

## 音響外傷性難聴における カルシニューリンの役割

分担研究者：小川 郁（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）

研究協力者：南 修司郎、山下大介、齋藤秀行（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

音響外傷における calcineurin の役割についてはまだ報告がなく、calcineurin が強大音刺激による細胞死にどのように関わっているかを明らかにすることが本研究の目的である。強大音刺激によって外有毛細胞内の特に cuticular plate 部分に calcineurin の発現を認めた。また、強大音刺激後、経過とともに calcineurin 陽性の有毛細胞は減少し、7日目までにはコントロールと同様に calcineurin の発現はみられなくなった。しかし、それと同時に有毛細胞死は増加した。また、Calcineurin 阻害剤である FK506 と cyclosporin A はこれら有毛細胞死を抑制することが明らかになった。以上の結果より calcineurin の活性化が強大音刺激による難聴の発症機序で重要な役割を担っている事が示唆された。

### 研究目的

強大音刺激は蝸牛有毛細胞内カルシウム濃度の上昇を介して有毛細胞を障害し、有毛細胞死を引き起こすことが報告されている。カルシウム過負荷は様々な細胞死経路に関わっており、calcineurin はそれら経路の一部を担っている。Calcineurin はカルシウムと calmodulin によって制御される phosphatase である。Calcineurin は免疫機構、心筋肥大、神経筋発生、記憶、そして細胞死など

に関わっている。本研究の目的は音響外傷の有毛細胞死における calcineurin の役割を明らかにすることである。

### 研究方法

実験にはオスの有色モルモット（2～4週）を用いた。ABRにて両側正常聴力を確認した後、4 kHz を中心としたオクターブバンドノイズを 120 dB SPL の強さで 5 時間暴露した。聴力の評価は ABR にて行い、4、8、16 kHz の 3 周波数で域値を測定した。

音響暴露直後、1、3、7日後に ABR を測定し、さらに深麻酔下で蝸牛を摘出し、4% paraformaldehyd にて灌流、固定した後、calcineurin と rhodamine phalloidin の免疫組織標本を作成した。1次抗体として anti-calcineurin 抗体を、2次抗体として Alexa Flour 488-conjugated goat anti-mouse IgG を用いて染色した。洗浄後、rhodamine phalloidin でアクチンを染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。4 kHz のオクターブバンドノイズにより障害される蝸牛頂より約 10 mm の部位の標本で免疫学的評価を行った。

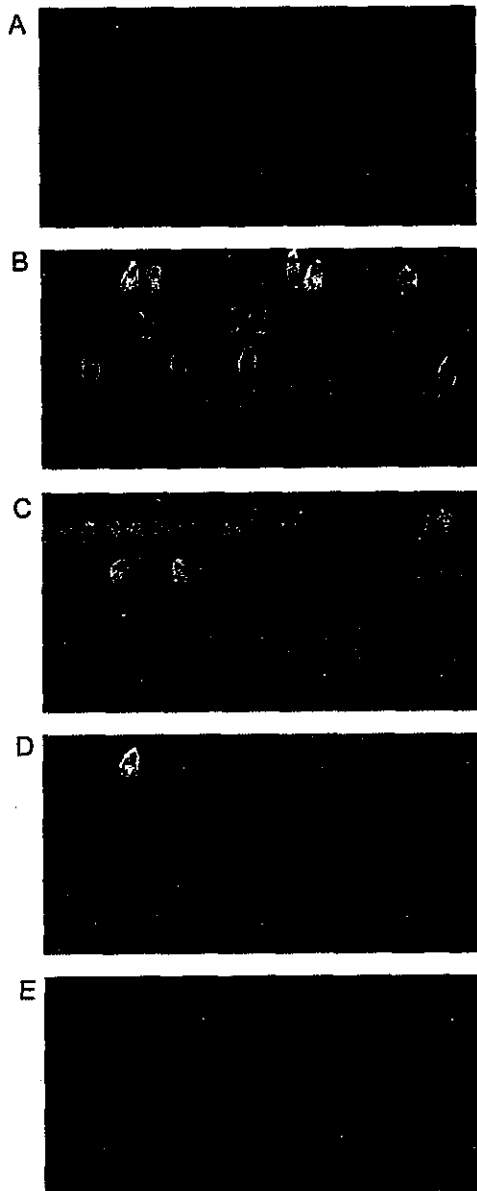
さらに、calcineurin の阻害薬である FK506 (0.01、0.1、1、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、cyclosporin A (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、対照として人工外リンパ液 (AP) を浸透圧ポンプにて持続的 (0.5  $\mu\text{l}/\text{hr}$ ) に直接蝸牛鼓室階に投与し、その効果についても同様に検討した。

有毛細胞死の評価のため、rhodamine phalloidin を用いて前述と同様の免疫染色法にてスライドを作製し、蝸牛頂より 0.19 mm ずつ有毛細胞数を計

