

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 足立 直子

### 論文題目

The mechanism underlying maintenance of the endocochlear potential by the K<sup>+</sup> transport system in fibrocytes of the inner ear.

### 論文内容の要旨

蝸牛内リンパは 150mM K<sup>+</sup>、+80mV の高電位 (EP: endocochlear potential) を示す。音刺激により有毛細胞の感覚毛が屈曲、感覚毛頂上部の機械刺激感受性チャネルが開口し内リンパ高電位を駆動力にして内リンパの K<sup>+</sup> が有毛細胞に流入し電気興奮させる。このため EP は聴覚に必須である。EP は蝸牛側壁による K<sup>+</sup> 循環により成立していると考えられてきたがそのメカニズムについては多くが明らかにされていない。そこで我々は EP 成立のメカニズム解明のため研究を行った。

蝸牛側壁の血管条は内リンパ側より辺縁細胞・中間細胞・基底細胞で構成されている。辺縁細胞はタイトジャンクションで結合する単層である。中間細胞、基底細胞、らせん靭帯の大部分を占める線維細胞はギャップジャンクションで結合され、電位・イオン環境が等しいシンチヂウム (Syncytium) を形成している。辺縁細胞とシンチヂウムの間には 15nm の血管条細胞外空間 (IS: intra strial space) と呼ばれる空間が存在している。基底細胞にもタイトジャンクションが存在し、シンチヂウムが IS と外リンパを隔絶している。IS は低 K<sup>+</sup> かつ EP と同程度の高電位である。IS の電位 (ISP) はシンチヂウム中間細胞の頂上側にある Kir4.1 channel の K<sup>+</sup> 拡散電位により形成されていること、また ISP 高電位に必須である IS の低 K<sup>+</sup> は辺縁細胞基底側に存在する Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、2Cl<sup>-</sup> 共輸送体により K<sup>+</sup> がくみ出されることにより保たれており、辺縁細胞頂上側の KCNQ1/KCNE1 による K<sup>+</sup> 拡散電位も EP 成立に寄与しているということが知られている。我々はさらなる EP 成立のメカニズム解明のため電気生理学的手法を用いて蝸牛側壁の繊維細胞を調べた。

線維細胞はシンチヂウムの基底側で外リンパに接しており、線維細胞の K<sup>+</sup> 輸送は EP 成立に必須であると予測されてきた。我々は線維細胞基底側に豊富に存在している Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase に着目し、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase の阻害薬を蝸牛階外リンパに灌流しながら、蝸牛側壁の様々な微小区域の電位、K<sup>+</sup> 濃度を測定した。モルモットを全身麻酔下に蝸牛骨包を開放し、蝸牛側壁を露出させ、ダブルバレル K<sup>+</sup> 選択的イオン電極を用いて蝸牛側壁の各微小区域、内リンパの K<sup>+</sup> 濃度・電位を同時に測定した。また Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase の阻害薬を外リンパ灌流し、その K<sup>+</sup> 濃度、電位の変化を測定した。

内リンパに K<sup>+</sup> 電極を留置した後、線維細胞の Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase を阻害するため、50 μM Ouabain を外リンパ灌流し EP と

内リンパの K<sup>+</sup> 濃度を測定した。EP は大きく低下し、K<sup>+</sup> 濃度は変化しないことを確認した。次に K<sup>+</sup> 電極を外リンパから血管条に進め IS に留置したまま、50 μM Ouabain を外リンパ灌流し、ISP と K<sup>+</sup> 濃度を測定した。まず外リンパに K<sup>+</sup> 電極を留置したところ、外リンパの K<sup>+</sup> 濃度は 3.2mM であった。さらに K<sup>+</sup> 電極を進めたところで、K<sup>+</sup> 濃度が 32.0-71.5mM と大きく上昇した。これはシンチヂウムと考えられ、電位は 0-15mV であった。さらに K<sup>+</sup> 電極を進めて IS に入ると、平均 K<sup>+</sup> 濃度は +3.5 ± 0.2mM、平均電位は +77.8 ± 1.2mV を測定した。50 μM Ouabain を外リンパ灌流すると ISP は +12.0mV まで低下し、IS の K<sup>+</sup> 濃度はほとんど変化しなかった。電極をそのまま内リンパまで進めてゆくと、K<sup>+</sup> 濃度が著明に上昇し、電位は +3mV まで低下した。ISP はシンチヂウム頂上側の K<sup>+</sup> 拡散電位であり、

$$ISP = V_{syn} + \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{aK^+_{i(syn)}}{aK^+_{IS}} \right)$$

る。線維細胞基底側の Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase を ouabain で抑制しても aK<sup>+</sup><sub>IS</sub> (IS の K<sup>+</sup> 濃度) は変化がなかったため、ISP が低下する原因は aK<sup>+</sup><sub>i(syn)</sub> (シンチヂウムの K<sup>+</sup> 濃度) の減少、もしくは V<sub>syn</sub> (シンチヂウムの電位) の低下が考えられた。シンチヂウムの主要成分である線維細胞は細胞質が少なく細胞膜が入り組んでいるため、細胞内に電極を長時間留置するのは困難であった。そこで、我々は阻害薬をはじめに十分還流し、その後 K<sup>+</sup> 電極を蝸牛側壁から内リンパに向けて進めた。コントロール溶液を還流し外リンパから電極を進めていくと、IS または EL の近傍で K<sup>+</sup> 濃度が 60mM 程度であるコンパートメントが何回も見られた。我々はこのコンパートメントがシンチヂウムであると結論づけた。このコンパートメントの平均 K<sup>+</sup> 濃度は 60.2 ± 1.2mM、平均電位は +7.2 ± 0.9mV であった。次に 50 μM ouabain を外リンパ還流した後、電極を外リンパから内リンパに向けて進めた。内リンパまでに K<sup>+</sup> 濃度が外リンパと同程度、電位が +7.5mV の IS は見られたが、それ以外のコンパートメントは見られなかった。これは aK<sup>+</sup><sub>i(syn)</sub> が低下していることを強く示唆している。IS または EL 近傍のコンパートメントの平均 K<sup>+</sup> 濃度は 10.4 ± 1.2mM、平均電位は -3.9 ± 0.8mV であった。この結果より、線維細胞の Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase を阻害することで、線維細胞の K<sup>+</sup> 濃度を減少させ、シンチヂウムを過分極させることが示唆された。シンチヂウムの K<sup>+</sup> 濃度が減少し、それにより ISP が低下したと考えられる。辺縁細胞頂上側の電位変化は小さく、シンチヂウムの過分極も 11mV と小さいため、EP の低下はこの ISP の低下により生じたと考えられた。50 μM ouabain の外リンパ還流が aK<sup>+</sup><sub>i(syn)</sub> を低下させることを証明した。結果より、線維細胞は Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase により外リンパから K<sup>+</sup> を取り込んで高 K<sup>+</sup> を保っており、それにより高い ISP、EP を維持していることが分かった。これらの知見は生体内で初めて、線維細胞を介した動的な K<sup>+</sup> 輸送が EP 形成に寄与しているということを明らかにした。この局所的な K<sup>+</sup> 輸送は、外リンパから蝸牛側壁、内リンパ、有毛細胞を介した方向性の K<sup>+</sup> 循環を介在すると考えられる。