

論文内容要旨

【目 的】

ラット pheochromocytoma より得られた PC12細胞は神経細胞分化のメカニズムを解明する目的で近年多く用いられている。PC12細胞を nerve growth factor (NGF) 存在下に培養すると神経細胞様の突起の伸展, 各種遺伝子の発現, 膜電位依存性の Na チャネルや Ca チャネル密度の増加, そして化学受容体ではニコチン様アセチルコリン受容体の密度の増加が報告されている。本実験の目的は PC12細胞を nerve growth factor (NGF) 存在下に培養したとき 5-hydroxytryptamine (5-HT) 受容体が発現するか否かを調べることであり, 今回パッチクランプ法を用いて電気生理学的に研究を行った。また PC12細胞を分化させる作用があるとされる cAMP の効果についても, その膜透過性化合物である 8-Br-cAMP 存在下に培養した細胞においても検討を行った。

【方 法】

PC12細胞を無処置 (対照), NGF (100ng/ml) 処置, と 8-Br-cAMP (1 mM) 処置の 3 群に分けて 10日間の培養を行い, それぞれの群の細胞に Y 字管法を用いて 5-HT (1 mM) を投与し, それによって惹起されるイオン電流を patch-clamp 法の whole-cell 様式を用い, 膜電位を -80 mV に保持して 5-HT で賦活されるイオン電流を記録した。記録は 10日間の培養期間中毎日行った。

【結 果】

対照群の細胞の中で, 培養期間中 (10日間), 5-HT の投与に対して外向き電流を示した細胞が 30例中 9 例, 内向き電流を示した細胞が 2 例存在したが, それらの電流量は非常に小さかった。その他の 19例の細胞は全く応答を示さなかった。NGF 処置群においては培養開始後約 3 日目より 5-HT による内向き電流が認められ始め, 5 日目以降の細胞では 41例中 39例の細胞で 5-HT によって内向き電流が惹起され, 反応性は引き続き培養によってさらに増大した。NGF 存在下に 6 日以上培養した細胞の 5-HT に対する容量-反応曲線を求めたところ, K_d 値は 1.5×10^{-6} M, Hill 係数は 1.2 であった。5-HT は -80 mV の保持電位で一過性の内向き電流を発生し, 細胞内外に K^+ を含まない条件での逆転電位は $+10.3$ mV で, この値は Na の平衡電位 ($+16$ mV) よりやや陰性の値を示した。また電流-電圧曲線は脱分極側において内向き整流を示した。1 価の陽イオンに対する 5-HT で賦活されるイオンチャネルの透過性の比は Na : Li : K : Rb : Cs = 1 :

1.19 : 0.89 : 0.94 : 0.91となり、このチャンネルは非選択的な透過性を有する large cation チャンネルであることが示唆された。特異的な5-HT₃ アゴニストである2-methyl-5-HT も5-HT と同様の一過性の内向き電流を発生したが、その最大応答性は5-HT のそれと比べると小さく、Kd 値は 0.8×10^{-5} M、Hill 係数は1.3であった。また2-methyl-5-HT 応答の活性化と不活性化過程も5-HT のそれと比較して遅かった。特異的な5-HT₃ アンタゴニストである ICS-205-930 は非競合的に5-HT 応答を抑制した。その IC₅₀ は 2.9×10^{-10} M であった。5-HT₁ ファミリーと5-HT₂ ファミリーのアンタゴニストである spiperone と5-HT₂ ファミリーのアンタゴニストである ketanserin は両者とも10 μM の濃度において5-HT 応答に何ら影響を与えなかった。電流の活性化過程の指標としての time to peak (tp) と不活性化過程の指標としての fast と slow の時定数 (τ_{if} と τ_{is}) は5-HT 濃度が高くなるにつれて小さくなった。8-Br-cAMP の効果は NGF より弱かったが、NGF と同様培養 5 日目以降においてはほとんどの細胞に5-HT₃ レセプターを発現させた。この5-HT 受容体の膜電位依存性や薬理学的特性は NGF によって発現されたものと同じであった。