測し、縦軸を有毛細胞の消失の割合 (%)、横軸を蝸牛頂からの距離 (mm) としてグラフを作成した。

## 研究結果

強大音刺激によって外有毛細胞内の特に cuticular plate 部分に calcineurin が発現した (図 1)。また強大音刺激後、経過とともに calcineurin 陽性の有毛細胞の数は減少し、7日目までには音響負荷をかけていないコントロールと同様に calcineurin 発現はみられなくなった。それと同時に有毛細胞死の増加を認めた。



図：強大音刺激による有毛細胞消失と calcineurin の発現

calcineurin (緑) とアクチン (赤) の二重染色。各切片は蝸牛頂より 10 mm の部位。(A) 強大音刺激なし、(B) 強大音刺激直後、(C) 1 日後、(D) 3 日後、(E) 7 日後。強大音を負荷していない有毛細胞内に calcineurin

の発現は認めない。強大音刺激後時間が経過するにのにしたがい calcineurin 陽性有毛細胞は減少し、細胞死を呈する有毛細胞が増加した。

Calcineurin 陽性の有毛細胞と細胞死との関係を検討するために、propidium iodide (PI) による核染色を行った。PI は正常細胞膜を通過する事ができず、細胞死初期の現象である崩壊した細胞膜のみ通過することができるため、細胞死に至る細胞を認識することができる。Calcineurin 陽性の有毛細胞は PI 染色においても陽性を示し、この結果より、calcineurin は有毛細胞死と密接に関係していると考えられた。

FK506 (1、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と cyclosporin A (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) は強大音刺激による ABR の域値上昇を有意に抑制し、有毛細胞死の数も有意に減少した。つまり、calcineurin 阻害剤が強大音刺激による難聴を機能的また形態的に防御すると考えられ、calcineurin の活性化が音響外傷による難聴の経路において重要な役割を担っている事が示唆された。

## 考察

上記の結果より強大音刺激による calcineurin の活性化は有毛細胞死を引き起こし、難聴を導くと考えられる。しかし、calcineurin の局在、calcineurin による有毛細胞死の機序は未だ不明である。Calcineurin の局在は様々な anchoring 蛋白によって決められるという報告もある。例えば、シナプス後の樹状突起において、calcineurin は AKAP (A kinase-anchoring protein) によって細胞膜に局在し、アクチンの再構築を調節する。有毛細胞において、このような蛋白の報告はないが、とても興味をひかれるところである。Calcineurin による細胞死を導く様々なカスケードが報告されている。Calcineurin は NOS (nitric oxide synthase) を脱リン酸化し活性窒素による細胞死経路を導く。Calcineurin は Bcl-2 ファミリーの BAD を脱リン酸化し、アポトーシス経路を誘導する。また、最近 calpain に切断された calcineurin の過発現は caspase 活性を引き起こ

し、細胞死を導く。更に、calcineurin は酸化ストレスによる細胞死にも関与しているという報告もある。今回、特定の経路を明らかにする事はできなかったが、これらの経路の多くで calcineurin は活性化する必要がある。そこで、calcineurin 阻害剤が音響外傷を防御するかどうかは大変興味のあるところであった。calcineurin 阻害剤である FK506 と cyclosporin A を用い音響外傷による難聴を防御できたという事実は calcineurin の活性化が音響外傷性難聴に重要である事が示唆された。

## 結論

Calcineurin が音響外傷難聴において重要な役割を担っており、また calcineurin 阻害剤は音響外傷に対する臨床的価値を秘めていると考えられた。

健康危険情報：なし

## 研究発表

1. 論文発表：投稿予定
2. 学会発表：第14回日本耳科学会

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

- 2 . 実用新案登録 : なし
- 3 . その他 : なし

# ネスチン・GFP ラットを用いた急性音響障害後の 内耳幹細胞様細胞の発現に関する検討

分担研究者：小川 郁（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）  
研究協力者：神崎 晶、藤岡正人、佐藤美奈子、井上泰宏（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）、岡野栄之（慶應義塾大学生理学）

## 研究要旨

蝸牛有毛細胞を再生させる上で、内耳に存在する全ての細胞に分化しうる可能性をもつ内耳由来幹細胞の存在を確認することは重要である。本研究では中間径フィラメントであるネスチンをマーカーとして内耳幹細胞様細胞の存在を同定することが可能ではないか考えて、ネスチンと GFP (green fluorescent protein) が共発現するラットを用いて検討した。4 週齢のネスチン・GFP ラット蝸牛ではネスチン陽性細胞はラセン神経節細胞のみに認められ、コルチ器の有毛細胞と支持細胞を含む感覚上皮細胞層には認められなかった。また、4 kHz、125 dB のバンドノイズを 2 時間負荷したラットの蝸牛にも非常に少数ではあるが、コルチ器より内側にネスチン陽性細胞が認められた。

