

コルチ器支持細胞におけるアセチルコリン応答についての検討

奥 雅 哉

哺乳類のコルチ器は、音刺激によって振動する基底板上に位置し、内有毛細胞 (inner hair cell, IHC) および外有毛細胞 (outer hair cell, OHC) の2種類の感覚毛と、これらを周囲から支える支持細胞群により構成されている。

音受容機構は、その全容は未だ完全に解明されておらず、現在も広範囲にわたり研究されている。その中で、音受容には、IHC 及び OHC の関与が重要であるが、支持細胞も IHC 及び OHC の構造上の支持だけでなく、音受容に関与している可能性が示唆されている。

本研究では、モルモット蝸牛のコルチ器支持細胞群、特にダイテルス細胞 (Deiters' cell, 以下 DCs) 及びヘンゼン細胞 (Hensen's cell, 以下 HEs) のアセチルコリン (Ach) 応答性をパッチクランプ法の conventional whole cell mode を用いて、膜電流の変化として調べた。その結果、次の諸点が明らかになった。

- (1) DCs において Ach 応答が認められたが、HEs においては認められなかった。
- (2) DCs において認められた Ach 応答は濃度依存性であり、OHC の Ach 応答と同様であった。
- (3) DCs における Ach 応答に対応する Ach レセプター (AchR) は、OHC の AchR と同様にムスカリン様、ニコチン様両者の性質を併せ持っている新しいタイプの受容体である可能性が示唆された。

以上の結果から、DCs は OHC の解剖学的な支持だけでなく、OHC と DCs の間に電気生理学的な関連があり、音受容に対する DCs の何らかの関与を示唆するものとする。

(平成10年6月15日受理)

Analysis of the Responses to Acetylcholine in Isolated Supporting Cells from the Guinea-pig Cochlea

Masaya OKU

The whole cell patch clamp modes were developed to investigate the ionic channels of cellular membrane and to elucidate the signal transduction pathways from receptor to effector.

The auditory sensory organ of mammals, the organ of Corti, is located on the basilar membrane. This organ consists of two types of sensory hair cells, outer and inner hair cells (OHC and IHC), and a surrounding network of various supporting cells, the largest part of the supporting cells is made of Deiters' cells (DCs) and Hensen's cells (HEs). By using whole cell patch clamp technique, the Acetylcholine (Ach) -induced current (I_{Ach}) in dissociated OHC of guinea-pig cochlea has been

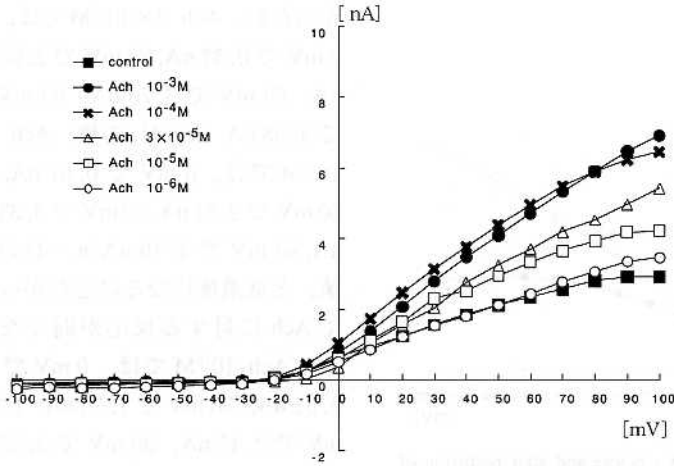


Fig. 3. I-V curves obtained from isolated DCs before and after perfusion of the cell with 10^{-3} M, 10^{-4} M, 3×10^{-5} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M Ach solutions. Outward currents showed the almost same increase after perfusion of the cell with 10^{-3} M and 10^{-4} M Ach solutions. These currents decreased to a lower concentration and outward current increased a little after perfusion of the cell with 10^{-6} M Ach solution.

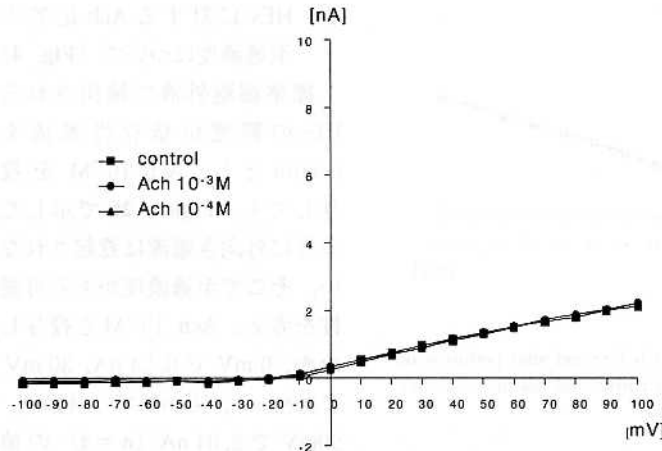


Fig. 4. I-V curves obtained from isolated HEs before and after perfusion of the cell with 10^{-3} M and 10^{-4} M Ach solutions. Outward currents did not increase after perfusion of the cell with 10^{-3} M and 10^{-4} M Ach solutions.

