前庭暗細胞におけるカルシウムチャンネルの存在

井門謙太郎¹⁾・森 良樹¹⁾・夜陣 紘治¹⁾

原田 康夫¹⁾・天野 託²⁾・辻山 修司²⁾

笹 征史²⁾・田村 豊³⁾・赤池 昭紀³⁾

Existence of Ca^{2+} Channel in Vestibular Dark Cells

Kentaro Imon, Yoshiki Mori, Kohji Yajin, Yasuo Harada,

Taku Amano, Shuji Tsujiyama and Masashi Sasa

(Hiroshima University)

Yutaka Tamura and Akinori Akaike

(Fukuyama University)

To determine whether the functional Ca^{2+} channel exist in the vestibular dark cells, an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) due to high K^+ application was measured in dark cells isolated from the ampullae of the semicircular canal of the guinea pig using the Ca^{2+} sensitive dye, Fura-2, and digital imaging microscopy. When 40 mM K^+ was added to the bath, there was a rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which returned to the original level after washing. Application of the Ca^{2+} channel blocker, nifedipine (1 μM) blocked the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These results suggest the existence of voltage-dependent Ca^{2+} channels in the dark cells, which are presumably involved in the regulation of Ca^{2+} concentration in vestibular endolymph.

Key words: Ca^{2+} channel, vestibular dark cells, Fura-2, nifedipine

緒 言

前庭暗細胞は三半規管膨大部稜基底部, 卵形囊前後壁, および総脚の広範な部位に存在する非感覚上皮細胞である。暗細胞はその形態学的特徴が他のイオン輸送機能を持つ細胞に類似していることから, 何らかのイオン輸送に関与しているのではないかと考えられてきた¹⁾。その後の研究により, 暗細胞は内リンパへの K^+ の分泌および Na^+ の吸収機構を持つと考えられるようになったが^{2)~8)}, 他の機能についてはま

だ推測の域を出ていない。一方, 形態学的観察から, 暗細胞は耳石の吸収に関与していることがLim⁹⁾, Haradaら¹⁰⁾によって示唆されている。近年, Yoshiharaら¹¹⁾は Ca^{2+} -ATPase活性が暗細胞の基底膜に沿って見いだされることから, 暗細胞は内リンパ液の Ca^{2+} 濃度の調節に重要な役割を果たしているのではないかと推定している。しかし, 暗細胞が実際に Ca^{2+} 輸送に関与しているか否かはなお不明である。

今回我々は暗細胞が Ca^{2+} チャンネルを介し

1) 広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室

2) 広島大学医学部薬理学教室

3) 福山大学薬学部神経薬理学教室

て Ca^{2+} 輸送を行なっているのではないかと考え、このことを確かめるため単離した暗細胞を用いて検討した。

方 法

1) 細胞単離

実験には、生後4～6週の有色モルモット(体重200 g)14匹を使用した。細胞単離の方法はWannemannら¹²⁾およびYamashitaら¹³⁾の手法を参考にした。有色モルモットをpentobarbital (25 mg/ml)にて麻酔を行い、開頭後内耳を含む側頭骨を摘出し、素早く低温の(4℃)人工外リンパ液に移した。実体顕微鏡下に3個の半規管膨大部を骨より分離摘出した。

今回の実験には膨大部稜の両側に存在する暗細胞領域のみを使用した。暗細胞の下に存在する結合組織のメラノサイトが良い指標となるが、最終的な同定は高倍率下(600×)の形態学的形状により行なった。暗細胞領域のみを带状に摘出し、0.25 mg/ml collagenase (Wako Pure Chemical Industries Ltd)にて20分間処理し、室温下にピペティングにて細胞を単離した。単離した細胞はpolyethylenimine (Sigma)をコーティングしたカバーガラス上に付着させ、人工外リンパ液を満した小水槽(1.5×2.5×0.5 cm)内に室温にて保持した。

2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fura-2 を用い、2個の異なる波長の光に対する蛍光強度の比より計算される。Fura-2 の蛍光は Ca^{2+} 濃度の増加により、340 nm の光に対してはその蛍光強度が増加し、380 nm の光に対してはその蛍光強度が減少するという性質があるので、 Ca^{2+} 濃度はこの 340/380 nm の比を利用して計算した。

単離細胞を保持した人工外リンパ液に 5 μM Fura-2/AM (Dojindo) を加え、室温にて60分間保持した。この小水槽容器を光学顕微鏡 Olympus IMT-2 のステージの上にのせ、MCID Image Analysis System (Neuroscience) を用いて細胞内の Ca^{2+} をイメージングし、解析し、測