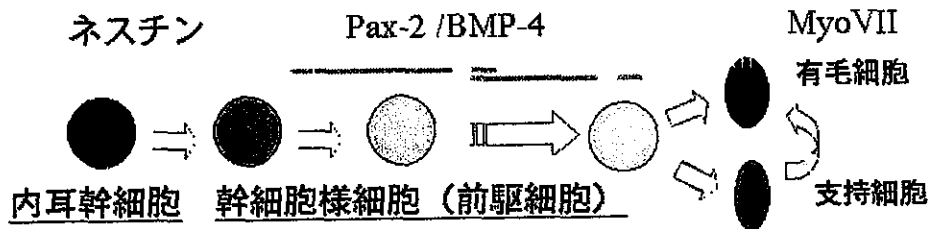
## 研究目的

内耳障害による感音難聴における有毛細胞の変性・消失は通常、不可逆性であることから、感音難聴の多くは難治性である。したがって内耳の再生医療は将来的に新しい感音難聴の治療法となる可能性が期待されている。蝸牛有毛細胞を再生させる上で、内耳に存在する全ての細胞に分化する可能性をもつ内耳由来幹細胞の存在を確認することは重要である。幹細胞の

定義は自己複製能と同時に多分化能を有していることである。内耳にも幹細胞あるいはそれに近い未分化な細胞（内耳幹細胞様細胞と定義する）が存在するのではないかと考えられている。そして、このような細胞にはネスチンという中間径フィラメントが発現している（図 1）。これらの知見はネスチンが神経幹細胞のマーカーであるという事実に基づいて、内耳においても同様のマーカーと

して応用されている。本研究ではネスチンの発現を確認することで内耳幹細胞様細胞の存在が同定可能ではないか考えて、ネスチンと GFP (green fluorescent protein) が

共発現するラットを用いて検討した。すなわち、GFP が発現し緑色を呈する細胞はネスチン陽性細胞であり、これをもって内耳幹細胞様細胞が存在すると考えられる。



図：内耳幹細胞と幹細胞様細胞

#### 研究方法

ネスチンと GFP が共発現する 4 週齢のラットの聴力があらかじめ正常であることを確認し、蝸牛を摘出して、4% パラホルムアルデヒド PBS 溶液にて固定し、4% EDTA-PBS 溶液で脱灰した。Surface preparation 法にて内耳幹細胞様細胞の局在に関して蛍光顕微鏡下に観察した。

#### 研究結果

4 週齢のネスチン・GFP ラットではネスチン陽性細胞はラセン神経節細胞のみに認められ、コルチ器の有毛細胞や支持細胞を含む感覚上皮細胞層には認めなかった。しかしながら、前庭 (卵形囊、球形囊、膨大部) の感覚

上皮細胞とほぼ同じ層にネスチン陽性細胞が認められた。

4 kHz、125 dB のバンドノイズを 2 時間負荷したラットを 1 週間後に犠死させ、蝸牛を観察したところ、蝸牛のコルチ器より内側に非常に少数ではあるがネスチン陽性細胞が認められた。

#### 考察

本研究の結果は、成熟ラットにおいても障害を与えると蝸牛コルチ器の内側を中心に幹細胞様細胞が発現する可能性を示唆するものである。Zhenget らの報告 (Nature Neuroscience 2000) によれば、培養下で生後 0 ~ 1 日齢のラット蝸牛有毛細胞へ転写因

子 Math1 を導入したところ、コルチ器よりも内側の領域 (great epithelial region; GER) に新しい有毛細胞が異所に発生したという。コルチ器の内側には未分化な細胞が存在し、障害が加わることによって幹細胞様細胞に分化するのかもしれない。中枢神経でも虚血などで神経細胞死が生じた際にネスチン陽性細胞が発現するという類似の報告があり、中枢神経の再生と同様なるメカニズムが内耳にも潜在していると考えられた。すなわち、本研究結果は蝸牛有毛細胞の再生を考えた場合、成熟ラットに存在する内因性幹細胞あるいは幹細胞様細胞を分化させ、前駆細胞に Math1 など転写因子を用いた遺伝子を導入することにより支持細胞や有毛細胞を再生させるといった戦略が将来的に臨床応用できる

期待を抱かせるものでありと考えられた。

#### 結語

ネスチン・GFP ラットでは通常は発現しない内耳幹細胞様細胞が急性音響障害後の蝸牛コルチ器の内側に発現した。この内耳幹細胞様細胞は支持細胞や有毛細胞に分化する可能性が考えられ、蝸牛有毛細胞の再生医療の可能性を示唆する知見と考えられた。

健康危険情報：なし

#### 研究発表

1. 論文発表：投稿予定
2. 学会発表：なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし



# 音響外傷蝸牛における炎症性 サイトカインの発現とその意義 —インターロイキン6を中心に—

分担研究者：小川 郁（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）  
研究協力者：藤岡正人、神崎 晶、岡本康秀、増田正次、  
井上泰宏（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）、岡野栄之、  
岡野 James 洋尚（慶應義塾大学医学部生理学）、三原昌彦、  
大杉義征（中外製薬 創薬研究第一部）、吉崎和幸（大阪  
大学健康体育健康医学第一部門）、岸本忠三（大阪大  
学）

