

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591958  
 研究課題名（和文） 哺乳類末梢前庭システム（感覚受容器・前庭神経節）の  
 生理・薬理学的解析  
 研究課題名（英文） Physiological and pharmacological analyses of the mammalian  
 Peripheral vestibular system including  
 Sensory organs and vestibular ganglia  
 研究代表者  
 伊藤 健（ITO KEN）  
 東京大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：50251286

## 研究成果の概要：

ラット前庭神経節細胞の細胞体にその末梢受容器（耳石器・半規管膨大部）を付着した標本を作成し、細胞生理学的実験を行う手法を確立した。培養方法としては、Leibovitz's L-15 を使用した短時間（＜5hr）培養が最適であることが分かった。

生理学的実験：末梢前庭器～前庭神経細胞体を一体とする標本において、神経のパッチクランプ記録を行うことが可能となった。脱分極刺激（電流注入）による神経発火パターンを記録したところ、主に phasic type の発火であり、今のところ単離・培養したものと大きな違いが無い結果となっている。同様の標本において前庭神経節細胞をパッチクランプして性質を調べた上でピペット内に予め入れておいたビオチンにより逆向性染色を行う実験は、パッチクランプの成功率が不十分で、また実験中に細胞が死んだりパッチが外れてしまうトラブルが多いことから未だ信頼に足る結果が得られていない。

免疫組織学的・分子生物学的実験：末梢前庭器～前庭神経細胞体を一体とする標本において、神経細胞の性質等を検索した後に細胞質を電極内に吸引し、Single Cell RT-PCR を行う実験は成功率が低く、その原因は単離細胞と異なり内容の吸引が難しいことであると分かった。未だ信頼性の高いデータとはなっていない。前庭神経節の興奮性の調節に関与すると分かったイオンチャンネルやリガンド受容体の免疫染色については、試薬を購入して実験を開始したばかりの段階である。本研究のここまでの成果を踏まえて、今後も研究を継続する予定である。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：細胞・組織 シグナル伝達 神経科学 生理学 脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

近年末梢聴覚系(コルチ器・ラセン神経節)の生理学的解明が飛躍的に進歩しているのに比して、末梢前庭系においては未だ研究が遅れていると言える。単離の感覚細胞(有毛細胞)・神経節細胞については以前より少しずつ知見が得られて来ているが、哺乳類よりも爬虫類(Brichta, et al. J Neurosci 1998 等多数)・鳥類(Masetto, et al., J Neurophysiol 1997 等多数)等の研究が先行しており、特に前庭神経節細胞では哺乳類においては最近報告が出始めた(Limon, et al., J Neurophysiol 2005; Mercado, et al., J Neurophysiol 2006 など)ところであり、今後の進展が期待される。これは手技的に実験が難しいことも影響していると考えられ、例えばむしろスライスによる実験手技が確立している脳幹前庭神経核の研究の方が先行している(Murphy, et al., J Neurophysiol 2001 等)。我々のグループは、最近になってラットの末梢前庭神経節を培養して細胞生理学的実験(パッチクランプ)を行うことに成功し単離細胞を用いて成果報告を進めているところである。現在までに、ATPによる神経興奮の修飾効果および神経発火のパターンに対してLow-thresholdのKチャンネルが関わっている事実を初めて見出している。

しかしながら、感覚細胞から前庭神経までを総体として見た、末梢前庭システムとして把握する研究は未だ殆どなされていないと言える。まず、前庭感覚器は回転加速度を感知する半規管系と直線加速度を感知する耳石器系に大きく分かれる。また、それぞれの感覚器において、2種類の異なる形態の感覚細胞が存在する(神経終末がcalyxを形成するI型細胞・神経終末がboutonを形成するII型細胞)。これらが前庭神経と機能的にどのような接続をしていて、どのように刺激に反応するかは、哺乳類で一施設より(Baird et al., J Neurophysiol 1988; Goldberg et al., J Neurophysiol 1990)の報告、鳥類で一報告(Yamashita & Ohmori, Exp Brain Res 1990)があるのみで、さらにこの2施設の報告において、感覚細胞の型と神経の発火パターンの対応関係の結果が全く逆であるために議論の余地が大きい。また、どちらの報告も細胞内ないし細胞外における神経活動の記録であり、近年常識的に行われているパッチクランプ法による細胞膜の性質まで踏み込んだ解析はなされていない。他の要因(ニューロモジュレータなど)によりシステムとしてどのような修飾を受けるかには至っては殆ど未