定した。

3) 溶 液

人工外リンパ液の組成は、150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.2 mM Na_2HPO_4 , 0.4 mM KH_2PO_4 , 12 mM HEPES, および 10 mM glucose より成り、pH 7.4 に補正し、浸透圧は 300 Osm に補正した。単離細胞を含有する小水槽には、この人工外リンパ液を micro perperex pump (Pharmacia) を用いて 3 ml/分 の速度にて灌流した。人工外リンパ液に溶解した nifedipine (Sigma) および高カリウム液 (40 mM KCl) は、灌流系を介して水槽内へ投与した。

結 果

単離した暗細胞は球形を呈し、有毛細胞とは明らかに区別することができた(図1)。人工外リンパ液内の KCl 濃度を 40 mM として灌流すると40秒後に、小水槽内の KCl 濃度が 40 mM に達した。この時点より単離した暗細胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は著明に増加し、60秒以内に最高濃度に達した(図2)。40 mM KCl 除去後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は減少していき、3分以内に高 KCl 負荷前の濃度に回復した(図3A)。KCl 負荷後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の最高値は $293.93 \pm 12.37 \text{ nM}$ ($n=9$) であった。

一方、dihydropyridine 系 Ca 拮抗薬である nifedipine 1 μM を灌流液に加えておいて、40 mM KCl を負荷した場合には $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加はほぼ完全に抑制された(図3B)。

図1 単離前庭暗細胞

考 察

前庭特殊細胞の一種である暗細胞は, 1907年 Kolmer¹⁴⁾ が初めて記載している. その機能については, 内リンパの分泌と吸収に深く関与していると考えられてきた. 1986年に Bernard

ら²⁾, および1987年に Marcus ら³⁾ は, 暗細胞は K^+ を外リンパより吸収し内リンパへ分泌していると考えた. 一方, Ferrary ら⁴⁾ は Na^+ を内リンパより吸収していると報告している. 最近の研究により, 暗細胞のイオン輸送機構には, $Na^+-K^+-ATPase$ と $Na^+-K^+-Cl^-$ cotransporter が関与することが示されている⁵⁾. さらに最近パッチクランプ法による研究の結果, 暗細胞には二種類の Cl^- チャンネル⁶⁾, 非選択性の陽イオンチャンネル⁷⁾ および maxi- K^+ チャンネル⁸⁾ が存在することが明らかにされた.

一方, 内リンパ液の Ca^{2+} 濃度は 10^{-4} – 10^{-5} M であり, 細胞外液の 10^{-3} M に比べると低いが, 細胞内液の 10^{-7} M よりはるかに高い. このため内耳には, 内リンパ液の Ca^{2+} 濃度をある一定の濃度に保つ機構があると考えられてきた. Lim⁹⁾ は, 暗細胞表面に接している耳石が虚脱している像を観察し, 暗細胞は耳石より Ca を吸収していると考えた. この考えは Harada ら¹⁵⁾ が, 暗細胞表面に接している耳石内の Ca が種々に減弱していることを観察したことによっても支持されている. さらに Yoshihara ら¹¹⁾ は細胞学的手法により暗細胞の表面

図2 高 K^+ 投与による単離前庭暗細胞内への Ca^{2+} 流入

A: 40 mM KCl 投与前 B: 40 mM KCl 投与80秒後

A: 40mM K^+ 投与時

B: 1 μ M nifedipineの存在下における 40mM K^+ 投与

図3 高 K^+ 投与時の単離前庭暗細胞内 Ca^{2+} 濃度

に Ca^{2+} -ATPase 活性が強いことを見いだし、暗細胞は内リンパ液の Ca^{2+} 濃度の調節に重要な役割を果たしているのではないかと推定している。我々は、暗細胞のこのような Ca^{2+} 濃度調節作用を証明すべく、高 K^{+} 刺激による暗細胞内への Ca^{2+} 流入の測定を試みた。 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fura-2 を用いて、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定する方法は、前庭器官ではすでに前庭有毛細胞に応用され、多くの報告がある^{13)16)~19)}。今回我々は、Fura-2 を暗細胞に応用し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定した。40 mM K^{+} 負荷により、暗細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は急速に増加し、高 K^{+} 除去後には負荷前のレベルへ戻った。高 K^{+} により暗細胞が脱分極を起こし、この結果 Ca^{2+} チャンネルが開口して Ca^{2+} 流入が起こったと考えられる。事実、同一細胞に Ca^{2+} チャンネルブロッカーの Nifedipine を灌流しておいた場合には、 K^{+} 負荷による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は完全に抑制されたことから、暗細胞には電位依存性の Ca^{2+} チャンネルが存在すると考えられる。現在 Ca^{2+} チャンネルには T, L, N, および P 型の 4 種が存在する²⁰⁾。dihydropyridine 系 Ca^{2+} 拮抗薬である nifedipine により Ca^{2+} 流入が抑制されたことより、今回認められた Ca^{2+} チャンネルは L 型チャンネルと考えられる。この Ca^{2+} チャンネル機構は今後のパッチクランプ法による研究により明らかにされると思われるが、おそらく内リンパ液の Ca^{2+} 濃度の調節に関与していると思われる。