## 研究要旨

蝸牛における炎症反応については未だ不明な点が多いが、実験的内耳炎モデルで炎症性サイトカインの発現が認められ、そのうち初期に発現するTNF $\alpha$ を阻害することで聴力低下が抑制されることが報告されている。本研究では音響外傷モデルを用いて、炎症性サイトカインの発現の有無を検討した。その結果、TNF $\alpha$ が負荷直後から、IL-6が負荷3～6時間後に一過性に発現した。免疫組織化学ではIL-6はラセン靱帯と基底膜の線

## 研究目的

炎症反応は臓器を超えて普遍的に存在する生体防御に必須の生理的反応であるが、過度の炎症は逆に臓器障害や生体そのものに有害となることがしばしばある。蝸牛にお

ける炎症反応についてはいまだ未知の側面が多いが、これまでに実験的内耳炎蝸牛で炎症性サイトカインが発現することが明らかにされ、そのうち初期に発現するTNF $\alpha$ を阻害することで聴力低  
維細胞・線維芽細胞の細胞質に発現した。また、sIL-6R特異的中和抗体で、抗サイトカイン剤として関節リウマチなどに対して臨床治験が行われているMR16-1（大阪大学・中外製薬）を投与することによって4kHz、8kHzを中心に有意な聴力域値上昇の抑制を認め、今回の音響条件においてIL-6は音響外傷を悪化させる因子のひとつであることが示唆された。

ける炎症反応についてはいまだ未知の側面が多いが、これまでに実験的内耳炎蝸牛で炎症性サイトカインが発現することが明らかにされ、そのうち初期に発現するTNF $\alpha$ を阻害することで聴力低

下が抑制されることが報告されている。

一方、他臓器では、外傷や虚血といったおよそ直接の免疫誘導とは異なる組織傷害でもこのような炎症反応が生じることが知られている。そこで本研究では音響外傷モデルを用いて、炎症性サイトカインの発現の有無およびその役割について検討した。

#### 研究方法

実験には C57BL/6J マウス（4～6週齢、雄）を用いた。4 kHz 中心のオクターブバンドノイズ 124 dB SPL を 2 時間負荷した後、0、3、6、12、24 時間、3、5、7、14、28 日後に断頭して蝸牛を取り出し、RT-PCR 法、定量 RT-PCR 法にて複数種の炎症性サイトカインの発現を検討した。前実験として ABR にて聴力域値変化を測定したところ、4 kHz～20 kHz で 40～60 dB の域値上昇をもたらす永続的域値変化（permanent threshold shift : PTS）を呈した。

また、sIL-6R 特異的中和抗体で、抗サイトカ

イン剤として関節リウマチなどで臨床試験が行われている MR16-1（大阪大学・中外製薬）の投与による IL-6 シグナルの変化について検討した。なお、過去の報告から MR16-1 の投与量として全身の sIL-6R を中和する量とした。前実験としてウェスタンブロット法を用いて下流のシグナルが抑制されることを確認したのち、ABR による域値変化を測定した。

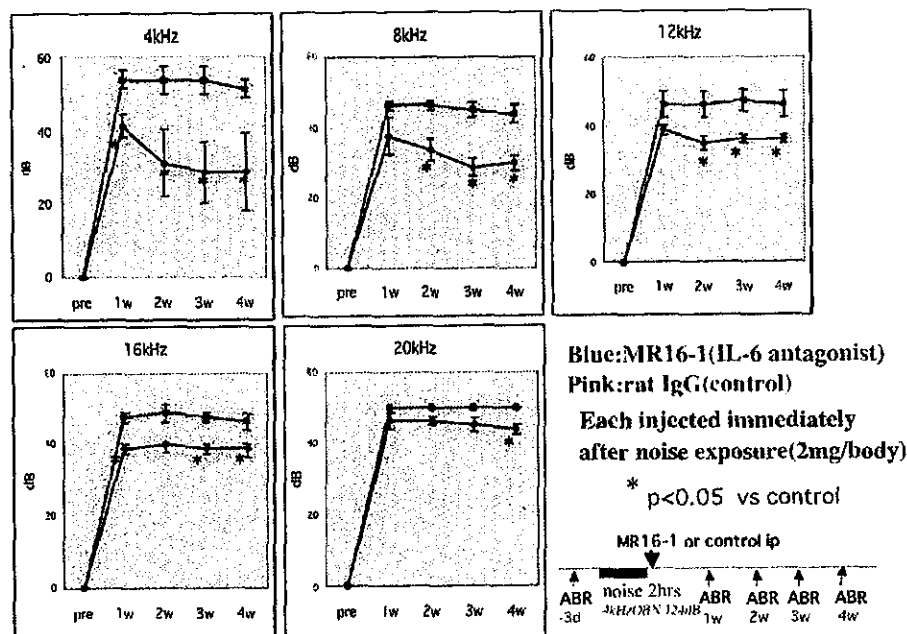
#### 研究結果

TNF $\alpha$  が負荷直後から発現したのに対して、IL-6 は少し遅れて負荷 3～6 時間後に一過性に発現を認めた。免疫組織化学では、IL-6 はラセン靭帯と基底膜の線維細胞・線維芽細胞の細胞質に限局して発現を認めた。

一方、音響負荷 12 時間後に血管条の中間細胞と一部の血管内皮で STAT3 の活性化が認められたが、ラセン靭帯には発現を認めなかった。

次に抗サイトカイン剤 MR16-1 投与により 4 kHz、8 kHz を中心に聴力域値上昇が有意に抑制された（図）。

## MR16-1 reduced threshold shift significantly



図：MR16-1投与により聴力域値上昇が有意に抑制された。

### 考察

これまでの報告では蝸牛における *in vivo* での炎症性サイトカインの発現は、浸潤白血球に限局しており、蝸牛組織そのものにおける炎症性サイトカイン産生に関する報告はなかった。本研究では音響刺激によりラセン靭帯と基底膜の線維細胞・線維芽細胞の細胞膜にIL-6の発現が認められた。近年の *in vitro* 実験系での蝸牛外側壁におけるIL-6を含む炎症性メディエータの産生能に関する報告と併せて考えると、音響外傷に続発して生じる炎症反応には、血球系のみならず蝸牛外側壁そのものが有する炎症反応惹起能が関与しており、その一部をIL-6が担っていると考えられた。

IL-6は血中の可溶性IL-6レセプター(sIL6R)と二量体を形成し、標的細胞の膜表

面に存在するgp130と結合して細胞内にシグナルを伝える。細胞内での下流のシグナルは複数が知られているが、大きく分けて抗酸化作用・抗アポトーシス作用を有するERK、AKT系と、炎症反応促進や細胞の分化誘導など多彩な作用を有するJAK2-STAT3系に分かれる。IL-6の下流のシグナルが音響外傷後において、蝸牛内でもっともエネルギー消費の激しい血管条の中間細胞と、炎症細胞浸潤にもっとも関係深いと思われる血管内皮に認められたことから、我々は次の二つの仮説を立てた。

1) IL-6は音響外傷という蝸牛へのストレス下において、ERK、AKT系を介して血管条を保護する作用を有する、2) IL-6は強大音響負荷において、STAT3系を介して強力な炎症反応を誘導し、過度の炎症が音響外傷を悪化させる。

これらの仮説を検証する目的で、IL-6 阻害剤である MR16-1 投与による聴力域値の変化を検討した。その結果、MR16-1 が音響外傷による聴力域値上昇を有意に抑制したことから、仮説 2) の可能性が高いと考えられた。これらの結果は急性期においては MR16-1 が音響外傷の治療薬として臨床的に有用となる可能性を示唆している。

今後、蝸牛生理、ないし病態生理の双方の面から、IL-6/gp130 シグナルの更なる解析が必要であると考えられた。

#### 結語

本研究により音響外傷における IL-6 の役割が明らかになった。さらに、IL-6 阻害剤である MR16-1 が音響外傷の治療薬として用

いることができる可能性が示唆され、今後、IL-6/gp130 シグナルの更なる解析を行い、音響外傷の治療薬として臨床試験を行う必要があると考えられた。

**健康危険情報**：なし

#### 研究発表

1. 論文発表：投稿予定
2. 学会発表：第 14 回日本耳科学会

#### 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## Vasopressin 投与動物モデルの蝸牛内リンパ電位

分担研究者 岡本牧人 (北里大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者 長沼英明 (北里大学耳鼻咽喉科)  
河原克雅 (北里大学生理学)

### 研究要旨

実験動物の腹腔内への Vasopressin の投与後の聴覚の変化を ABR 閾値を用いて測定し、聴覚が低下することを確認しているが、同様の投与方法での蝸牛内リンパ電位 (EP) の経時的に測定し、その結果 Vasopressin の投与後約 5-10 分後に EP は低下した。またこの変化は可逆的である可能性があり、EP は回復する例も認められた。

### 研究目的

内リンパ水腫の発生に、内リンパ嚢における Vasopressin に対する V-2receptor や水チャネル AQP-2 が関与している報告<sup>1,2)</sup> が散見される。

我々のこれまでの報告で、1) 実験動物の腹腔内への Vasopressin の投与後の聴覚の変化を ABR 閾値を用いて測定し、ABR 閾値の上昇は約 90-120 分後であり、その後再び改善する例を認めたこと。2) 脱水環境下の実験動物において、腹腔内へ Vasopressin を投与した後の ABR 閾値の変化を経時的に測定した場合、ABR 閾値は投与後早期に低下すること。3) しかしこの動物モデルでは蝸牛に明らか形態的变化は認められなかったこと。などを報告した。

今回我々は Vasopressin 投与動物モデルにおいて EP を経時的に測定し、ABR 閾値の変化との関連について検討した。

### 研究方法

Wistar 系 Rat (250-300g, n=18) にネンブター麻酔後、中耳骨胞を開放し、蝸牛第 2 回転外側壁の骨を削開した。微小ガラス電極を挿入し EP を経時的に測定した。電位が安定した後、Vasopressin: AVP, pitressin: Arg-Vasopressin, Sankyo, Japan を 0.02 units/g ラットの腹膜腔に投与した。

### 研究結果

電極挿入後の EP は平均 86.1 mV であった。Vasopressin 投与後 18 例中 10 例で約 5-10 分後に EP は有意に ( $p=0.0007$ ) 低下した。Vasopressin 投与後の EP は平均 54.1 mV であった (図 1)。低下した 10 例の中で 2 例で EP は回復し、この EP の低下は可逆的変化の場合も存在した。EP が低下後回復しない例、回復した例の典型例を図 2, 3 にそれぞれ示す。

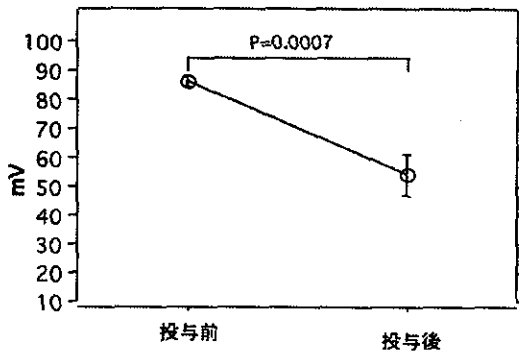


図1

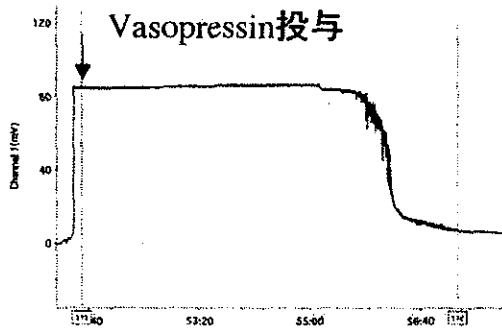


図2

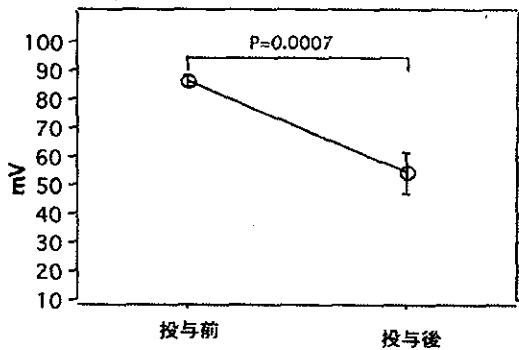


図3

### 考察

我々のこれまでの報告で、Vasopressinの投与後にABR閾値の上昇することが確認されているが、その場合でも、蝸牛には明らかな内リンパ水腫は認められず、ABR閾値の上昇のメカニズムは明らかでなかった。

今回はVasopressinの投与後にEPは低下することが確認されたが、このEPの低下がABR閾値の上昇の原因であるかどうかは今のところ不明である。

ABR閾値の上昇は（脱水環境下でない場合は）Vasopressin投与後約90-120分後であるのに対して、EPの低下は約5-10分後であり時間的に差があった。今後、このEPの低下のメカニズムを解明し、Vasopressin投与後の聴覚低下のメカニズムを解明したい。

### 結論

Vasopressin投与後18例中10例で約5-10分後にEPは低下した。しかしこのEPの低下は可逆的变化である場合も存在した。

### 参考文献

- 1) Takeda, T., Takeda, S., Kitano, H., et al. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear. Res.* 140: 1-6, 2000
- 2) Takeda, T., Kakigi, A., Saito, H., Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta. Otolaryngol. (Stockh.)* 519 (Suppl.) 219-222, 1995

### 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 聴覚路におけるグルタミン酸興奮毒性についての検討 (続報)

分担研究者 喜多村健 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 鷹合秀輝 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)、  
中村行宏、高橋智幸 (東京大学大学院神経生理)

### 研究要旨

昨年度の本報告書にて AMPA 受容体アゴニストであるドウモイ酸により、台形体シナプスの興奮性シナプス後部電流が減少することについて言及した。

今回我々はパッチクランプ法によりシナプス後部のみでなくシナプス前部からも記録を行った。その結果、シナプス前部 AMPA 受容体の活性化により神経終末に脱分極が生じるもの、それとは別にGタンパク質を介した電位依存性カルシウムチャンネルの抑制が起こり、その結果グルタミン酸による興奮性シナプス伝達が抑制されるという新規知見を得た。

