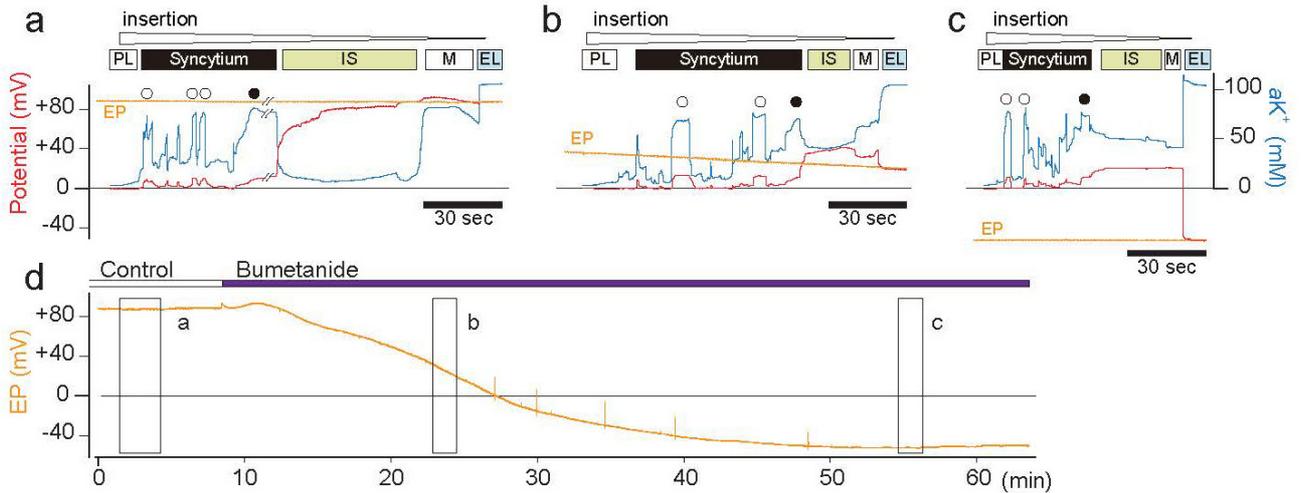


図 5. Bumetanide 外リンパ灌流時の蝸牛内  $K^+$ 濃度と電位

C がシンシチウムの  $K^+$ 濃度の維持と EP に寄与していると考えられてきた。しかし、EP の変化のみの記録では、薬剤がどの領域に到達して効果が見られているのか不明である。そこで我々は、らせん靭帯に発現する NKCC 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らかにするため、*in vivo* 蝸牛側壁においてイオン電極を内耳蝸牛に刺入した上でシンシチウムや Intrastrial space をモニターし、NKCC の阻害薬である Bumetanide を内耳外リンパ液に灌流して、その影響を調べた。

蝸牛外側壁にイオン電極を刺入し内リンパへ押し進めた際の  $K^+$ 濃度と電位の変化を示す(図 5 a-c)。Bumetanide (mM) の外リンパ灌流後でも、 $K^+$ 濃度に大きな変化はない。一方、シンシチウムの隣の区画である Intrastrial space では、 $K^+$ 濃度が上昇し、さらに電位が低下している様子が記録されている。

これらの薬剤による影響を、図 6 に示す。前述の通り、辺縁細胞の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase が Ouabain の外リンパ灌流により阻害された時には、Intrastrial space の  $K^+$ 濃度が変化せず、電位が低下する(図 6, 3段目)。また、Bumetanide の血管灌流時には、Intrastrial space の  $K^+$ 濃度が上昇し、辺縁細胞の  $K^+$ 濃度が低下する(図 6, 4段目)。しかし、外リンパ液への Bumetanide の外リンパ灌流では、正常状態で高かった  $K^+$ 濃度は低下することなく、膜電位も変化しない。しかし、Intrastrial space では  $K^+$ 濃度が上昇し、電位が低下、また辺縁細胞では  $K^+$ 濃度が低下し、電位が低下することが明らかになった(図 6, 2段目)。この結果は、外