まとめ

- 1) Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fura-2 を用いて、単離前庭暗細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を測定した。
- 2) 暗細胞に 40 mM KCl を投与後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は著明にかつ可逆的に増加した。
- 3) 同一細胞に Ca 拮抗薬である 1 μM Nifedipine を灌流液に加えた後に、KCl 負荷を行った場合には、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は完全に抑制された。
- 4) 今回の実験により、dihydropyridine 系 Ca^{2+} 拮抗薬に感受性を持つ電位依存性 L 型カ

ルシウムチャンネルが暗細胞に存在すると考えられた。

文 献

- 1) Kimura RS : Distribution, structure and function of dark cells in the vestibular labyrinth. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **78** : 542~561, 1969.
- 2) Bernard C, Ferrary E and Sterkers O : Production of endolymph in the semicircular canal of the frog *Rana esculenta*. *J Physiol Lond* **371** : 17~28, 1986.
- 3) Marcus NY and Marcus DC : Potassium secretion by nonsensory region of gerbil utricle in vitro. *Am J Physiol* **253** : F613~F621, 1987.
- 4) Ferrary E, Bernard C, Oudar O, et al : Sodium transfer from endolymph through a luminal amiloride-sensitive channel. *Am J Physiol* **257** : F182~F189, 1989.
- 5) Marcus DC, Marcus NY and Greger R : Sideness of action of loop diuretics and ouabain on nonsensory cells of utricle ; a micro-Ussing chamber for inner ear tissues. *Hear Res* **30** : 55~64, 1987.
- 6) Wangemann P and Marcus DC : The membrane potential of vestibular dark cells is controlled by a large Cl^{-} conductance. *Hear Res* **62** : 149~156, 1992.
- 7) Marcus DC, Takeuchi S and Wangemann P : Ca^{2+} -activated nonselective cation channel in apical membrane of vestibular dark cells. *Am J Physiol* **262** : C1423~C1429, 1992.
- 8) Takeuchi S, Marcus DC, and Wangemann P : Maxi- K^{+} channel in apical membrane of vestibular dark cells. *Am J Physiol* **262** : C1430~C1436, 1992.
- 9) Lim DJ : Formation and fate of otoconia ; scanning and transmission electron microscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **82** : 23~35, 1973.
- 10) Harada Y and Sugimoto Y : Metabolic disorder of otoconia after streptomycin intoxication. *Acta Otolaryngol (stockh)* **84** : 65~71, 1977.
- 11) Yoshihara T, Igarashi M, Usami S, et al : Cytochemical studies of Ca^{2+} -ATPase activity

- in the vestibular epithelia of the guinea pig. Arch Otorhinolaryngol **243** : 417~423, 1987.
- 12) Wangemann P and Marcus DC : Membrane potential measurements of transitional cells from the crista ampullaris of the gerbil. Pflügers Arch **414** : 656~662, 1989.
  - 13) Yamashita T, Ohnishi S, Ohtani M, et al : Effect of efferent neurotransmitters on intracellular Ca^{2+} concentration in vestibular hair cells of the guinea pig. Acta Otolaryngol (stockh) Suppl **500** : 26~30, 1993.
  - 14) Kolmer W : Gehörorgan. Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen (ed by Mollendorff W). pp 250~478, Springer, Berlin, 1927.
  - 15) Harada Y and Tagashira N : Metabolism of otoconia. Biomed Res Suppl **2** : 415~420, 1981.
  - 16) Ohtani M, Yamashita T, Amano H, et al : Thermal influence on intracellular calcium concentration in vestibular hair cells isolated from the guinea pig. Acta Otolaryngol (stockh) Suppl **500** : 46~49, 1993.
  - 17) Lapeyre PNM, Kolston PJ and Ashmore JF : GABA mediated modulation of ionic conductances in type I hair cells isolated from guinea-pig semicircular canals. Brain Res **609** : 269~276, 1993.
  - 18) Ohmori H : Mechanical stimulation and Fura-2 fluorescence in the hair bundle of dissociated hair cells of the chick. J Physiol (Lond) **399** : 115~137, 1988.
  - 19) Shigemoto T and Ohmori H : Muscarinic agonists and ATP increase the intracellular Ca^{2+} concentration in chick cochlear hair cells. J Physiol (Lond) **420** : 127~148, 1990.
  - 20) 金子周司 : 神経の電位依存性 Ca^{2+} チャンネル. イオンチャンネルとレセプター実験医学(御子柴克彦, 他編). 18~21頁, 羊土社, 東京, 1992.

(別刷請求先 : 井門謙太郎
〒734 広島市南区霞1-2-3
広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室)