70 ラセン神経節細胞に対するプリン・ピリミジン作動薬のタイプ別作用について

伊藤 健

東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科

はじめに

内有毛細胞・ラセン神経節細胞間のシナプスにおいては、グルタメートが最も重要な神経伝達物質であるとされているが、ATPを含む様々な神経細胞に薬理効果を持つ物質が、ラセン神経節細胞の遠心性シナプスにおいて、神経修飾因子としての働きを持つ可能性が示されている。ラセン神経節上のプリン受容体の存在は、オートラジオグラフィー、*in situ* ハイブリダイゼーション、免疫染色などの手法によって証明されており、また *in vivo* および *in vitro* の実験により、これらの受容体が生理学的に機能することが示されている。最近になって我々はラットのラセン神経節細胞において、ATPが陽イオン非選択性チャネルを活性化させることを示した (Ito & Dulon, 2002)。電位固定のパッチクランプを行った細胞にATPをごく短時間 (1 ms 以下) 作用させると、潜時が無くATP投与中にのみ活性化される第1相、および約1 sの潜時を持ち、ATP投与後も活性化が続く第2相を持つ、2相性の内向き電流が記録された。第2相は3~4 sでピークを作り、15~30 sでゆっくりと不活性化された。電流・電圧関係から、反転電位は0 mV付近であり、陽イオン非選択的チャネルであると推定された。これは、ATPがイオンチャネル型 (イオントロピック) 受容体と、メタボトロピック受容体を別々に活性化していることを強く示唆しており、異なるサブタイプのATP受容体 (プリン・ピリミジン受容体) が関与している可能性がある。今回の研究では、3つのサブタイプ特異的リガンドを用いて検討した。すなわち、P2Xに対して α,β -methylene ATP (α,β -meATP)、P2Yに対してuridine 5'-triphosphate (UTP)、P2Zに対して2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (Bz-ATP)である。

方法

生後3~7日目 (P3-P7) のラットを50 mg/ml ケタミン・2%キシラジンの等量混合液腹腔内投与後に断頭した。蝸牛を側頭骨から取り出し、NaCl 136.9, Na₂HPO₄ 6.5, KCl 2.7, KH₂PO₄ 1.5, CaCl₂ 0.9, MgCl₂ 0.5 (mM) を含み、pH を 7.3 に調整した Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) に浸した。骨包を開放し、血管条とコルチ器を除去して、基底部の2回転からラセン神経節を採取した。トリプシンによる酵素処理の後、ペトリ皿の上で機械的に細胞を単離した。実験を開始する前に2時間以上室温に放置した。電氣的記録は通常のホールセルパッチクランプ手技にて行った。ピペット内液の組成は、KCl 158, KOH 3.5, MgCl₂ 2.0, EGTA 1.1, HEPES 5.0 (mM) で、pH 7.2, 浸透圧 300 mOsm に調整した。データ収集・解析には、Axotape・pCLAMP software および IGOR Pro software を用いた。電極抵抗は3~6 M Ω であった。電流・電位関係は電圧ランプ (-80 mV~+70 mV, 900 ms) を用いて計測し、シリーズレジスタンスによる誤差を補正した。全ての実験は室温 (20~22℃) にて施行した。リガンドを含む溶液は、Picospritzer puffer system を用いて、短時間細胞に投与した。ピペットの先はラセン神経節細胞から20~40 μ mの位置に置き、薬剤到達までの時間は20~50 ms

sであった。繰り返し薬剤を投与する場合には、最低2分間の間隔を開けた。

結果

*P2X*リガンドの効果

100 μ M α,β -meATP は、ATP に対して反応性を有するラセン神経節細胞に何ら電気的效果（膜コンダクタンスの変化）を来さなかった ($n = 5$)。

*P2Y*リガンドの効果

ホールセル電位固定 (-50 mV) 条件において、UTP の短時間投与 (100 μ M, 1 s) は 71 % のラセン神経節細胞において ($n = 17$) 内向き電流を惹起した。ピーク電流は平均約 340 pA であった。電流は 1.5 s 程度の潜時を持ち、4~6 s でピークをなし、15~30 s で徐々に消退した。電流・電位関係から、反転電位は約 3 mV であり、ATP における第2相の電流と同様、陽イオン非選択性チャネルであると推定された。リガンドの投与から電流の活性化までに時間を要することは、*P2Y* 受容体を介したメタボトロピック過程の関与を予想させるものである。

*P2Z*リガンドの効果

ホールセル電位固定 (-50 mV) 条件において、Bz-ATP の短時間投与 (100 μ M, 1 s) は 69 % のラセン神経節細胞において ($n = 16$) 内向き電流を惹起した。Bz-ATP による電流は潜時なく活性化され、リガンド投与中ずっと維持され、投与の終了とともに急速に不活性化された。これは、ATP における第1相の電流に類似する特徴である。リガンドの投与時間を延ばして、電圧ランプによって電流・電位関係を測定すると、反転電位は約 -12 mV であり、やはり陽イオン非選択的チャネルではあるものの、ATP 電流第2相・UTP 電流よりは透過性が低いものと考えられた。

考案

まとめると、*P2Z* リガンドである Bz-ATP は ATP によって惹起される電流の第1相と、また *P2Y* リガンドである UTP はその第2相と類似した電気的応答をラットのラセン神経節細胞に惹き起こした。*P2X* リガンドである α,β -meATP は、明らかな電気的作用を持たなかった。ラセン神経節細胞において、*P2Y* 受容体は、メタボトロピック過程を経て、すでに報告されている細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用に加えて、陽イオン非選択的チャネルを開いて膜透過性を上昇させる効果を持つと言える。また、*P2Z* 受容体は、他の神経細胞で報告されているような、イオンチャネル型の陽イオン非選択性チャネルを開く作用があることが、ラセン神経節細胞では初めて示されたことになる。*P2X* 受容体は関与しないと考えられるが、*P2X* 受容体のさらに下のレベルのサブタイプにおいて (*P2X₂*, *P2X₅*, *P2X₆* など)、 α,β -meATP が無効である細胞が報告されているため、全く関与を否定することはできない。ただし、他により特異的なリガンドは存在せず、現在のところ関与は薄いと結論付けた。異なるサブタイプの受容体の関与は、異なる機能と関連する可能性がある。ラセン神経節細胞における各サブタイプの果たす役割についてさらに考察を加え、発表する。