知である。

本研究はこのような末梢前庭機能をシステム(感覚細胞・神経の総体)として解明することを目的とし、末梢前庭器に前庭神経ないしそのシナプスを付着した標本を用いて研究を行う。

## 2. 研究の目的

### 生理・薬理学的事項

1) 末梢前庭器～前庭神経細胞体を一体とする標本において、神経のパッチクランプ記録を行った上で、脱分極刺激(電流注入)による神経発火パターンを記録する。単離・培養したものと違いがあるかを調べる。

2) 同様の標本において前庭神経節細胞をパッチクランプしてその性質(発火パターンなど)を調べた上でピペット内に予め入れておいたビオチンにより逆向性染色を行い、それぞれがどの前庭末梢器のどの種類の細胞に行っているかを調べる。

3) 同様の標本において、前庭器を振動により興奮させ、神経細胞の膜電位の変化(活動電位)のパターンを明らかにする。また、ビオチンによる逆向性染色を行い、どの前庭末梢器のどの種類の細胞に行っているかを調べる。

4) 同様の標本において、前庭神経節細胞をパッチクランプして、各種のリガンド(ATPなどニューロモジュレータ)存在下での性質変化を調べる。

### 免疫組織学・分子生物学的事項

現在前庭神経節細胞の興奮性に関するイオンチャンネル(主にKチャンネル)および興奮性に対するニューロモジュレータとして有望なリガンド分子(ATP・セロトニンなど)の受容体の局在は、蝸牛系と異なり、詳しく検索されていないので、生理学的実験と平行して、免疫組織学的検索・分子生物学的検索を行う。

1) 上記のごとき標本において、神経細胞の性質等を検索した後細胞質を電極内に吸引し、Single Cell RT-PCRを行って、イオンチャンネル・受容体等の発現を調べる。これによりその性質を分子レベルで説明可能となる。

2) 前庭神経節の興奮性の調節に関与すると分かったイオンチャンネル(主にKチャンネル)や物質(リガンド)に対する受容体を発生の様々な過程において(胎内～成人)免疫染色による発現解析を行い、その末梢前庭システムの成熟への関与を推定する。

### 3. 研究の方法

#### 実験系の確立

- 1) 灌流制御システム(備品)のセットアップを行う。研究分担者佐原が行う。
- 2) 動物としてはラットを主に用いる。
- 3) 前庭神経節細胞の細胞体にその末梢受容器(耳石器・半規管膨大部)を付着した標本(下図)において、最適な培養方法(培養液・培養時間その他)を確立する。研究代表者伊藤および研究分担者千原が行う。これは他施設からの報告が無いので試行錯誤で行うことになる。
- 4) 前項(研究目的)に記したように、末梢前庭器をまるごと使用した標本作成を試みる。蝸牛コルチ器において、同様の標本作製した経験のある伊藤が主に行う。

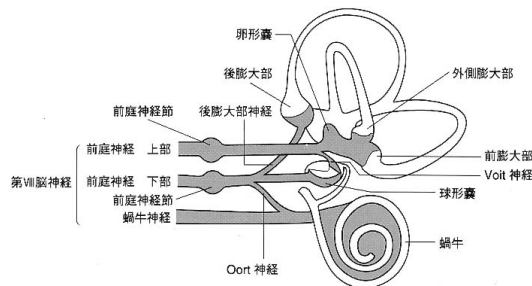


図 今回採取する標本の範囲を模式的に示す(図はヒトの聴覚・前庭器)

#### 生理学的実験

佐原の指導下で伊藤・岩崎・千原が協力して進める。

1) 末梢前庭器～前庭神経細胞を一体とする標本において、神経のパッチクランプ記録を行った上で、脱分極刺激(電流注入)による神経発火パターンを記録する。単離・培養したものとの違いがあるかを調べる。