nA, 60 mV で 3.17 nA, 90 mV で 3.53 nA ($n=4$) の値を示し, Ach 投与により増加した外向き電流は著明に抑制された (Fig. 5). 同様に DCs に Ach 10^{-4} M を投与することにより外向き電流を惹起させ, 次にニコチン様拮抗薬である D-tubocurarine 10^{-6} M を投与すると, 膜電位依存性電流は -20 mV 付近で急速に賦活されるが, 0 mV で 1.52 nA, 30 mV で 3.23 nA, 60 mV で

4.42 nA, 90 mV で 4.85 nA ($n=4$) の値を示し, Ach 投与により増加した外向き電流は著明に抑制された (Fig. 6).

考 察

音受容には, IHC 及び OHC の関与が重要であるが, 支持細胞は OHC を構造上直接あるいは間接的に支持し, この構造的支持が主な機能と考えられてきたが, 最近支持細胞も聴覚機構に関与している可能性が示唆されている。

本実験の目的は, コルチ器支持細胞群, 特にダイテルス細胞 (DCs) 及びヘンゼン細胞 (HEs) も音受容に関与しているならば, OHC との間に電気生理学的関連性が存在し, また OHC と支持細胞間に電気生理学的関連性が存在するならば, 支持細胞にも OHC 同様の化学受容体が存在すると考え, 有毛細胞で証明されている化学受容体応答のなかで最も重要な役割を果たしていると思われるアセチルコリン (Ach) 応答について DCs 及び HEs において検討した。

本実験で示した DCs のイオンチャンネルを流れる電流の増加は, 60 mV 付近までの電圧刺激では, 直線的に増加するが, 更に大きい電圧では電流の増加は無く, プラトー相を形成した。モルモットの OHC の電流-電圧曲線は, 80 mV 付近を最小とする N-shape パターンが報告されており²¹⁾⁻²³⁾, また Dulon²⁴⁾ は DCs の外向き電流は, OHC 同様の N-shape パターンを示すと報告している。本実験で認められる DCs におけるプラトー相は, 電圧刺激を 90 mV ま

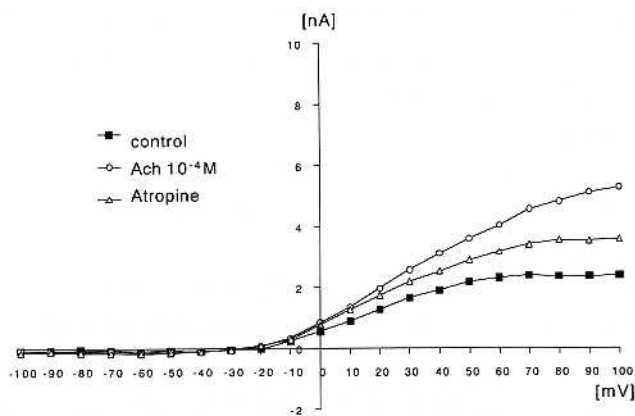


Fig. 5. I-V curves obtained from isolated DCs before and after perfusion of the cell with 10^{-4} M Ach solution. Ach-induced current was suppressed by the 10^{-6} M atropine solution.

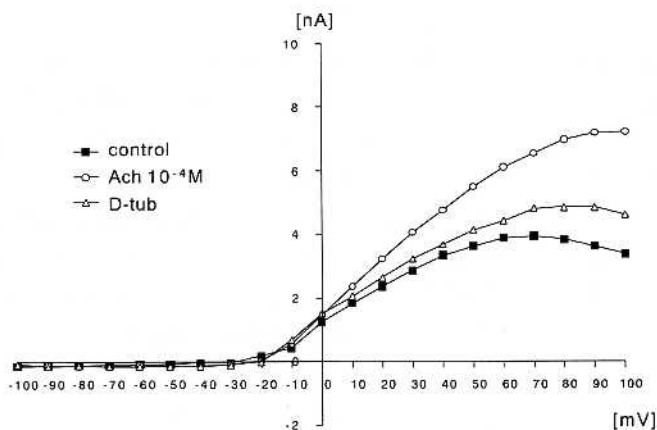


Fig. 6. I-V curves obtained from isolated DCs before and after perfusion of the cell with 10^{-4} M Ach solution. Ach-induced current was suppressed by the 10^{-6} M D-tubocurarine solution.