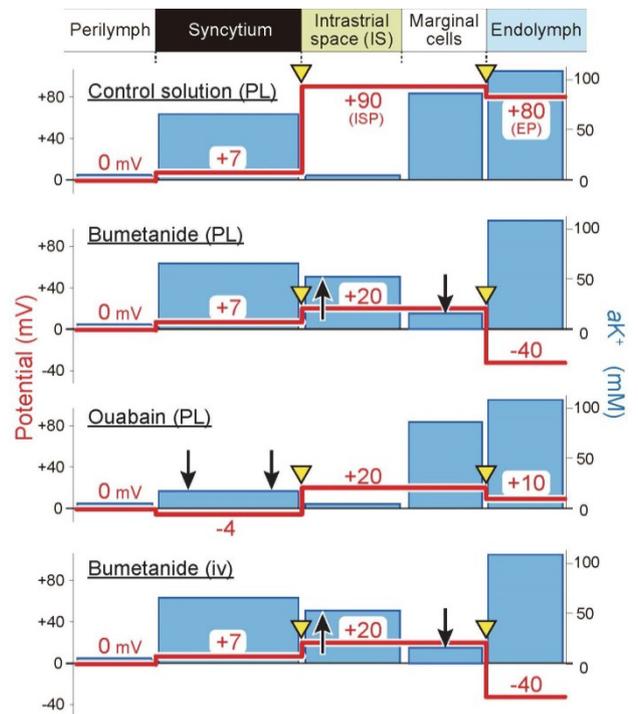


図 6. 阻害薬投与時の蝸牛内  $K^+$ 濃度と電位

リンパ灌流によっても Bumetanide は血管条内へと移行し、血管経由で灌流した際と同様の変化が起こっていることが示唆された。すなわち、らせん靭帯に発現する NKCC は、シンシチウムの  $K^+$ 濃度や EP に寄与していない可能性が明らかにされた。

一連の研究により、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

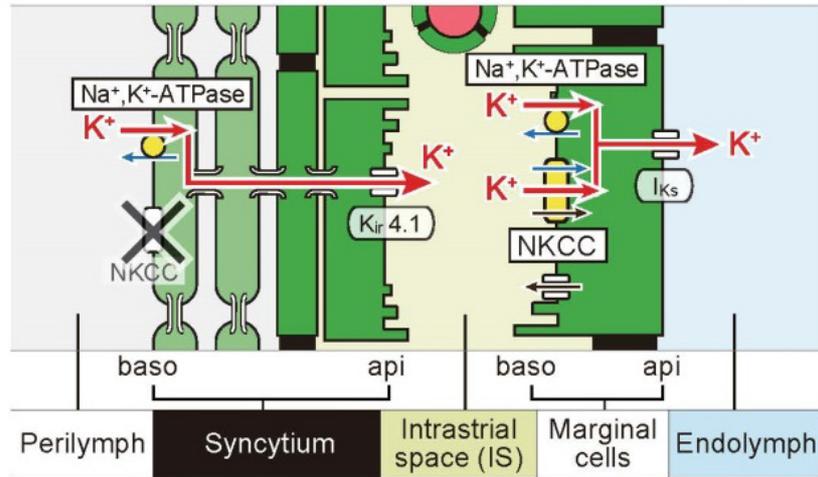


図 7. EP に貢献する蝸牛外側壁の  $K^+$  輸送分子の新しい模式図

が明らかになった。これまでに作成した、数理モデルを元にして(文献4)、今後、数値シミュレーションを用いた新しい EP と  $K^+$  循環のモデル(図 7)の作成に取り組みたいと考えている。

#### 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) Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc.* 33(2); 51-56, 2000.
- 3) Nin F, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. The endocochlear potential depends on two  $K^+$  diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(5); 1751-1756, 2008.
- 4) Nin F, Hibino H, Murakami S, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. Computational model of a circulation current that controls electrochemical properties in the mammalian cochlea. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(23): 9191-9196, 2012.

## Experimental and Theoretical Analysis of Cochlear $K^+$ -Circulation in the Inner Ear

Fumiaki Nin, Takamasa Yoshida, Hiroshi Hibino

Department of Molecular Physiology, 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. Between the two barriers lies the intrastrial space (IS), an extracellular space with a low  $K^+$  concentration ( $[K^+]$ ) and a potential similar to the EP. This intrastrial potential (ISP) dominates the EP and represents the sum of the diffusion potential elicited by a large  $K^+$  gradient across the apical surface of the syncytium and the syncytium's potential, which is slightly positive relative to perilymph. Although a  $K^+$  transport system in fibrocytes seems to contribute to the EP, the mechanism remains uncertain. We examined the electrochemical properties of the lateral wall of guinea pigs with electrodes sensitive to potential and  $K^+$  while perfusing into the perilymph of the scala tympani blockers of  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase and  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  cotransporter (NKCC) the  $K^+$  pump thought to be essential to the system. Inhibiting  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase barely affected  $[K^+]$  in the IS but greatly decreased  $[K^+]$  within the syncytium, reducing the  $K^+$  gradient across its apical surface. The treatment hyperpolarized the syncytium only moderately. Blocking NKCCs by perilymphatic perfusion of bumetanide suppressed the ISP. Unexpectedly and unlike the inhibition of the syncytial  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPases, the bumetanide perfusion barely altered the electrochemical properties of the syncytium but markedly augmented  $[K^+]$  of the IS. These observations resembled those when the marginal-cells'  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPases or NKCCs were blocked with vascularly applied inhibitors. Consequently, fibrocytes evidently use the  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase to achieve local  $K^+$  transport, maintaining the syncytium's high  $[K^+]$  that is crucial for the  $K^+$  diffusion underlying the positive ISP. To the contrary, NKCCs in the marginal cells are affected by the perilymphatically perfused bumetanide and these transporters but not those in the syncytium are involved in the unidirectional  $K^+$ -transport.