

めまいの病態理解を目指した内耳 H⁺動態の基礎研究

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 基礎応用器官生理学分野
日比野 浩

1. はじめに

我国では、数十万人がめまいに苦しんでいる。めまいや、時にそれに伴う難聴の治療として、重曹水 (NaHCO₃) の静注が著効する場合が少なくない。従って、病態には内耳の酸性化が深く関わると考えられるが、詳細は不明である。聴覚・バランス覚を各々感知する蝸牛 (図1) ・平衡器から成る内耳は、細胞外液であるにも関わらず150 mMの高カリウム(K⁺)濃度を示す内リンパ液で満たされている(Hibino et al., 2006)。一方、この体液のpHは7.4である。また、蝸牛の内リンパ液は+80 mVの高電位を示す。この特殊なイオン・電位環境は、内耳機能に必須であり、「血管条」と呼ばれる上皮組織を介したK⁺の一方向性輸送により維持されている。K⁺輸送には種々の輸送分子に関わるが、ATP依存性輸送体が主体であるため、莫大な酸素が消費され、多量の呼吸酸(H⁺)が生まれる(Erulkar & Maren, 1961)。一般に多くの蛋白質活性を修飾しうるH⁺の濃度制御は、蝸牛・平衡器の上皮組織の恒常化や正常なK⁺輸送の維持に不可欠であると予想されるが、そのメカニズムは殆ど謎である。本研究では、内耳の上皮組織におけるH⁺動態の調節機構の分子基盤とその統合システムを解明し、更にK⁺輸送や内リンパ液のpH・K⁺濃度・電位、内耳器官機能との協関を理解し、将来、めまいの病態解明や新薬の開発へと繋げるための基礎的知見を蓄積することを目的とした。

2. 方法

蝸牛においてH⁺輸送を担う候補輸送分子の検索対象として、Na⁺,HCO₃⁻-cotransporter (NBC)に絞った(後述)。実験方法としては、まず、呼吸酸の莫大な発生が予想される蝸牛の血管条 (図1) を対象にして、(A)特異的なプライマーを用いたRT-PCR法によるNBCのmRNAの同定と、(B)特異抗体を用いた免疫組織化学法による輸送体タンパク質の分布パターンの検討、を行った。さらに、同定した輸送分子のK⁺動態に対する役割を理解するため、(C)電気生理学的実験を行った。具体的には、輸送分子の阻害薬を血管条が接する外リンパ液(細胞外液:図1)に投与し、血管条のK⁺輸送に依存する内リンパ液の電位の変化を微小電極により測定した。

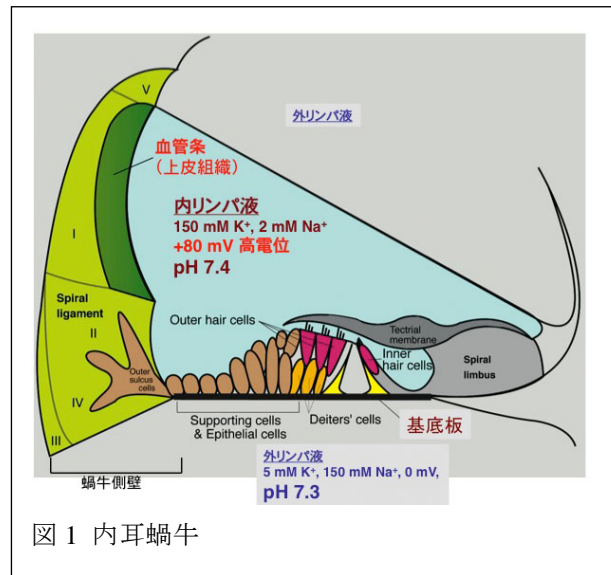


図1 内耳蝸牛

3. 結果

(A) RT-PCR法による血管条のNBCの解析

生体の体液のpHを一定に保つシステムとして、重炭酸(HCO₃⁻)緩衝系が重要である。そこで、血管条に

においても同様の系が働いていると考え、 HCO_3^- の輸送を仲介する重要輸送分子NBCに注目した。NBCには、起電性のNBCe1と電氣的に中性のNBCn1に分類でき、さらに前者はAからCまでのsplicing variantが報告されている(Aalkjaer C, 2004)。しかし、末梢器官の上皮組織ではNBCe1-AとNBCe1-Bが主であるため、最初にこれら2つのsplicing variantの単離血管条組織におけるmRNAの発現をRT-PCR法で検討した。解析を進めると、血管条においては、NBCe1-Bが強く発現していることが判明した。NBCe1-Aの発現は、我々の条件下では殆ど認められなかった。

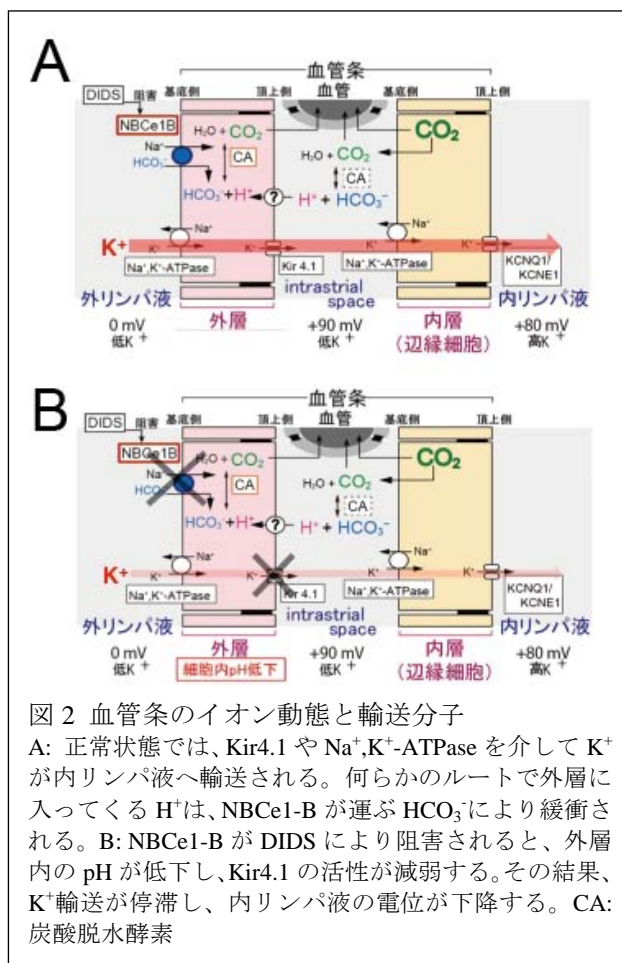
(B) 蛍光抗体法によるNBCe1-Bの発現の検討

次に、NBCe1-Bの特異的な市販抗体を用いて、蝸牛を対象に免疫組織化学的解析を行った。血管条は、外層と内層の二層から構成されている(図2)。NBCe1-Bの免疫活性は、外層の基底膜側に強く認められた(図2)。

(C) 蝸牛におけるNBCe1-Bの生理的役割の検討

さらに、内耳体液のpH制御機構におけるNBCe1-Bの生理的役割を見出すことを目的とした。最も直接的な実験は、血管条の外層の基底膜が接する外リンパ液に、NBCe1-Bの阻害薬を灌流し、同時に微小pH電極で内リンパ液や血管条のpH動態を測定するものである。しかし、我々の微小pH電極は不安定であり、試行錯誤の余地が大いにあることから、今まで研究してきた内耳体液の K^+ 動態に焦点を当て、それにおけるNBCe1-Bの働きを、 K^+ 動態に依存した内リンパ液の高電位の変化を観察することで推察する実験を行った。NBCe1-Bを阻害するために、4,4'-ジイソチオシアナト- スチルベン-2,2'-ジスルホン酸(DIDS)と呼ばれる薬物を使用した。DIDSは、 Cl^- チャネルをはじめとした様々な陰イオン輸送分子を阻害するが、血管条の外層の基底膜側には、その標的となるものが今まで殆ど報告されていない。よって、外リンパ液にDIDSを灌流すれば、NBCe1-Bが阻害される可能性が大きいと判断し、実験を行った。内リンパ液の電位は、微小ガラス電極で測定した。

正常条件下において、内リンパ液に挿入されたガラス電極は、約+80 mVの高電位を示した。DIDSを外リンパ液に灌流すると、電位は大きく下降し、+20 mVとなった。阻害薬を含まない人工外リンパ液の灌流は内リンパ液の高電位に影響を殆ど与えなかった。従って、NBCe1-Bが阻害されると、内リンパ液の電位が低下することが示唆された。



4. 考察

本研究において、NBCe1-Bは蝸牛の血管条の外層基底膜に発現することが明らかとなった(図2)。さらに、NBCe-1Bは、 HCO_3^- の運搬を通じて血管条のpHを正常に保っていることが推察され、このpH恒常性が聴覚に必須の内リンパ液の高電位の維持に不可欠であることが示唆された。外層の頂上膜には、 K^+ チャンネルKir4.1が分布し(図2)、血管条の K^+ 輸送の駆動を介して内リンパ液の高電位の成立に深く関わっている(Ando & Takeuchi, 1999; Takeuchi et al., 2000; Nin et al., 2008)。Kir4.1は、細胞内pHに感受性があり、酸性化によって活性が低下することが知られている(Tanemoto et al. 2000)。このことより、DIDSによるNBCe-1B阻害は、外層内のpHの酸性化を介してKir4.1のチャンネル機能を減弱させ、その結果、内リンパ液の高電位が失われたと考えられる(図2)。また、Kir4.1を介した血管条の K^+ 輸送は、内リンパ液の K^+ 濃度の維持にも深く関わると考えられているため(Hibino & Kurachi, 2006)、NBCe-1Bは、この恒常性にも関与する可能性もある。蝸牛と平衡器は内リンパ液で交通しているため、蝸牛のNBCe-1BによるpH調節機構は、平衡機能の維持にも深く関わると解釈できる。

内耳のpH制御分子は、多くが不明であるため、本研究の目的の一つであった蝸牛pH調節システムのコンピューターシミュレーションを達成することはできなかった。今後も研究を進め、一つ一つ蝸牛のpH制御分子を見出すことで、蝸牛の H^+ 動態の統合理解に迫り、めまいの克服に少しでも近づきたい。

5. 参考文献

Aalkjaer C, Frische S, Leipziger J, Nielsen S, and Praetorius (2004). Sodium coupled bicarbonate transporters in the kidney, an update. *Acta Physiol Scand* 181:505-512.

Ando M and Takeuchi S (1999). Immunological identification of an inward rectifier K^+ channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res* 298: 179-183.

Erulkar SD, and Maren TH (1961). Carbonic anhydrase and the inner ear. *Nature* 189: 459-460.

Hibino H, and Kurachi Y (2006). Molecular and physiological basis of K^+ circulation in the mammalian cochlea. *Physiology (Bethesda)* 21:336-345.

Nin F, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, and Kurachi Y (2008). 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* 105:1751-1756.

Takeuchi S, Ando M, and Kakigi A (2000). Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. *Biophys J* 79:2572-2582.

Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, and Kurachi Y (2000). In vivo formation of a proton-sensitive K^+ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* 525:587-592.