2) 同様の標本において前庭神経節細胞をパッチクランプしてその性質(発火パターンなど)を調べた上でピペット内に予め入れておいたピオチンにより逆行性染色を行い、それぞれがどの前庭末梢器のどの種類の細胞に行っているかを調べる。

#### 免疫組織学的・分子生物学的実験

佐原・千原が行う。

1) 上記のごとき標本において、神経細胞の性質等を検索した後細胞質を電極内に吸引し、Single Cell RT-PCRを行って、イオンチャンネル・受容体等の発現を調べる。これによりその性質を分子レベルで説明可能とな

る。

2) 前庭神経節の興奮性の調節に関与すると分かったイオンチャンネル(主にKチャンネル)や物質(リガンド)に対する受容体を発生の様々な過程において(胎内～成人)免疫染色による発現解析を行い、その末梢前庭システムの成熟への関与を想定する。

### 4. 研究成果

#### 2007年度

##### 実験系の確立

- 1) 灌流制御システムのセットアップを研究分担者佐原が行った。
- 2) ラット前庭神経節細胞の細胞体にその末梢受容器(耳石器・半規管膨大部)を付着した標本において、最適な培養方法(培養液・培養時間その他)を模索した。本年度は主に数時間の培養で実験を行ったが、なかなか安定した条件が見出せなかった。伊藤および千原が行った。
- 3) 末梢前庭器をまるごと使用した標本作成を試みた。蝸牛コルチ器において、同様の標本作製した経験のある伊藤が主に行った。標本採取は手技の向上により可能となったが、割を入れた前庭神経節細胞を実験用ディッシュに安定して固定する方法が確立せず、今後の課題となった。

##### 生理学的実験

佐原の指導下で伊藤・岩崎・千原が協力して進めた。

1) 末梢前庭器～前庭神経細胞を一体とする標本において、神経のパッチクランプ記録を試みたが、上記の通り、安定した標本固定が得られず、脱分極刺激(電流注入)による神経発火パターンを安定して記録するまでに至らなかった。試行錯誤を継続中であるが、コーティングを施したカバーガラスに割を入れた神経節を機械的に貼り付ける方法が有望であることが分かった。

2) 同様の標本において前庭神経節細胞をパッチクランプした上でピペット内に予め入れておいたピオチンにより逆行性染色を行う実験においても、末梢前庭器～前庭神経細胞体の接続が保たれていないことが多く、標本作成手法を引き続き工夫する必要がある。

##### 免疫組織学的・分子生物学的実験

佐原・千原が行った。神経細胞の性質等を検索した後細胞質を電極内に吸引し、Single Cell RT-PCRを行って、イオンチャンネル(Kチャンネル)の発現を調べているが、未だ成功した細胞数が少なく、結論が出せる段階ではない。

2008年度

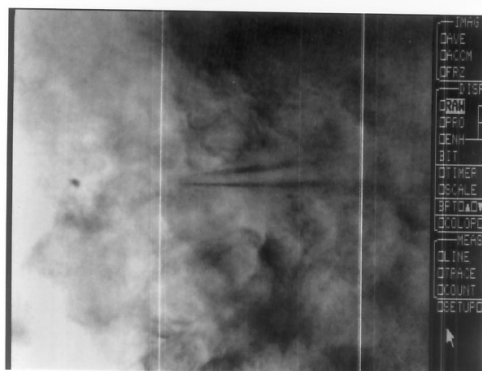
本年度は昨年度まで研究指導を行っていた研究分担者佐原の異動により、一時研究中断を余儀なくされた誤算があった。佐原は鶴見大学歯学部生理学教室准教授となり、引き続き連携研究者としてサポートする形となった。

