

研究概要報告書

(/)

研究題目	聴覚伝導において内耳シナプス機構へ与える神経栄養因子の役割	報告書作成者	君付 隆
研究従事者	君付 隆、坪井康浩、大橋 充、和田由起		
研究目的	<p>聴力は、内耳の有毛細胞から聴神経への神経伝達物質の放出メカニズムに依存している。老人性難聴を含むいわゆる感音難聴は、この神経伝達メカニズムの衰退によるものとされているが、現在では有効な治療法は無く、高齢化社会を迎えるにあたり大きな社会問題となることが予想される。一方、発生、成長に関連すると考えられてきた各種の神経栄養因子が、シナプスの神経伝達物質放出を、急性期において増大させるという反応が、中枢のニューロンにより解明されてきた。内耳においても同様の作用が期待され、その効果の確認により老人性難聴をはじめとする多くの感音難聴を治療する薬剤として使用できる可能性がある。本研究では、パッチクランプ法によりリアルタイムに細胞膜の電気容量 (膜面積) を測定することにより、内耳のシナプス機構の特性を検討し、さらに神経栄養因子を作用させ、その効果を確認する。</p> <p>以上が、計画書にて示した目的であるが、細胞膜電気容量の変化を測定する際、既知のイオンチャンネルをブロックする条件で膜電位パルスを与えると、未知のコンダクタンス変化が起こった。コンダクタンス変化を伴う場合、膜電気容量測定が正確にできないためまずこのコンダクタンス変化について検討することにした。下等セキツイ動物で、有毛細胞の感覚毛が膜電位変化に伴い active に変位し、これによるメカノセンサーチャンネルの活性化が報告されている。今回観察された電流もこのための電流と考えられたため、メカノセンサーチャンネルの特徴である順応 (adaptation) やブロッカー (ストレプトマイシン) による影響を調べた。</p> <p>有毛細胞のシナプスより放出されるトランスミッターは、グルタミン酸が候補に挙げられている。これは、シナプス後部の spiral ganglion cell に作用するものであるが、有毛細胞自身にポジティブフィードバックとして作用するという報告もある。有毛細胞にグルタミン酸レセプター - の auto-receptor が存在するかどうか、有毛細胞自身にグルタミン酸を投与して検討した。</p>		

研究概要報告書

(/)

<p>研究内容</p>	<p>モルモットあるいはラットの蝸牛より有毛細胞を単離し、パッチ電極にてホールセルあるいは穿孔パッチを作成し膜電気容量をリアルタイムで測定する。パッチクランプ法にて膜電気容量を測定するために、パッチクランプ用アンプ、2位相ロックインアンプが必要である。ファンクションジェネレータにより発生させた波形信号をパッチクランプ用アンプに入力し、発生した電流を2位相ロックインアンプによりコンダクタンスと電気容量の成分に分離させる方法により、膜電気容量の微細な変化をリアルタイムで測定する。</p> <p>無刺激での電気容量の変化(自発的なシナプス機構)、さらに脱分極刺激による電気容量の変化を測定し、シナプス機構の生理学的特性について検討する。神経栄養因子を、細胞外より陽圧パフピペットを用い投与し、膜電気容量測定によりシナプス機構の変化を観察する。また、細胞内灌流法を用い、細胞内カルシウムイオン濃度を変化させ、これらの修飾因子がどのように影響を与えるか比較検討する。上述の膜電気容量の測定のためには、パッチクランプ法の手技が不可欠であるが、申請者は、パッチクランプに関連する種々の手技(細胞内灌流法、ケージド化合物励起、細胞外液瞬時交換法、ナスタチン穿孔パッチ等)を修得しており、継続的に海外誌に発表している。</p> <p>以上を計画書にて示した。しかし、未知のコンダクタンスの変化が起こり膜電気容量の測定ができなかったため、まずこのコンダクタンス変化について検討した。感覚毛の変位による、メカノセンサーチャネル活性化によるコンダクタンス変化が予想されたため、まずメカノセンサー電流に特徴的な順応(adaptation)について検討した。膜電位を、-140mV ~ -40mV とし、adaptation 過程を単指数関数でフィッティングすることにより時定数を測定、電位依存性を観察した。次に、メカノセンサーチャネルのブロッカーであるアミノ配糖体系抗生物質(dihydrostreptomycin)を細胞外より投与し、電流の変化の有無を観察した。</p> <p>有毛細胞に、神経伝達物質であるグルタミン酸の auto-receptor が存在するか否か、0.1 mMのグルタミン酸を投与し電流の変化を観察した。ランプ波で膜電位を継続的に変化させることにより、惹起された電流の逆転電位を求め、チャネルのイオン選択性を調べた。グルタミン酸濃度を0.01 mM、0.03 mM、0.1 mM、1 mMと変化させ、濃度 反応曲線を作成し、Kd値とヒル係数を求めた。</p>
-------------	---

研究概要報告書

(/)

<p>研究のポイント</p>	<p>内耳有毛細胞のシナプス機構を研究する目的で、細胞膜電気容量の変化を測定予定であったが、シナプスを活性化するための膜電位変化により未知のコンダクタンス変化が起こった。膜電気容量測定のためにはこのコンダクタンス変化が障害となるため、まずこのコンダクタンス変化の原因となるイオン電流について調べる必要があった。他動物の報告により、感覚毛の active movement によるメカノセンサーチャネルの活性化による電流と考えられたためこれを確認したところ、同様の性質を有することが確認された。哺乳類において感覚毛の active movement に関する報告は初めてであり、非常に有意義な結果を得た。この性質は音の周波数別メカニズムに対しても新知見を与えるものである。また、シナプス機構のメインであるトランスミッター (グルタミン酸) の receptor が有毛細胞自身にも auto-receptor として存在することが確認された。これは、中枢ニューロンでは確認されているが、内耳においては電気生理学的には初めて得られた知見であり、シナプスメカニズムの解明のため重要な発見であった。</p>
<p>研究結果</p>	<p>細胞内をCスペースにした場合、+80mV で外向きの、-80mV で内向きのメカノセンサー電流様の膜電流変化を認めた (図1)。 内向き電流は、一過性の次第に減衰するadaptationの性質を有し、電位依存性があった (図2)。 メカノセンサーチャネルのブロッカーであるストレプトマイシンによりブロックされ、その程度は内向き電流でより顕著であった (図3)。 グルタミン酸投与により内向き電流の惹起を認めた (図4)。 ランプ波により電流の逆転電位を求めたところ、ほぼ0 mVで非選択性陽イオンチャネルの可能性が考えられた (図5)。 濃度-反応曲線より、Kd値は41 μM、ヒル係数は1.75であった。</p>
<p>今後の課題</p>	<p>感覚毛の active movement が存在するか否かを光学的に画像で確認。 メカノセンサーチャネルは、細胞内外のカルシウムイオン濃度により特性が変化する。主に adaptation がカルシウムイオン濃度増加により促進することが知られている。今回得られた電流が、メカノセンサー電流であることを確認するために、細胞内外のカルシウムイオン濃度を変化させ、電流の変化を観察する必要がある。 グルタミン酸の auto-receptor のサブタイプ (AMPA type, NMDA type など)を決定する必要あり。そのために、selective blocker の同時投与による膜電流の観察が必要である。 研究テーマである神経栄養因子の影響については、内毛細胞膜電流へ与えるプレリミナリーな結果は得たが (今回の報告書では記載せず)、将来はさらに詳細に実験を追加し報告できるようにしたい。また、膜電気容量を測定できるシステムを完成させ、シナプス機構解明に役立てたい。</p>

