多階層イオン輸送モデルによる 内耳蝸牛のイオン・電位環境の統合的理解

任 書晃¹⁾, 吉田 崇正^{1,2)}, 村上 慎吾³⁾, 上塚 学^{1,4)},
緒方 元気¹⁾, 倉智 嘉久³⁾, 日比野 浩¹⁾

要約: 空気の振動である音は、内耳蝸牛に存在する音の感覚細胞である有毛細胞を振動させる。この時、有毛細胞の毛に存在するイオンチャネルが開口し、常時+80 mVを示す特殊な内リンパ液からイオンが流入する。この「内リンパ液高電位」は、有毛細胞の興奮に不可欠であり、蝸牛側壁の血管条が成立させる。Na⁺,K⁺,2Cl⁻共輸送体(NKCC)やNa⁺,K⁺-ATPaseの阻害薬は、内リンパ液高電位を低下させることで、薬剤性難聴を惹起することが報告されているが、その電位低下のメカニズムは明らかにされていなかった。我々はこれまでに、血管条に発現するNKCCとNa⁺,K⁺-ATPaseが制御する内リンパ液高電位成立機構を電気生理学的手法により示し、さらに蝸牛内の多階層イオン輸送モデル「Nin-Hibino-Kurachi (NHK) model」の構築とコンピュータシミュレーションによって、阻害薬を経動脈的に投与した時に起こる内リンパ液高電位低下のメカニズムを説明した。血管条に隣接し、その一部と一体化しているらせん靱帯を構成する線維細胞にも、NKCCとNa⁺,K⁺-ATPaseが発現していることが知られているが、薬剤性難聴時のこれらの関与は不明である。近年我々は、らせん靱帯ではおもにNa⁺,K⁺-ATPaseが、K⁺輸送とK⁺濃度バランスに寄与すること、そしてNKCCはほとんど機能していないことを明らかにした。これらに基づいて、NHKモデルを改訂した。今後シミュレーションを行うことにより、輸送体阻害薬の経動脈投与の実験結果を正確に再現することが期待される。

1. はじめに

「内耳蝸牛」は、音の受容のため高度に分化した器官である。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の高カリウム(K⁺)濃度と+80 mVの高電位(endocochlear potential: EP)を示す(1)。音刺激による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⁺イオン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、音の機械的刺激は電気信号に変換され、脳へ伝えられる。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によってK⁺イオン流入を増幅し、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⁺イオンは、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⁺イオン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靱帯の線維細胞は、ギャップジャンクションという「穴」で繋がっているため、

キーワード: 内リンパ液高電位, 蝸牛 K⁺イオン循環, らせん靱帯

¹⁾ 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 分子生理学分野 (〒951-8510 新潟市中央区旭町通1番町757)

²⁾ 九州大学大学院 医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

大阪大学大学院 医学系研究科 ³⁾ 分子・細胞薬理学, ⁴⁾ 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

E-mail: nin@med.niigata-u.ac.jp 原稿受領日: 2015年11月18日, 依頼原稿

Title: Theoretical and experimental analysis of ototoxic mechanism in the spiral ligament fibrocytes by multi-level simulation with ion transports in the cochlea

Author: Fumiaki Nin, Takamasa Yoshida, Shingo Murakami, Satoru Uetsuka, Genki Ogata, Yoshihisa Kurachi, Hiroshi Hibino

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)

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)。本稿では便宜的に線維細胞を外層とみなす。組織学的検討や、薬理的・電気生理学の実験などから、各層の基底側には、 Na^+, K^+ -ATPase, $Na^+, K^+, 2Cl^-$ 共輸送体 (NKCC) の K^+ イオン輸送体が、頂上側には K^+ チャンネル (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 (2-6) (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 (2)。

2. 阻害薬が与える蝸牛内電位・イオン環境の変化

血管条の解剖学的特徴として、以下の三つの点が挙げられる。①内層・外層・血管内皮細胞は、各々がタイトジャンクションで繋がれ、これが血管条内部を内・外リンパ液と血液から電氣的に隔離している、②

