

# 加齢性難聴の克服に資する内耳イオン動態の包括的解析

新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子生理学  
任 書晃

## 1. はじめに

「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）。基底板上の有毛細胞は、音の一次受容器であり、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  $K^+$  濃度と +80 mV の高電位を示す<sup>1)</sup>。音刺激により基底板の振動により感覚毛が屈曲すると、内リンパ液の  $K^+$  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  $K^+$  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  $K^+$  は、基底側膜の  $K^+$  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「 $K^+$  循環」は、内リンパ液高電位を維持する機構である。

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  $K^+$  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。中間・基底細胞と、その隣にあるらせん靭帯の線維細胞は、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胞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・電気生理学的実験などから、各層の基底側には、 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase・ $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  共輸送体 (NKCC) の  $K^+$  輸送体が、頂上側には  $K^+$  チャネル（外層：Kir4.1, 内層： $I_{Ks}$ ）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>。

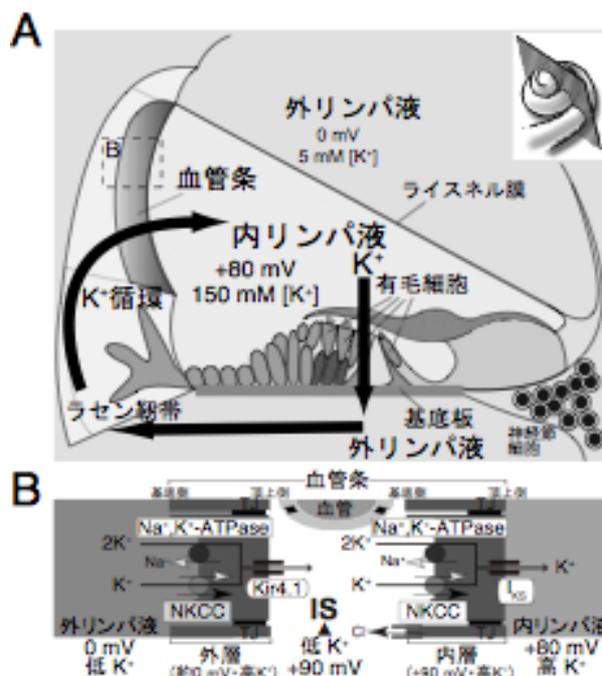


図 1 内耳蝸牛と血管条の構造

(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）。 $K^+$ 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:  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  共輸送体, TJ: タイトジャンクション 文献 9 から改変

## 2. 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。

## 3. 結果

### 3-1. 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、動脈経路で障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 7)。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 8)。

そこで、新たに得られた実験結果に基づいて 9, 10)、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)チャンネルを仮定し、

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。

### 3-2. 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、我々は再び生動物を用いて実験を行った。線維細胞膜に Na<sup>+</sup>選択性チャン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が (図 3A: 矢頭)、

-40 mV の大きな負の膜電位が計測された (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

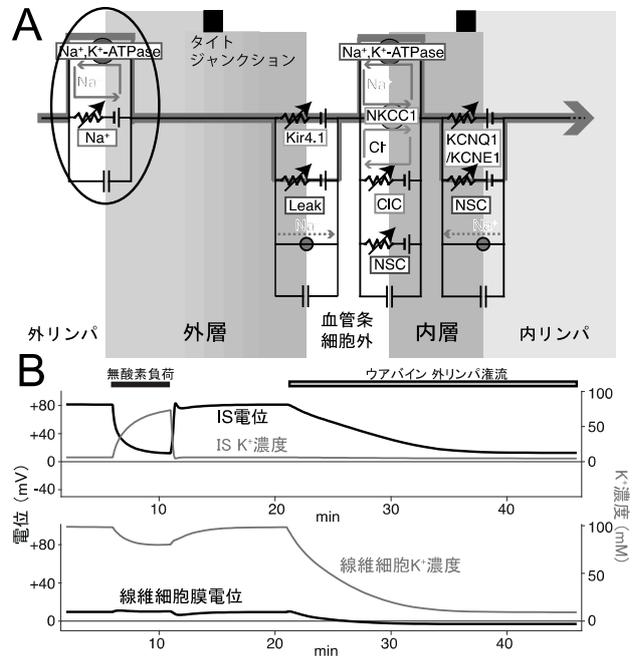


図 2 新規数理モデル (fi-NHK model) による蝸牛 K<sup>+</sup>循環のシミュレーション

(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) チャンネル、Leak: Leak (電流) チャンネル。(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。

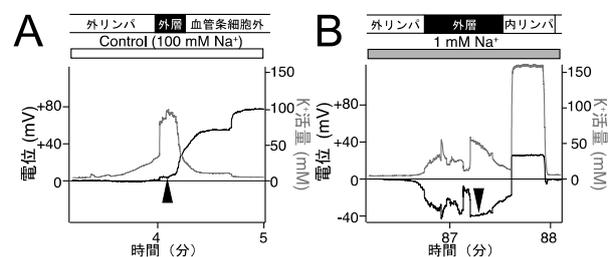


図 3 低 Na<sup>+</sup>溶液を外リンパ灌流時の外層電位変化

(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。

膜であることを示唆している。

#### 4. 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  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  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 11, 12)。その他、薬理的に寄与を検証可能な  $\text{Na}^+$  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える。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 13)。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える。

#### 5. 発表論文、参考文献

現在論文を Journal of Physiology 誌に投稿中である。

- 1) Bekesy G. J Acoust Soc Am. 1952;24:72-76.
- 2) Kusakari J, et al. Laryngoscope. 1978;88:12-37.
- 3) Marcus DC, et al. Hear Res. 1985;17:79-86.
- 4) Sakagami M, et al. Hear Res. 1991;56:168-172.
- 5) Ando M, et al. Cell Tissue Res. 1999;298:179-183.
- 6) Hibino H, et al. Physiology (Bethesda). 2006;21:336-345.
- 7) Nin F, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:1751-1756.
- 8) Nin F, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109:9191-9196.
- 9) Adachi N, et al. J Physiol. 2013;591:4459-4472.
- 10) Yoshida T, et al. Pfluger Arch. 2015;467:1577-1589.
- 11) Couloigner V, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2001;280:F214-222.
- 12) Salt AN, et al. Jpn J Physiol. 1982;32:219-230.
- 13) Uetsuka S, et al. Eur J Neurosci. 2015;42:1984-2002.