

機能性ナノ顕微鏡の開発による

内耳の上皮組織のイオン動態の解析

新潟大学医学部分子生理学分野

緒方 元気

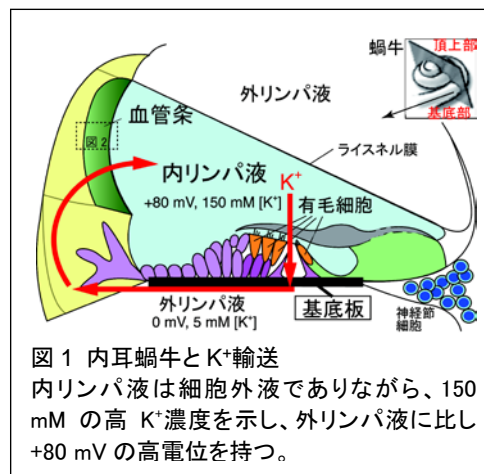
要旨

本研究では、生細胞をナノレベルで観察する次世代顕微鏡と、体液のイオン濃度を測定する機能性電極を統合した計測器を開発し、上皮組織の異なるイオン輸送経路（細胞膜・細胞間隙）におけるイオン動態の差異と意義の理解を目指す。生体内には様々な上皮組織が存在するが、本研究では内耳の血管条を対象とした。内耳上皮組織の血管条は、聴覚に必須である内耳の体液の電位・イオン環境を維持する。血管条のイオン動態の理解は、難聴の病態解明に重要である。本研究成果の今後のさらなる発展は、内耳上皮組織のみならず、様々な上皮組織の生理現象と上皮系疾患と病態生理の理解に寄与すると期待される。

1. 研究の背景・目的と成果

1-1. 研究内容と目的

一般に、体液の恒常性を維持する上皮組織においては、それを構成する細胞の膜を介してイオンが移動することが知られている。しかし、近年、細胞膜とは異なり、細胞間隙を介した輸送の存在が示唆されてきている。この経路は上皮組織の生理機能に極めて重要であることを示す実験結果も徐々に報告され、その障害が疾患を惹起するとも考えられるようになってきている。しかし、ナノオーダーである細胞間隙を正確に同定し、さらにその微小区分でのイオン動態を直接観察する計測系は存在しないため、この経路のイオン動態と組織機能との連関の理解は不十分である。そこで本課題では、疑似体液中での生きた細胞の表面形状をナノレベルの高分解能で捉え、同時にその近傍のイオン濃度変化を追尾する新規機能性顕微鏡を開発する。生体標本としては、申請者の所属する研究室が長年扱ってきた、聴覚を司る内耳の上皮組織を設定する。その細胞間隙と細胞膜におけるイオン動態の差異を観察することで、特に前者の生理的意義を理解し、聴覚機能における役割を推察する。

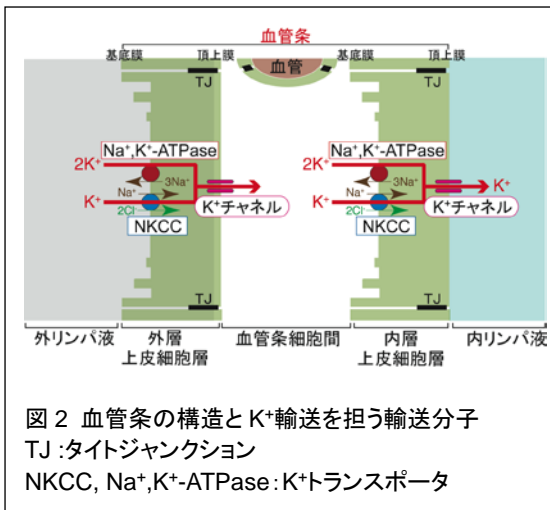


そこで本課題では、疑似体液中での生きた細胞の表面形状をナノレベルの高分解能で捉え、同時にその近傍のイオン濃度変化を追尾する新規機能性顕微鏡を開発する。生体標本としては、申請者の所属する研究室が長年扱ってきた、聴覚を司る内耳の上皮組織を設定する。その細胞間隙と細胞膜におけるイオン動態の差異を観察することで、特に前者の生理的意義を理解し、聴覚機能における役割を推察する。

1-2. 研究の背景

聴覚は重要な感覚である。日本には1千万人を超える難聴患者がいるという試算があり、その大部分は内耳蝸牛の障害に基づくが、病因不明の場合が多い。近年、音受容器である内耳の蝸牛が含有する体液「内リンパ液」の特殊な電位・イオン環境の障害により、難聴が惹起されることが、モデル動物において見出されており、注目されている。

内リンパ液は 150 mM の高 K^+ 濃度と +80 mV の高電位を常に示す、蝸牛特異的な細胞外液である。この内リンパ液の電位・イオン環境の成立には、血管条が必須の役割を果たす (図 1, 2)。これまでに、血管条の細胞の膜上の種々のイオンチャネルやトランスポーターなどのイオン輸送分子が駆動する K^+ 輸送が、内リンパ液の特殊環境の維持に深く関わることが明らかとなった (図 2) (Nin et al., PNAS 2008; Hibino et al., Pflügers Arch 2010)。さらに、上皮細胞間隙における電気的バリア機構が血管条の細胞外空間の高電位を維持し、これが内リンパ液の高電位の恒常性に必須であることも判明した。



バリア機構は、図 2 に示した細胞間隙のタイトジャンクション (TJ) により達成されると現在考えられている。しかし、近年、他の臓器において、TJ はイオン輸送も担うことが実験により示唆されてきている。蝸牛内リンパ液のイオン濃度の維持には、細胞膜によるイオン輸送だけで説明できない部分があり、TJ を介した細胞間隙イオン輸送の存在と意義を解明する必要がある。しかし、ナノスケールである細胞間隙を同定し、その周辺のイオン動態を観察する計測系は存在しない。この課題を克服するため、本研究では、液体中の生細胞表面を高解像度で捉える「イオンコンダクタンス顕微鏡」と K^+ または Na^+ 濃度を測定する「イオン電極」を組み合わせた、画期的な機能性顕微鏡を開発し、血管条の細胞間隙を標的にしたイオン動態の測定を試みた。

2. 研究成果と今後の課題

本研究を進めるに当たり、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) を用いて、①ラット腎系球体の生きた標本より高解像度画像を得た (図 3 左)。また、②生きたラット内耳感覚上皮有毛細胞の画像を得ることが出来た (図 3 中央)。③SICM で得た有毛細胞の画像は、従来の電子顕微鏡画像 (図 3 右) と同等解像度を示した。上記の様に、イオン濃度や薬物等の細胞外刺激に対する生きた臓器組織の形態変化を、リアルタイム、かつ高解像度で観察出来るシステム構築には成功した。次にイオン電極を組み込んだ、ハイブリッド型 SICM を用いて、同様の実験を試みた。しかしながら現時点では、図 3 の様な画像を得るまでには至っていない。この原因として、SICM プローブと、イオン電極間で干渉が生じ、干渉ノイズが画像解像度へ影響していると考えられる。今後ノイズの問題を克服し、近い将来イオン電極ハイブリッド型 SICM の実現可能性は非常に近いと考えている。

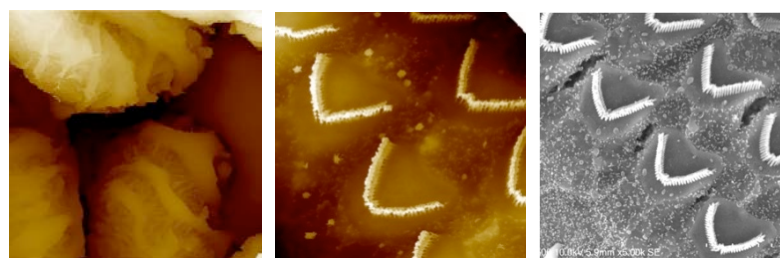


図 3 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡画像 (左・中央) と電子顕微鏡画像 (右)
腎系球体 (左)、感覚上皮の有毛細胞 (中央)、感覚上皮の有毛細胞 (右)