

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791772

研究課題名(和文) 前庭神経系に発現するセロトニン受容体3の機能解析

研究課題名(英文) 5-HT3 receptor expression in the mouse peripheral vestibular nervous system

研究代表者

滝本 泰光(takimoto, yasumitsu)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00624298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：5-HT3受容体は、Cys-loop familyに属するligand-gated cation channelsで早いシナプスでの神経伝達に寄与している。しかし、末梢平衡感覚系での関連を示す報告は極めて少ない。本研究では、マウスの前庭神経節での5-HT3受容体遺伝子の発現をin situ hybridization法を用いて明らかにし、カルシウムイメージング法を用いて前庭神経節に発現している5-HT3受容体は機能的なイオンチャネルを有していることを証明した。本研究の結果から、5-HT3受容体が末梢における平衡覚の調整に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The 5-hydroxytryptamine type3(5-HT3) receptor is a ligand-gated ion channel and a member of the Cys-loop family of receptors. Previous studies have shown 5-HT3 receptor expression in various neural cells of the central and peripheral nervous systems. However, no study has yet determined its localization and function in the peripheral vestibular nervous system. In the present study, we reveal mRNA expression of both 5-HT3 receptor in the mouse vestibular ganglion by in situ hybridization. Moreover, we performed Ca²⁺ imaging to determine whether functional 5-HT3 receptors are present in the mouse vestibular ganglion. These results indicate that vestibular ganglion cells express functional 5-HT3 receptor channels and might play a modulatory role in the peripheral vestibular nervous system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：内耳 5-HT3

1. 研究開始当初の背景

めまいは耳鼻咽喉科医にとっては頻りに遭遇し、かつ診断治療に苦慮することの多い症状である。しかし、前庭神経系のメカニズムはいまだ不明な点が多くあり、例えば有毛細胞と前庭神経終末間の神経伝達物質が何なのかはっきりしていない。体の位置の変化などにより耳石器平衡斑および半規管膨大部の有毛細胞の「毛」が傾くことで有毛細胞が興奮し、神経伝達物質が放出され前庭神経終末に存在する受容体が活性化して位置情報が伝えられる。しかしながら、その神経伝達物質としてグルタミン酸、ATP、ペプチドなどいくつか候補があるがはっきりわかっていない。セロトニンはノルアドレナリン、ドーパミンと並び、3大モノアミン系神経伝達物質の一つである。また、セロトニン受容体(5-HT受容体)は1~7のサブファミリーが同定されており、ほとんどがG蛋白共役型であるが、5-HT受容体3は唯一イオンチャネル型で、その速いチャネル活性から神経伝達系に発現機能しているものと考えられる。ヒトゲノムでは5-HT3受容体はA.B.C.D.Eのサブユニットがクローニングされているが、主にAとBのサブユニットがレセプターの機能に関係している。また、5-HT3受容体は、様々な中枢神経系の神経細胞に発現していることが知られており、抗不安、記憶、学習、注意、認知機能との関連が報告されている。末梢神経系でも後根神経節、三叉神経節、上頸神経節、下神経節、迷走神経などで発現が報告されており、痛覚、嘔吐のメカニズムとの関連が示されている。しかし、まだ内耳の末梢平衡感覚神経系での発現については報告されていない。また末梢の聴覚系での発現の報告も非常に少ない。一方、以前の研究で神経伝達セロトニンおよびレセプターと内耳との関係はいくつか報告されている。例えばセロトニンが聴覚遠心路に存在しているとの報告、5-HT受容体(1A, 1B, 2B, 2C, 3, 5B, and 6)の蝸牛での局在をRT-PCRを用いて示した報告、らせん神経節、前庭神経節および蝸牛の血管内皮細胞に5-HT1B, 1D受容体が発現しているとの報告などがある。これらの報告からセロトニンおよび受容体が内耳と関連することが示唆されるが局在や機能は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

5-HT3受容体は、中枢神経系では抗不安、記憶、学習、注意、認知機能との関連が報告されている。末梢神経系では痛覚、嘔吐のメカニズムとの関連が示されている。しかし、まだ内耳での発現、機能については不明である。また、5-HT3受容体はその他のサブファミリーがG蛋白共役型であることと異なり、唯一イオンチャネル型である。つまり、その速いチャネル活性から、速やかな神経伝達が重要な役割を担うと考えられる聴覚平衡感覚で機能していることは非常に理にかなって