### 研究目的

シナプス前部 AMPA 受容体によるシナプス前抑制のメカニズムを解明し、聴覚路におけるグルタミン酸興奮毒性に対する自己防御機構について検討する。

### 研究方法

Wister-rat (生後 7-8 日齢) を断頭後、上オリブ複合体を含む厚さ 175-250mm の脳幹スライスを作成した。36°C の人工脳脊髄液にてスライスを incubation してから室温に戻し、正立顕微鏡のステージ上のチャンバー内に固定した。薬物の投与はチャンバーの環流液を切り替えることにより行った。台形体核 (Medial nucleus of trapezoid body: MNTB) の興奮性シナプス後部電流 (Excitatory postsynaptic currents: EPSC) の導出に際しては、バイポーラ刺激電極により前腹側蝸牛神経核の軸索から活動電位を誘発し、電気抵抗 2-4MW のガラス電極にてシナプス後部からホールセル記録を行った。一方、シナプス前部のカルシウム電流 ( $I_{pCa}$ )、カリウム電流 ( $I_{pK}$ ) などの導出の際には、台形体シナプスの利点である巨大な神経終末から電気抵抗 5-8MW のガラス電極により直接ホールセル記録を行った。なお本文中に記載されているデータは、

特に断りがなければ平均値±誤差平均で示されている。

### 倫理面への配慮

本研究は東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻神経生理学教室にて実施された。実験動物の取り扱いについては、東京大学大学院の倫理委員会により承認を受けている。また、すべての実験は日本生理学会ガイドラインに従って行われた。

### 研究結果

1. AMPA・カイニン酸受容体アゴニストによるEPSCの抑制 (図1)

AMPA・カイニン酸受容体アゴニストであるドウモイ酸(domoate, 10 mM)の投与により、AMPA-EPSCとNMDA-EPSCの両者とも抑制された。計4例の平均にてAMPA-EPSCの抑制は $93.0 \pm 1.0\%$  (b vs e)、NMDA-EPSCの抑制は $71.8 \pm 2.9\%$  (a-b vs d-e)であった。NMDA-EPSCの抑制が認められたことより、ドウモイ酸がシナプス前部のAMPA受容体もしくはカイニン酸受容体に作用し、神経伝達物質(グルタミン酸)の放出が抑制されることが示唆された。



台形体シナプスのシナプス前部にAMPA受容体が存在することが明らかになった。

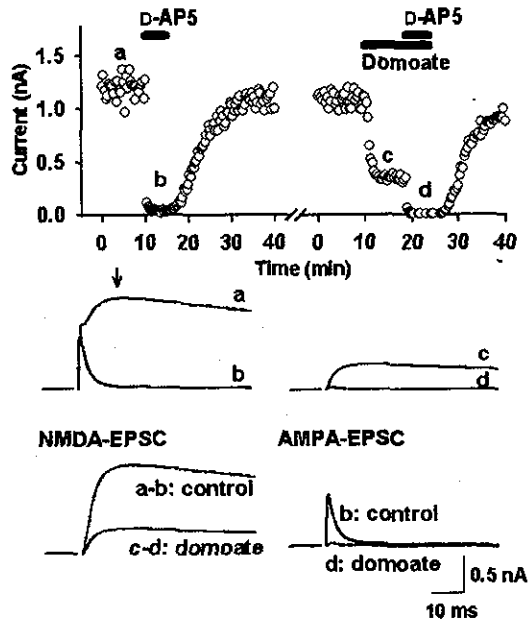


図 1. ドウモイ酸による AMPA-EPSC と NMDA-EPSC の抑制

## 2. AMPA受容体アゴニストのシナプス前部への影響 (図 2)

シナプス前部のAMPA受容体の活性化により、神経終末に内向き電流が入り脱分極が生じる。ドウモイ酸(10 mM)により神経終末は電流固定法にて $8.6 \pm 0.5$  mV ( $n = 5$ )脱分極し、-80mVに保持した電位固定法にて内向き電流が $117 \pm 20$  pA ( $n = 6$ ) 生じた (図 3 A)。また、AMPA単独(10 mM)ではあまりはっきりしなかったものの (図 3 B)、AMPA受容体脱感作阻害薬であるcyclothiazide (CTZ, 100 mM)存在下ではAMPA(10 mM)により脱分極は $7.6 \pm 0.6$  mV ( $n = 5$ )、内向き電流は $69.2 \pm 18.9$  pA ( $n = 5$ )と明確な効果を認めた (図 3 C)。この効果はAMPA受容体アンアゴニストのCNQX(20 mM)により阻害された (図 3 D)。以上より、

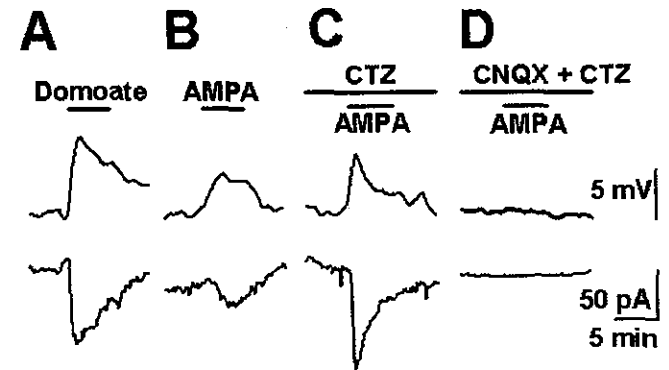


図2. AMPA受容体アゴニストのシナプス前部への影響

シナプス前部AMPA受容体の活性化により、10 mV程度の脱分極と内向き電流が生じた。

## 3. AMPA受容体アゴニストによるシナプス前部のカルシウム電流 ( $I_{pCa}$ ) の抑制 (図 3)

ドウモイ酸(10 mM)により $I_{pCa}$ は、 $12.1 \pm 2.0$  % ( $n = 6$ , 図3A)抑制された。一方、AMPA (10 mM) はCTZ (100 mM)存在下において $18.9 \pm 3.6$  % ( $n = 5$ , 図3B)と明確な抑制効果を認めた。