このタイトジャンクションは、一般に上皮細胞の基底膜側と頂上膜側の電気現象を隔離する働きがあるため、血管条の電気動態は内・外層の基底・頂上膜の合計4つの膜区分に分けることができる、③内層の基底膜と外層の頂上膜はひだ状で互いに絡み合い、それらに挟まれた血管条細胞外空間 (intrastrial space: IS) の間隔は15 nmと狭い (図1B) (6)。ISを満たす体液は、通常の細胞外液と同じく5 mM以下の K^+ イオン濃度であるが、内リンパ液の電位と同程度 ($\sim +90$ mV) の高電位を示す (図1B) (7, 8)。この intrastrial potential (IS 電位) と呼ばれる高電位は内リンパ液高電位の源であるとされ、その動態がEPに反映する (9)。

我々はまず、阻害薬が血管条内部の電位・イオン環境に与える変化を測定するため、 K^+ 選択的イオン電極 (K^+ 電極) をモルモット血管条の細胞内外の各微小区域に挿入し、一方で、動脈経由で K^+ イオン輸送体の阻害薬を生動物に投与した (9)。図2は、 K^+ 電極を外リンパ液から血管条へと進めた際の電位 (黒線) と K^+ イオン濃度 (灰色線) の変化を示したものである。生理実験における濃度は、実効値である活量という単位で表しているため、一般的な濃度の値より低く示される。外リンパ液 (0 mV・低 K^+) より K^+ 電極を進めると、最初に K^+ イオン濃度 (K^+ 活量) が65~85 mMと高く、電位が+2~3 mVと正の値を示す地点 (黒矢印) を見出した。解剖学的に、これは外層 (線維細胞) (図1B) を観察していると考えられた。さらに電極を進めると、電位が+70 mVと高く、 K^+ イオン濃度が4 mMと低いIS部位を認めた (白矢印)。無酸素負荷やウアバイン投与により血管条内層の Na^+, K^+ -ATPase を阻害したところ、IS 電位は無酸素負荷時には+70 mVから+22 mVへと下降し、 K^+ イオン濃度は4 mMから

図2 内層 Na^+, K^+ -ATPase 阻害の効果

K^+ 電極による血管条の各区分の K^+ イオン濃度と電位の測定。黒線は電位を、灰色線は K^+ イオン濃度 (活量) の変化を示す。無酸素負荷およびウアバインの灌流で内層の Na^+, K^+ -ATPase を阻害した。(文献9から改変)

28 mM へと上昇する変化を認めた (白矢頭). ウアバイン投与時には, この変化は不可逆的かつより大きく変化した. また, NKCC の阻害薬であるブメタニドも, 無酸素負荷やウアバイン投与時とほぼ同じ効果を呈した.

次に, 外層 (線維細胞) においてどのような電位・ K^+ イオン濃度変化が起きるかを検討するため, K^+ 電極を線維細胞内に挿入すると同時に, 経外リンパ液経路で阻害薬を生動物に投与した. 線維細胞は細胞体が小さいため, 細胞内電位と K^+ イオン濃度を持続的に計測することは困難である. そこで, ガラス電極を内リンパ液内に留置して電位を計測しつつ, 一方でイオン電極を複数回外層へ刺入した. イオン電極刺入時に一過性に計測される高い K^+ イオン濃度を示す部位が線維細胞内であり, この時の電位を線維細胞膜電位と見なす (10). 内リンパ液の電位をモニターしながら (図 3Ad), 正常状態において K^+ 電極を外リンパ液から進めると (図 3Aa), 数 mV の電位のままで K^+ イオン濃度が約 80 mM と高くなる点を見出した (図 3Aa: 黒丸). ウアバインを外リンパ液に灌流し Na^+, K^+ -ATPase を阻害している間に, 線維細胞の電位・ K^+ イオン濃度を複数回計測すると, 電位はほとんど変化が見られないのに対し, K^+ イオン濃度は経時的に 10 mM 以下まで低下することが計測された (図 3Ab, c: 黒丸) (10).

同様に, 今度はブメタニドを外リンパ液に灌流して

NKCC を阻害し, この時の線維細胞の電位・ K^+ イオン濃度を計測すると, 共に変化がなかったが (図 3B: 黒丸), 意外なことに IS の電位の低下と K^+ 濃度の上昇が見られた (図 3B: 黒矢頭) (11). これは, ブメタニドを動脈経路で動物に投与した時と同様の変化であった.