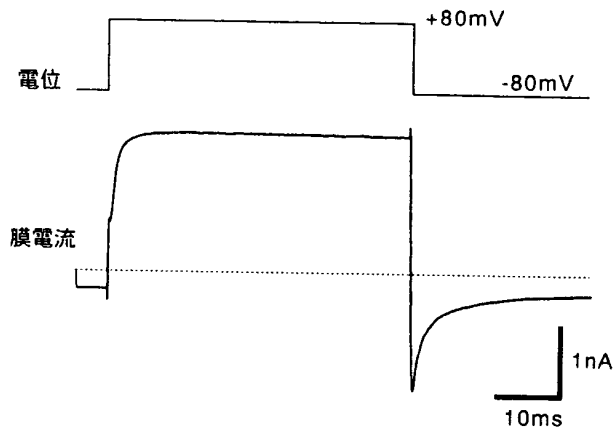


図1 脱分極(+80mV)、再分極(-80mV)で惹起されるイオン電流

下図の点線は、0電流レベルを示す。

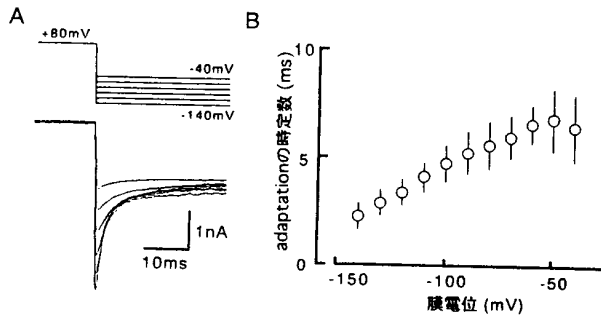


図2 adaptationの電位依存性

A : +80mVの脱分極刺激より再分極(-140mV~-40mV : 20mV間隔)させた際に発生する内向き電流を重ねて示す。
B : adaptation過程を単一指数関数にてフィットし、時定数をそれぞれの電位でプロット(n=6)。

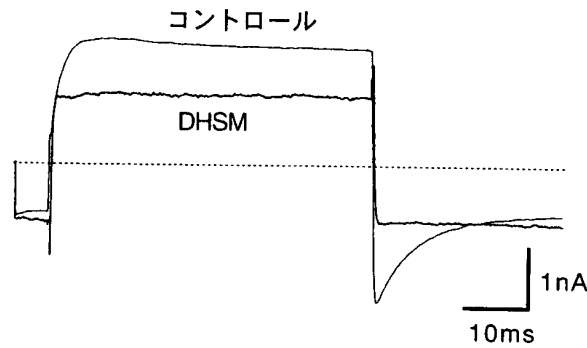


図3 DHSMによるブロック作用
脱分極刺激(+80mV)後、再分極(-80mV)した。太線がDHSM投与後の記録。



図4 グルタミン酸で惹起される膜電流
グルタミン酸の細胞外投与により、内向きの電流が惹起

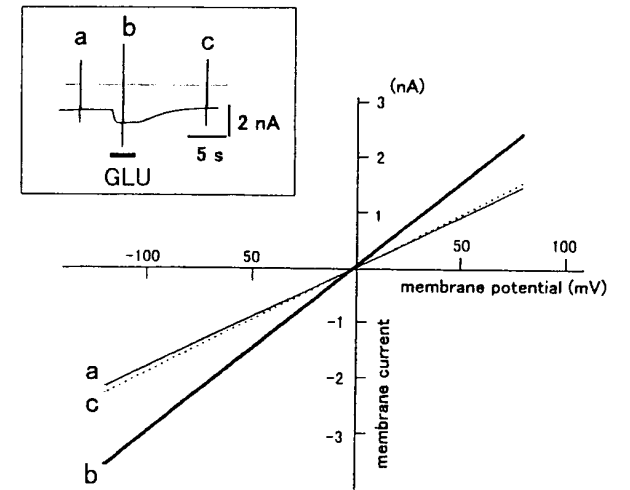


図5 グルタミン酸で惹起される膜電流の電流電圧曲線
a)コントロール、b)グルタミン酸投与中、
c)wash-out 逆転電位は約0mV