でしか上げていないための結果であって、Dulon²⁴⁾と同様に電圧刺激を140 mVまで行くとN-shapeパターンを呈するのではないかと考えられ、プラトー相はN-shapeパターンの一部であると考えている。

これに対し、HEsでは、脱分極電位の上昇に伴う電流は、直線的に増加した。DCsとHEsの電流の増加の違いについて、奥本²⁰⁾はDCsの電位依存性外向き電流は電位依存性遅延整流型K電流とCaイオンに依存した電流から構成され、またHEsでは主に電位依存性遅延整流型K電流で構成されており、DCsにおけるプ

ラトー相の形成はCaイオンに依存する電流の関与によるものと報告している。

標準細胞外液での膜電位依存性の電流をcontrolとしDCs及びHEsに対してAch 10^{-3} Mを投与すると、DCsにおいて著明な外向き電流の増加が認められたが、HEsでは電流の増加が認められなかった。OHCにおいてAch応答が報告されており^{10,11,25,26)}、同様のAch応答がDCsには存在するが、HEsには存在しないということがわかった。これにより、OHCとDCsの間に何らかの電気生理学的関連性が存在するが、OHCとHEsの間には電気生理学的関連性が存在しない可能性が示唆された。

また、OHCにおけるAch応答は濃度依存性であると報告されており^{10,11)}、本実験の結果からDCsにおけるAch応答もOHCと同様に濃度依存性であることが示唆された。一方、HEsに対してはAch濃度を変えてもAch応答は認められず、至適濃度いかに拘らず、HEs

においてはAch応答は認められないものと思われる。

Achに対応するAchRは、nAchRとmAchRに分類され、OHCにおけるAchRは、Housely and Ashmore¹⁰⁾によるニコチン様拮抗薬、ムスカリン様拮抗薬を用いた実験から、AchRはニコチン様であると報告している。欠畑ら²⁴⁾や山本ら²⁵⁾はムスカリン様作動薬、拮抗薬の効果を調べることによって、AchRはムスカリン様受容体の性質もっており、OHCにおけるAchRはムスカリン様、ニコチン様受容体の両者を併せ持っているとして、いままでに報告されてい

ない新しいタイプであると報告している。本実験では、DCsにおけるAchRの性質を調べるため、DCsに対してAchを投与し外向き電流を惹起させた後、ムスカリン様拮抗薬であるAtropineを投与したところ外向き電流は抑制された。このことは、DCsにおけるAchRはムスカリン様受容体の性質を持っていることを示している。また同様に、ニコチン様拮抗薬であるD-tubocurarineを投与しても外向き電流は抑制された。これらの結果から、DCsにおけるAchRは、ムスカリン様、ニコチン様受容体の両者を併せ持っていることが示され、いままでOHC以外の細胞では報告されていない新しいタイプの受容体である可能性が示唆された。

音受容にはOHCの関与が重要であるが、支持細胞はOHCを構造上直接あるいは間接的に支持し、この構造が主な機能と考えられていた。OHCの遠心性神経伝達物質としてAch^{10),11)}が関与しており、最近、遠心性神経の一部がDCsに分布しているとの報告もあり¹⁵⁾、DCsにおいてもAchが関与している可能性が示唆されている。また本実験結果より、化学受容体応答のなかで最も重要な役割を果たしていると思われるAch応答がOHCだけでなくDCsにおいても認められ、HEsにおいては認められないことがわかった。更に、DCsにおけるAch応答はOHCと同様の濃度依存性が認められ、このAch応答に対応するDCsにおけるAchRは、いままでOHCにおいてのみ報告されている新しいタイプの受容体に類似していると示唆される。以上の結果から、支持細胞のなかでDCsはOHCの解剖学的な支持だけでなく、何らかの生理機能を有し、OHCとDCsの間に電気生理学的な関連があると考えられる。OHCとの

共同作業あるいは情報交換を行うことによって、DCsも音受容に関与している可能性を示唆するものとする。

ま と め

1. コルチ器支持細胞のAch応答をパッチクランプ法 (conventional whole cell mode) を用いて検討した。
2. DCsにおいてAch応答が認められ、またその反応は濃度依存性であり、OHCのAch応答と同様であった。
3. HEsにおいては、Ach応答が認められなかった。
4. DCsにおけるAchRは、OHCと同様にムスカリン様、ニコチン様両者の性質を併せ持っている新しいタイプの受容体である可能性が示唆された。

以上のことから、DCsはOHCの解剖学的な支持だけでなく、OHCとDCsの間に電気生理学的な関連があり、音受容に対するDCsの何らかの関与を示唆するものとする。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学生化学1教室・湊川洋介教授、川崎医科大学・折田洋造名誉教授に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第98回日本耳鼻咽喉科学会総会 (大阪, 1997)、第23回日本耳鼻咽喉科学会中国地方連合講演会 (倉敷, 1997)、第7回日本耳科学会総会 (高知, 1997) において発表した。

文 献

- 1) 堅田利明：レセプターの構造と機能。Clin Neurosci 13：19-22, 1995
- 2) Oesterle E, Dallos P：Intracellular recordings from supporting cells in the organ of Corti. Hear Res 22：229-232, 1986
- 3) Oesterle EC, Dallos P：Intracellular recordings from supporting cells in the guinea-pig cochlea：AC potentials. J

- Acoust Soc Am 86 : 1013 - 1032, 1989
- 4) Zwislocki J, Slepecky N, Cefaratti L, Smith R : Ionic coupling among cells in the organ of Corti. *Hear Res* 57 : 175 - 194, 1990
 - 5) Bobbin RP, Konishi T : Acetylcholine mimics crossed olivocochlear bundle stimulation. *Nature* 231 : 222 - 223, 1971
 - 6) Neher E, Sakmann B : Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 260 : 799 - 802, 1976
 - 7) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ : Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfuger Arch* 391 : 85 - 100, 1981
 - 8) Horn R, Marty A : Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J General Physiol* 92 : 145 - 159, 1988
 - 9) Nakagawa T, Akaike N, Kimitsuki T, Komune S, Arima T : ATP-induced current in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. *J Neurophysiol* 63 : 1068 - 1074, 1990
 - 10) Housley GD, Ashmore JF : Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proceedings of the Royal Soc B* 244 : 161 - 167, 1991
 - 11) Kakehata S, Nakagawa T, Takasaka T, Akaike N : Cellular mechanism of acetylcholine-induced response in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *J Physiol* 463 : 227 - 244, 1993
 - 12) Yamamoto T, Kakehata S, Saito T, Saito H, Akaike N : Cisplatin blocks voltage-dependent calcium current in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *Brain Res* 648 : 296 - 298, 1994
 - 13) Nakagawa T, Kakehata S, Yamamoto T, Akaike N, Komune S, Uemura T : Ionic properties of $I_{K,n}$ in outer hair cells of guinea pig cochlea. *Brain Res* 661 : 293 - 297, 1994
 - 14) Kakehata S, Akaike N, Takasaka T : Substance P decrease the non-selective cation channel conductance in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *Molecular Basis of Ion Channels and Muscle Contraction. Annals of the New York Academy of Science. New York, New York Press. 1993, pp 476 - 479*
 - 15) Nador JB Jr, Burgess BJ : Supranuclear efferent synapses on outer hair cells and Deiters' cell in human of Corti. *Hear Res* 81 : 49 - 56, 1994
 - 16) Santos-Sacchi J, Dallos P : Intracellular communication in supporting cells in the organ of Corti. *Hear Res* 9 : 317 - 326, 1983
 - 17) Santos-Sacchi J : Dye coupling in the organ of Corti. *Cell Tissue Res* 245 : 525 - 529, 1986
 - 18) Santos-Sacchi J : Isolated supporting cells from the organ of Corti : Some whole cell electrical characteristics and estimates of gap junctional conductance. *Hear Res* 52 : 89 - 98, 1991
 - 19) Dulon D, Moataz R, Mollard P : Characterization of Ca^{2+} signals generated by extracellular nucleotides in supporting cells of the organ of Corti. *Cell Calcium* 14 : 245 - 254, 1993
 - 20) 奥本香苗 : モルモットコルチ器支持細胞の電気的特性に及ぼすカナマイシンの影響. *川崎医学会誌* 23 : 155 - 164, 1997
 - 21) Ashmore JF : Ionic mechanisms in hair cells of mammalian cochlea. *Prog in Brain Res* 74 : 3 - 9, 1988
 - 22) Meech RW : Calcium-activated potassium currents in nervous tissue. *Annu Rev Biophys Bioeng* 7 : 1 - 18, 1978
 - 23) Ohmori H : Ionic currents and transduction currents in the hair cell of the chick. *Biomed Res* 71 : 103 - 107, 1986
 - 24) Dulon D : Ca^{2+} signaling in Deiters' cells of the guinea-pig cochlea : Active process in supporting cells. *Active Hearing* 5 : 195 - 207, 1994
 - 25) 欠畑誠治, 中川尚志, 赤池紀生, 高坂知節 : 蝸牛外有毛細胞における化学受容体. *Otol Jpn* 4 : 14 - 18, 1994
 - 26) 山本健人, 欠畑誠治, 山田武千代, 赤池紀生, 齊藤武久, 齊藤 等 : 蝸牛外有毛細胞における細胞内情報伝達機構. *Otol Jpn* 5 : 112 - 118, 1995