なお、AMPA受容体アゴニストはシナプス前部のカリウム電流に対しては効果を認めなかった。

## 4. シナプス前部AMPA受容体による電位依存性カルシウムチャンネルの抑制はGタンパク質により仲介される (図 4)

次に我々は図 3 で見られた反応がGタンパク質により仲介されるか否かについて検討し

た。シナプス前部用のパッチ電極内にGTP $\gamma$ S (0.2 mM)をloadすると、AMPAによる $I_{pCa}$ の抑制は完全に阻害された ( $3.2 \pm 0.1 \%$ ,  $n=5$ )。以上より、AMPA受容体による電位依存性カルシウムチャネルの抑制はGタンパク質により仲介されることが明らかとなった。

### 考察

今回我々の用いた条件 (過剰量のグルタミン酸アゴニスト) は急性高度難聴の原因とされているグルタミン酸興奮毒性に関するモデルともなっており、その際に音響刺激によるシナプス前部からのグルタミン酸の放出を抑制するという防御的な役割をシナプス前部の

AMPA 受容体が担っている可能性がある。

聴覚系では台形体の他に内有毛細胞 (1) や蝸牛神経核のシナプス前部 (2) にも AMPA 受容体の GluR4 サブユニットが存在することが電顕にて確認されている。シナプス前部の AMPA 受容体を介したグルタミン酸興奮毒性に対する自己防御機構が聴覚系全般にわたって存在するものなのか否か大変興味深いところである。

### 結論

聴覚路の台形体シナプスにおいて、シナプス前部 AMPA 受容体の活性化により神経終末に脱分極が生じるもの、それとは別にGタンパク質を介した電位依存性カルシウムチャネルの抑制が起こり、その結果グルタミン酸による興奮性シナプス伝達が抑制される。

### 参考文献

- 1) Matsubara A, Laake JH, Davanger S et al. Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti J Neurosci 16(14) 4457-67, 1996
- 2) Wang YX, Wenthold RJ, Ottersen OP et al

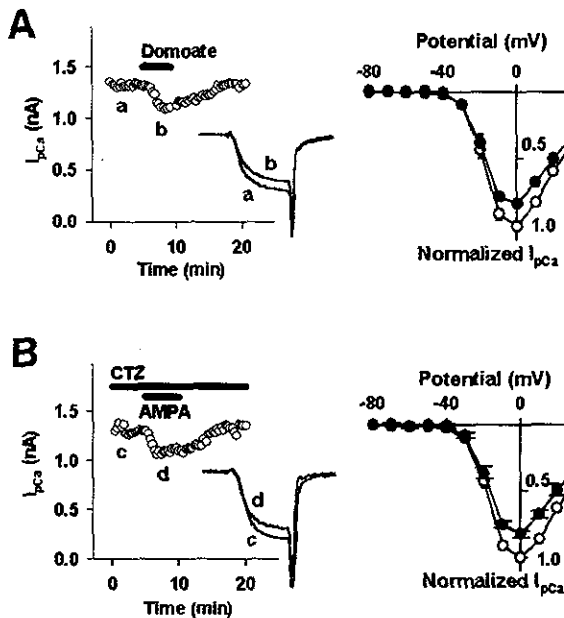


図3. AMPA受容体アゴニストによるシナプス前部のカルシウム電流の抑制

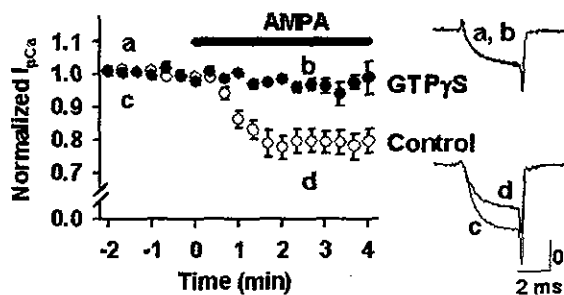


図 4. シナプス前部 AMPA 受容体による電位依存性カルシウムチャネルの抑制はGタンパク質により仲介される

Endbulb synapses in the anteroventral cochlear nucleus express a specific subset of AMPA-type glutamate receptor subunits J Neurosci18(3) 1148-60, 1998

健康危険情報

なし

研究発表

1 論文発表

Takago H, Nakamura Y, Takashi T : G protein-dependent presynaptic inhibition mediated by AMPA receptors at the calyx of Held . Proc Natl Acad Sci USA , in press

2 学会発表

Society for Neuroscience 2004 (San Diego)

知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

## IV. 研究成果の刊行に関する一覧表