3. 蝸牛 K^+ 循環数理モデルの改訂

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, 等価電気回路として表現できる. 我々はこれまでに, 各膜上の輸送分子を等価電気回路として示し, 有毛細胞を電球, 内リンパ液高電位を電池, K^+ 循環を電流とみなした血管条の K^+ イオン輸送と蝸牛の K^+ 循環を再現する数理モデル Nin-Hibino-Kurachi (NHK) model を構築し (図 4A), 動脈経路で阻害薬を投与した際の電位・ K^+ イオン濃度動態の再現に成功した (図 4B) (12).

そこで, 図 3 の実験結果に基づいて, 線維細胞膜に発現するイオン輸送体を設定し, 既存の蝸牛 K^+ 循環数理モデルを改訂した (図 5). 新規数理モデルでは, 線維細胞膜において Na^+, K^+ -ATPase が輸送する Na^+ イオンを局所でリサイクルする Na^+ 選択性 (電流) イオンチャネルを仮定し, Na^+, K^+ -ATPase が IS 方向へ K^+ イオンを輸送できるよう設定する. 図 3 に示した無酸素負荷時に見られた電位・ K^+ イオン濃度の変化

図 3 外層 (線維細胞) Na^+, K^+ -ATPase および NKCC 阻害の効果

K^+ 電極による血管条の各区分の K^+ イオン濃度と電位の測定 (a~c) と, 内リンパ液の電位測定 (d). 黒線は電位を, 灰色線は K^+ イオン濃度 (活量) の変化を示す. (A) ウアバインの灌流で線維細胞の Na^+, K^+ -ATPase を阻害すると, 線維細胞内の K^+ イオン濃度は徐々に低下を示した. (B) ブメタニドの灌流で線維細胞の NKCC を阻害しても, 線維細胞内の K^+ イオン濃度はほとんど変化しない. 一方で, IS における K^+ イオン濃度が上昇している. (文献 10, 11 から改変)

図4 数理モデル (NHK model) による蝸牛 K^+ 循環のシミュレーション
(A) 血管条 K^+ 輸送と蝸牛 K^+ 循環を表す等価電気回路。NKCC : $Na^+, K^+, 2Cl^-$ 共輸送体, Cl^- : Cl^- チャンネル, NSC : 非選択性陽イオンチャンネル, MET : 機械刺激感受性チャンネル。(B) 正常時および無酸素負荷時における各区分の電位 (a : 黒線) と K^+ イオン濃度 (b, c : 灰色線) の経時変化。なお、濃度は活量でない。(文献 12 から改変)

を、今後新しい数理モデルを用いたシミュレーションによって再現を試みる予定である。

4. おわりに

数理モデルに設定する Na^+ 選択性イオンチャンネルとは、一体どのような分子なのであろうか。これまでに、上皮性 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では内リンパ液高電位に影響がない(13, 14)。その他、薬理学的に検証可能な Na^+ チャンネルの関与も現在否定的である。しかしここに、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。今後、より詳細に数理モデルのパラメータを設定し、実験結果を精密に再現できるようアップデートが行えれば、様々な病態を理論的に抽出することも可能となるであろう。未知のイオ

図5 改訂数理モデルにおける線維細胞の設定
外層 (線維細胞) 部を改訂した新規等価電気回路。 Na^+ : Na^+ 選択性 (電流) チャンネル。

ンチャンネルやその他線維細胞に関わる分子の候補探索には、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(15)。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。

謝辞：本研究の遂行にあたり、支援を賜った実験助手の堀かりん様に感謝いたします。また、第24回日本薬理学会総会のセミナーにおいて講演する機会を与えてくださったオーガナイザーの京都大学の山下富義教授、本稿を作成する機会を与えてくださった編集部の方々に深謝申し上げます。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 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) Salt AN, et al. Laryngoscope. 1987;97:984-991.
- 8) Ikeda K, et al. Hear Res. 1989;40:111-116.
- 9) Nin F, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:1751-1756.
- 10) Adachi N, et al. J Physiol. 2013;591:4459-4472.
- 11) Yoshida T, et al. Pflugers Arch. 2015;467:1577-1589.
- 12) Nin F, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:9191-9196.
- 13) Couloigner V, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2001;280:F214-F222.
- 14) Salt AN, et al. Jpn J Physiol. 1982;32:219-230.
- 15) Uetsuka S, et al. Eur J Neurosci. 2015;42:1984-2002.