#### 実験系の確立

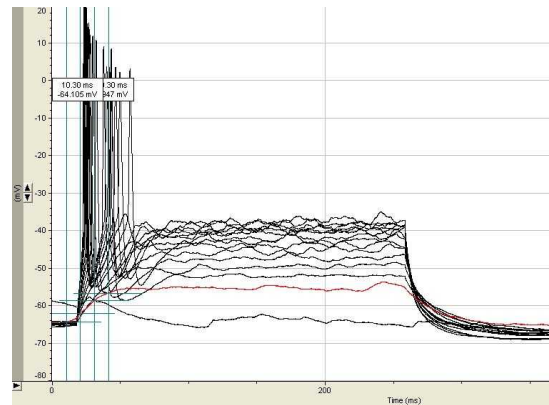
- 1) 灌流制御システムは装置の改良により安定を見た(佐原)。
- 2) ラット前庭神経節細胞の細胞体にその末梢受容器(耳石器・半規管膨大部)を付着した標本において、培養方法としては、Leibovitz's L-15を使用した短時間(< 5 hr)培養が最適であることが分かった(伊藤・千原)。

#### 生理学的実験

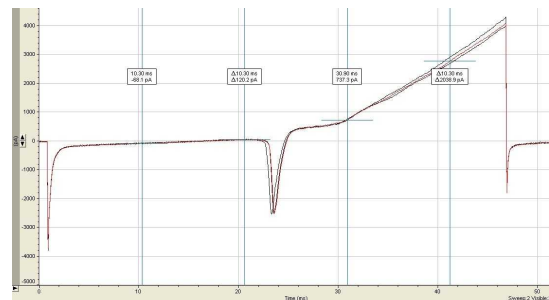
- 1) 末梢前庭器～前庭神経細胞体を一体とする標本において、神経のパッチクランプ記録を行うことが可能となった。脱分極刺激(電流注入)による神経発火パターンを記録したところ、主に phasic type の発火であり、今のところ単離・培養したものと大きな違いが無い結果となっている。(伊藤・佐原)
- 2) 同様の標本において前庭神経節細胞をパッチクランプして性質を調べた上でピペット内に予め入れておいたビオチンにより逆向性染色を行う実験は、パッチクランプの成功率が十分でなく、また実験中に細胞が死んだりパッチが外れてしまうトラブルが多いことから未だ信頼に足る結果が得られていない。(伊藤・佐原)



図：神経節細胞のパッチクランプ(写真)



図：神経節細胞の活動電位(Phasic type)



図：神経節細胞の電位・電流関係

#### 免疫組織学的・分子生物学的実験

- 1) 末梢前庭器～前庭神経細胞体を一体とする標本において、神経細胞の性質等を検索した後細胞質を電極内に吸引し、Single Cell RT-PCRを行う実験については、昨年度の失敗が単離細胞と異なり内容の吸引が難しいことに起因すると分かった。未だ試行錯誤の段階に止まっている。(千原・佐原)
- 2) 前庭神経節の興奮性の調節に関与すると分かったイオンチャネルやリガンド受容体の免疫染色については、試薬を購入して実験を開始したばかりの段階である。(千原・伊藤)

以上の研究はここまでの成果を踏まえ、今後も継続的に進行させる予定である。

#### 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 1件)

Shinichi Iwasaki, Yasuhiro Chihara, Yukari Komuta, Ken Ito, Yoshinori Sahara: Low-voltage activated potassium channels underlie the regulation of intrinsic firing properties of rat vestibular ganglion cells. J Neurophysiol 100: 2192-2204, 2008. (査読：あり)

〔学会発表〕(計 2件)

Ken ITO, Yasuhiro CHIHARA, Shinichi IWASAKI, Yoshinori SAHARA: Ligand-Gated Purinergic Receptors (P2X) Demonstrate Heterogeneous Subunit Characteristics in Rat Vestibular Ganglion Neurons. The 31st ARO Midwinter Research Meeting, Feb. 16-21, 2008, Phoenix, Arizona, USA

伊藤 健、千原康裕、岩崎真一：ラット前庭神経節におけるプリン受容体(P2X)の電気生理学的性質について．東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム2007、2007年9月15日、東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 健 (ITO KEN)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50251286

### (2)研究分担者

岩崎 真一 (IWASAKI SHINICHI)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10359606

千原 康裕 (CHIHARA YASUHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20401060

### 2007年度：

佐原 資謹 (SAHARA YOSHINORI)  
国立精神神経センター・  
神経研究所診断研究部・研究員  
研究者番号：40206008

### (3)連携研究者

2008年度：

佐原 資謹 (SAHARA YOSHINORI)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：40206008