【考 察】

無処置の PC12 細胞の一部が5-HT によって小さな内向きまたは外向き電流を惹起したことにより PC12 細胞がもともと5-HT 受容体の subtype を少量ながら持っていることが示唆された。そして NGF の添加が5-HT 受容体を顕著に発現させ、大きな内向き電流を惹起させた。この受容体を介するイオン電流の活性化・不活性化過程は非常に速く、1 価の陽イオンに対して非選択的な透過性を有するイオンチャンネルと複合体を形成し、さらに薬理学的には2-methyl-5-HT により活性化され、ICS-205-930 によって非競合的に抑制される、といった実験結果から、この5-HT 応答が5-HT₃ 型の受容体を介していることが明らかになった。同様の受容体はこれまでにマウスの海馬、ウサギの nodose ganglia、モルモットの submucous plexus などで報告されている。すなわちこの5-HT₃ 受容体はセカンドメッセンジャー系を介さない非選択的 large cation チャンネル内蔵型の5-HT 受容体・イオンチャンネル複合体であると考えられる。また8-Br-cAMP が5-HT₃ 受容体を発現したことにより細胞内 cAMP の存在がレセプター発現に関与する可能性も示唆された。

審査結果の要旨

神経細胞分化のメカニズムの解明は、神経科学の分野において最も興味深い研究課題のひとつである。神経細胞分化の研究の歴史の中で nerve growth factor (NGF) に対して反応性の高い PC12細胞は、非常に有用なモデルとして位置づけられてきている。しかしこの PC12細胞において、中枢および末梢神経細胞で重要な働きを有している 5-hydroxytryptamine (5-HT) 受容体に関する電気生理学的報告は、これまでまったくなされていなかった。申請者は NGF 存在下に培養を行った PC12細胞にこの 5-HT 受容体が発現することをパッチクランプ法を用いて電気生理学的に明らかにしたものである。

本研究では PC12細胞を NGF 存在下に培養を行うと、これらの細胞が培養開始後 3 日後より 5-HT により一過性の内向き電流を惹起することをまず報告している。このことから PC12細胞がなんらかのサブタイプの 5-HT 受容体を発現したことが示唆される。引き続きこの 5-HT によって惹起される電流について以下の詳細な電気生理学的実験を行っている。

① 5-HT により惹起されるイオン電流の電流-電圧曲線において逆転電位は Na の平衡電位よりやや陰性ではあるが近い値を示し、かつ 5 種の陽イオン (Na, Li, K, Rb, Cs) に対しては全て近い透過性の値を示した。この結果から、発現した 5-HT 受容体は非選択的に陽イオンを通す受容体・イオンチャンネル複合体であることを証明した。②この 5-HT 受容体のサブタイプを明らかにする目的で薬理学的実験を行った。特異的な 5-HT₃ アゴニストである 2-methyl-5-HT も 5-HT 同様の内向き電流を惹起すること。また特異的な 5-HT₃ アンタゴニストである ICS-205-930 は非競合的にこの 5-HT 応答を抑制するが、5-HT₁ ファミリーと 5-HT₂ ファミリーのアンタゴニストである spiperone と 5-HT₂ ファミリーのアンタゴニストである ketanserin はともにこの 5-HT 応答に何ら影響を与えていないこと。これらの実験事実から、今回 PC12細胞に発現された 5-HT 受容体は 5-HT₃ タイプの受容体であると結論している。また本実験では 8-Br-cAMP 存在下に培養した PC12細胞においても 5-HT₃ 応答を記録し、細胞内 cAMP の上昇が 5-HT₃ 受容体発現に関連していることも示唆している。

以上①と②の結果より、NGF 処理により PC12細胞に新たに 5-HT₃ 受容体が発現することを示した。この結果は、ある神経細胞群が NGF という成長因子の存在下に生存を続けるとこれまで持ちあわせなかったレセプターが新たに発現されるという事実を証明しており、神経科学の研究の流れの中で非常に有意義な研究であるといえる。さらに本論文ではこの 5-HT₃ 受容体の電気生理学的かつ薬理学的特性についても質の高い実験によって詳細に検討を加えており、化学受容体発現に関する機序を知る上で意義の高い研究であるといえる。よって、本研究は学位授与に値するものと考えられる。