ると考えられる。よって本研究の目的は主に前庭神経系での5-HT3受容体の発現及び機能を解明することである。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウス 10週齢、生後5日目(P5)を用いてRT-PCR、in situ hybridization(ISH)、カルシウムイメージングを行った。

RT-PCR

蝸牛、半規管、耳石器、前庭神経節、らせん神経節、蝸牛神経線維、前庭神経線維を含む内耳組織から抽出したtotal RNAから逆転写反応を経てcDNAを作成し、5-HT受容体3A, 3Bに特異的なプライマーを作成しPCRを行った。

ISH

三叉神経節から抽出したtotal RNAから逆転写反応を経てcDNAを作成し、5-HT受容体3Aおよび3Bの約1kbpを鋳型にしてDigoxigeninでラベルしたcRNAを作成した。アダルトマウスの前庭神経節、らせん神経節、生後5日目の幼若マウスの側頭骨の新鮮凍結切片を準備して上記のcRNAプローブでhybridizationを24時間行い、抗体はAnti-DIG-AP(アルカリフォスファターゼ)もしくはanti-DIG-POD、tyramide signal amplificationを、発色にはHNPP、Fast redもしくはanti-DNP-Alexa488を用いた。

カルシウムイメージング法

カルシウムインジケーターであるfula-2をロードさせておいた野生型および5-HT受容体3Aノックアウトマウス(3A KOマウス)の前庭神経節細胞に対して5-HT受容体3AのアゴニストであるSR57227Aを投与して、吸光度(F340/F380)のレシオの経時的变化をNikon ECLIPSE TE2000-U microscope equipped with the AQUACOSMOS systemを用いて計測した。

(2)生理実験、行動実験を用いた評価

3A KOマウスの前庭機能評価のために新たにマウス用回転検査装置を開発した。

4. 研究成果

RT-PCRの結果、5-HT受容体3Aおよび3Bいずれも電気泳動で内耳組織において特異的なバンドが見られた(図1)。

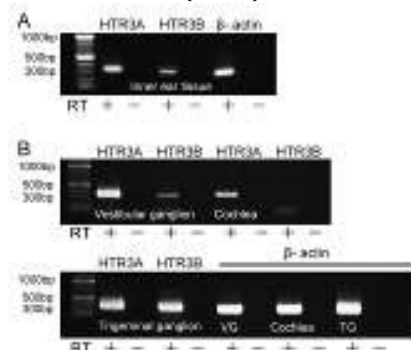


図1

ISHの結果、5-HT 受容体 3A および 3B のシグナルは、幼若マウスの側頭骨を用いた局在に検討では前庭神経節、らせん神経節に局限していた。また約 3 割の前庭神経節細胞に 5-HT 受容体 3A および 3B の mRNA の発現シグナルを認めたが、強く発現する 3A に対して 3B は微弱であった (図 2)。

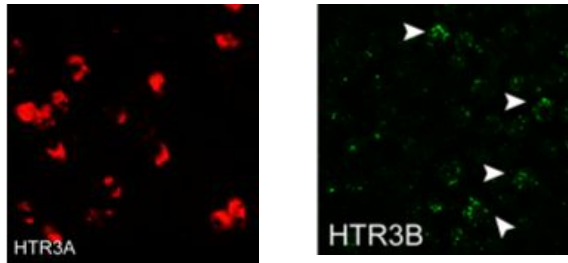


図 2

さらに、5-HT 受容体 3A 発現細胞の特徴を検討した結果、主に中から大型に細胞に発現していることが判明した。過去の報告より 1 型前庭有毛細胞から入力を受ける神経節細胞は主に中から大型の細胞に存在していることはわかっており、5-HT 受容体 3A 発現細胞は 1 型前庭有毛細胞から入力を受ける神経節細胞に発現していることが示唆された。カルシウムイメージングの結果、約 3 割の前庭神経節細胞は 5-HT 受容体 3A のアンタゴニストである SR57227A に反応して細胞内カルシウムの上昇の反応が得られた。一方、5-HT 受容体 3A ノックアウトマウスの前庭神経節細胞では反応は見られなかった (図 3)。

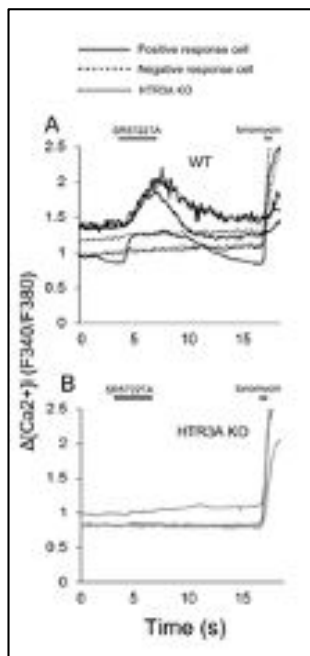


図 3

前庭神経節において ISH シグナルが見られた細胞の割合とカルシウムイメージングで SR57227A に反応した細胞の割合がおおむね一致していた。これらの結果から前庭神経節細胞に機能的なイオンチャネルを有する

5-HT 受容体 3 が発現していることを形態学的、生理学的に証明した。また、前庭機能評価のために新たにマウス用回転検査装置を開発した (図 4、5)。

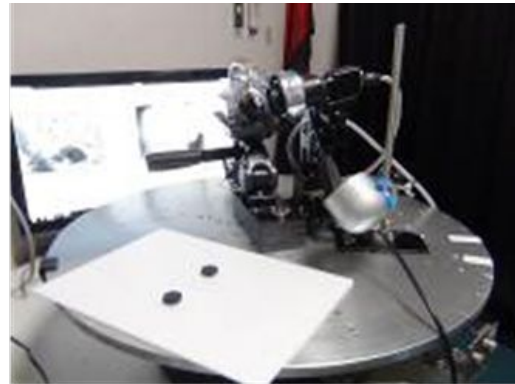


図 4

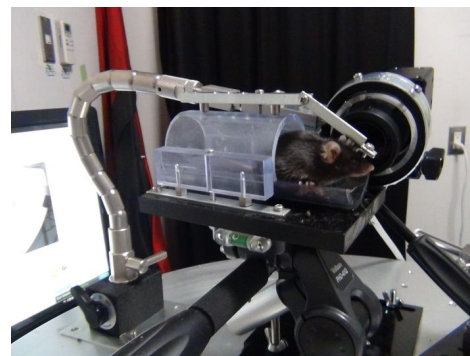


図 5

直径約 1m の回転台の中心にマウスを固定し、暗所にて振り子様運動刺激を加える。その時に誘発される前庭動眼反射による眼球運動を 240Hz のハイスピードカメラにて撮影することに成功した (図 6)。

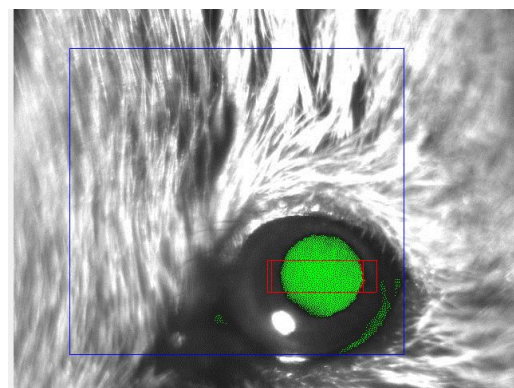


図 6

また、その画像データをもとに正確に瞳孔中心を抽出し、眼球の位置情報、動作情報、速度情報を計算することが可能な解析システムの開発も成功した (図 6、7)。

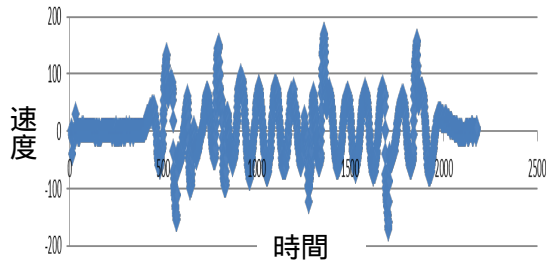


図7(解析後の眼球運動速度波形)

現在、開発したシステムを用いて 3A KO マウスの正確な前庭機能解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. 前庭系におけるセロトニン受容体3の発現
滝本泰光, 石田雄, 中村雪子, 鎌倉武史, 北原紘, 今井貴夫, 宇野敦彦, 堀井新, 岡崎鈴代, 原秀典, 島田昌一
 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 28 巻、平成 26 年 4 月、査読有

2. 5-HT3 receptor expression in the mouse vestibular ganglion

Takimoto Y, Ishida Y, Nakamura Y, Kamakura T, Yamada T, Kondo M, Kitahara T, Uno A, Imai T, Horii A, Okazaki S, Nishiike S, Inohara H, Shimada S.

Brain Research 1557・74-82・2014、査読有

[学会発表](計1件)

滝本泰光、末梢前庭系におけるセロトニン受容体3の発現、第31回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、平成25年8月24日、大阪

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝本 泰光 (TAKIMOTO, Yasumitsu)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 00624298

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: