

フット気道副交感神経節ニューロンにおけるニコチン性アセチルコリン受容体応答のヒドロコルチゾンによる抑制

石, 政道
九州大学大学院医学研究院細胞システム生理学分野

<https://hdl.handle.net/2324/7183589>

出版情報 : 福岡医学雑誌. 93 (2), pp.23-28, 2002-02-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :

原 著

ラット気道副交感神経節ニューロンにおけるニコチン性
アセチルコリン受容体応答のヒドロコルチゾンによる抑制

九州大学大学院医学研究院細胞システム生理学分野 (指導 赤池紀生 教授)

石 政 道

Hydrocortisone Inhibits Nicotinic Acetylcholine Receptor
Response in the Rat Airway Parasympathetic Ganglion Neurons

Masamichi SEKI

*Cellular and System Physiology (Director Norio Akaike), Graduate School of
Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan*

Abstract The effect of hydrocortison on neurons acutely isolated from the rat airway parasympathetic ganglia was investigated by using nystatin perforated-patch recording configuration under the voltage-clamp conditions. Acetylcholine (ACh) evoked inward currents in a concentration-dependent manner with a half maximum effective concentration (EC_{50}) of 3.3×10^{-5} M at a holding potential of -50 mV. The ACh response was mimicked by nicotine, and it was inhibited by both mecamylamine and hexamethonium. α -Bungarotoxin had no effect on the ACh response. Hydrocortisone concentration-dependently inhibited the current induced by 3×10^{-5} M ACh with a half maximum inhibitory concentration (IC_{50}) of 2.1×10^{-4} M. The effect of hydrocortisone was voltage-independent. Hydrocortisone suppressed the maximum response of the ACh concentration-response curve, indicating that the inhibitory action of hydrocortisone on the nicotinic ACh response is non-competitive.

Key words: acetylcholine, nicotinic response, rat paratracheal ganglion neuron, steroid, hydrocortisone, nystatin perforated patch recording

は じ め に

気管支喘息は呼吸困難を主症状とし、可逆的な気道狭窄と気道過敏性を特徴とする疾患であり、この気道の過敏性は気道炎症と密接に関連している。喘息患者に一致してみられる気道過敏性の発症機序については未だ不明な点が多いが、その発症要因としては、炎症性細胞から遊離されるヒスタミンやロイコトリエンなどに加え¹⁾¹⁴⁾、神経ペプチドであるタキキニン類などの関与も示唆されている²⁾。

下気道を支配する交感神経および副交感神経は古典的神経伝達物質、すなわちノルアドレナリン (NAd) やアセチルコリン (ACh) のみならず、複数の非アドレナリン非コリン (NANC) 性神経伝

達物質を放出し、気道や血管に分布する平滑筋の収縮と弛緩サイクルを制御し、気道内腔径や気管における血流そして気道分泌の調節を行っている⁵⁾⁸⁾。このうち ACh を伝達物質とするコリン作動性神経は気道平滑筋収縮に関して最も強力であり、気道壁で傍気管神経節を形成し、その節後線維が気道平滑筋、血管や分泌腺に投射する⁴⁾。

現在、気管支喘息の治療薬としては吸入ステロイド剤が最も重要な治療薬の一つであり、ステロイドが喘息におけるさまざまな炎症反応を抑制することが知られている³⁾。しかし、ステロイドの気道神経系に対する作用はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では傍気管神経節ニューロンのアセチルコリン受容体応答に対するヒドロコルチゾンの影響について検討した。

方 法

1. 気道副交感神経節ニューロンの単離

気道副交感神経節ニューロンは、Aibara 等の方法¹⁾にしたがって単離した。すなわち、実験には生後2週齢のラットを用い、ペントバルビタール麻酔下に速やかに気管及び気管支を取り出した。続いて、実体顕微鏡下に神経節を摘出し、コラゲナーゼ0.3%、トリプシン0.3%を含む標準外液中37°Cで45分間処理した。酵素処理の後、培養皿中でパスツールピペットを用いて気道副交感神経節ニューロンを単離した。単離したニューロンは20分以内に培養皿の底に付着した。このようにして得た単離ニューロンを用いて電気生理学的実験を行った。

本研究は日本薬理学会の「Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals」に基づいて行った。

2. 単離ニューロンからの電流記録

電気生理学的測定はニスタチン穿孔パッチ記録法を用いて行った。まず外径1.5 mmのガラス管からパッチ電極作製機を用いて先端径が約1 μ mのパッチ電極を作製した。その後、パッチ電極内に電極内液を充填し、倒立位相差顕微鏡でニューロンを観察しながら、三次元油圧マイクロマニプレータを用いて、電極先端をニューロンに軽く接触させ、軽く吸引することによりニスタチン穿孔パッチを形成した。膜電流および膜電位はパッチアンプにより増幅した。1 kHz以上のノイズはフィルター(E-3210A NF Electronic Instruments, Tokyo, Japan)で除去してデジタルストレージシロスコープ(VC-6025 Hitachi, Tokyo, Japan)で観察するとともにテープレコーダー(RE-130TE, TEAC, Tokyo, Japan)に保存した。全ての実験は室温(21~24°C)で行った。実験結果は平均±標準誤差で示し、有意差検定はStudent t-testにより行った。

3. 溶液と薬品

標準外液のイオン組成(mM)は、NaCl 150, KCl 5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 10とglucose 10からなりtris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris-OH)を用いてpHを7.4に調節した。パッチピペット内

液の組成(mM)は、Cs-methanesulfonate 80, CsCl 70とHEPES 10で、Tris-OHを用いてpHを7.2に調節した。ニスタチンは10 mg/mlの濃度でエタノールに溶解した後、最終濃度が100 μ g/mlとなるようにパッチピペット内液に加えた。薬液はYチューブにより急速投与した。この方法を用いると記録しているニューロンの細胞外液を20ミリ秒以内に完全に交換できる。

結 果

1. 気道副交感神経節ニューロンにおけるAChとニコチン応答

最初に副交感神経節ニューロン(以下ニューロンと省略)におけるACh応答について検討した。保持電位-50 mVにおいてAChは濃度依存的に内向き電流を惹起した(図1 A)。AChの濃度-応答曲線から得られた50%有効濃度(EC₅₀)は 3.3×10^{-5} Mであった(図1 C)。また、ニコチン性ACh受容体(以下ニコチン受容体と省略)の作動薬であるニコチンもAChと同様に濃度依存的に内向き電流を惹起し、そのEC₅₀値は 1.8×10^{-5} Mであった(図1 BとC)。なお、本ニューロンはムスカリン性ACh受容体も有するが、細胞内液がK⁺を含まないため記録されるACh応答にはK⁺チャネル電流が関与するムスカリン性応答は含まれない²⁾。

2. ACh誘発電流に対するヘキサメトニウム、メカミラミンと α ブングアロトキシンの作用

ACh誘発電流に対するニコチン受容体拮抗薬のヘキサメトニウムとメカミラミンの作用について検討した。メカミラミンとヘキサメトニウムはいずれも 3×10^{-5} M AChによって惹起される内向き電流を濃度依存的に抑制し、その50%抑制濃度(IC₅₀)はメカミラミンが 1.7×10^{-6} Mヘキサメトニウムが 2.0×10^{-4} Mであった(図2)。

同様に α ブングアロトキシンの作用を検討したが、 3×10^{-7} M α ブングアロトキシンはACh誘発電流に対して無効であった。

3. ハイドロコルチゾンによるACh誘発電流の抑制

ハイドロコルチゾンは、ACh(3×10^{-5} M)で誘発された電流を可逆的かつ濃度依存的に抑制した(図3 A)。ハイドロコルチゾンの濃度とACh応答の抑制作用との関係を示す曲線から得られた

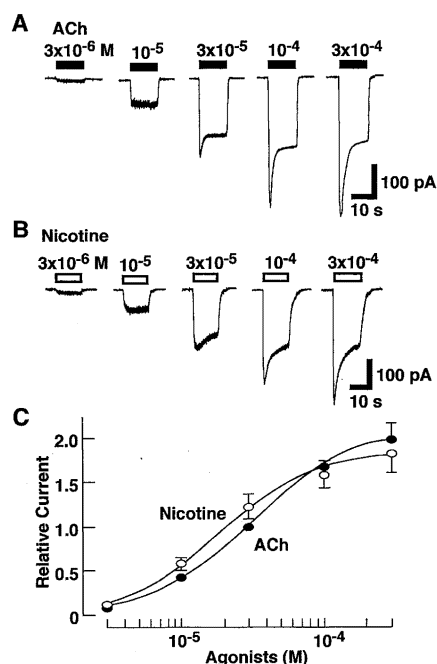


図 1 単離したラット気道副交感神経節ニューロンへの ACh とニコチンの作用. 実験は膜電位固定下, 保持電位 -50 mV にてニスタチン穿孔パッチ記録法で行った. A, 種々の濃度の ACh によって発生する内向き電流. B, 種々の濃度のニコチンによる内向き電流. C, ACh とニコチンの濃度応答曲線. 全てのポイントは 3×10^{-5} M ACh 誘発電流に対する比率で表した. 各点は 5 例の平均値.

IC_{50} 値は 2.1×10^{-4} M であった (図 3 B).

4. ACh 誘発電流の電流-電圧関係に対するハイドロコルチゾンの影響

ハイドロコルチゾンによる ACh 誘発電流抑制作用が, 保持電位により変化するかどうかを明らかにするため, ACh 誘発電流の電流-電圧 (I-V) 関係に対するハイドロコルチゾンの作用について検討した. 図 4 にハイドロコルチゾン (3×10^{-4} M) 存在・非存在下における ACh (3×10^{-5} M) 誘発電流の I-V 関係を示す. ハイドロコルチゾンは検討したすべての電位においてほぼ同程度に ACh 誘発電流を抑制した. また, ハイドロコルチゾン存在下における ACh 誘発電流の逆転電位と非存在下での逆転電位間にはほとんど違いがなかった.

5. ACh 誘発電流の濃度-応答関係に対する

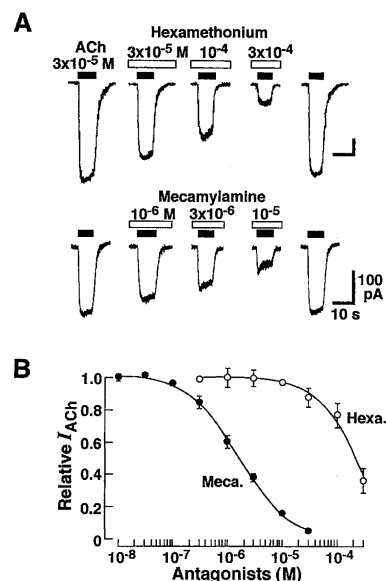


図 2 ACh 誘発電流に対するメカミラミンとヘキサメトニウムの作用

A, 3×10^{-5} M ACh によって誘発される内向き電流が種々の濃度のヘキサメトニウム (上段) およびメカミラミン (下段) 存在下でいかに抑制されるかを示す. ACh は 2 分ごとに 15 秒間投与した. ヘキサメトニウムとメカミラミンは ACh を投与する 30 秒前から投与した. B, ヘキサメトニウムとメカミラミンの ACh 応答に対する濃度-抑制曲線. 縦軸は 3×10^{-5} M ACh 単独での内向き電流に対する比率として表した. 各点は 4 例の平均値.

ハイドロコルチゾンの影響

ACh 誘発電流の濃度-応答曲線に対するハイドロコルチゾンの影響について検討した. 図 5 A に示す様に, ハイドロコルチゾンは ACh 誘発電流の最大応答を抑制した. この関係を Lineweaver-Burk プロットしたところ, コントロールとハイドロコルチゾン存在下の直線が x 軸上で交わった. このことから, ハイドロコルチゾンの ACh 誘発電流抑制作用は非競合的であることが示唆された (図 5 B).

考 察

ACh 受容体はニコチン受容体とムスカリン受

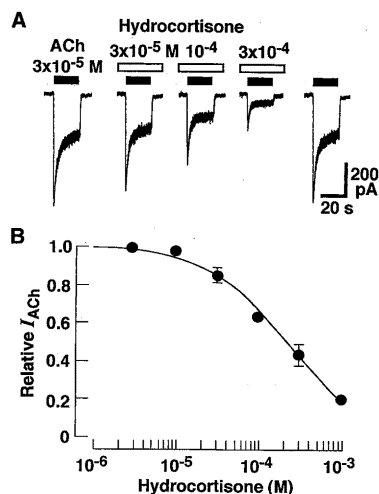


図3 ACh誘発電流に対するハイドロコルチゾンの抑制作用

A, 3×10^{-5} M ACh誘発電流が種々の濃度のハイドロコルチゾン存在下でいかに抑制されるかを示す。B, ハイドロコルチゾンのACh応答に対する濃度抑制曲線。各点は4~5例の平均値。

容体に大別されるが、ニコチンがAChと同様の内向き電流を誘発したことから(図1), 本研究で見られたACh応答はニコチン受容体を介した応答であると考えられた。実際, このACh応答はニコチン受容体の拮抗薬であるヘキサメトニウムやメカミラミンによって濃度依存的に抑制され(図2), 神経型のニコチン受容体の関与が示唆された。また, α ブンガロトキシンがACh応答に無効であったことから, 本応答に関与するニコチン受容体に $\alpha 7$ サブユニットは含まれていないと考えられる。

ステロイドはその細胞内に存在する核内受容体に結合して遺伝子発現を制御することが報告されている¹²⁾。この遺伝子発現を伴う作用の場合, その発現までには数時間またはそれ以上の時間経過が必要である。一方, ステロイドが細胞膜の受容体やイオンチャネルに作用することで, より早い作用を発現することも報告されている¹⁵⁾。本研究でみられたハイドロコルチゾンによるアセチルコリン誘発電流の抑制もその作用発現が早いことから, 本作用に遺伝子発現は伴わないと考えられる。

ハイドロコルチゾンは筋肉型ニコチン受容体を

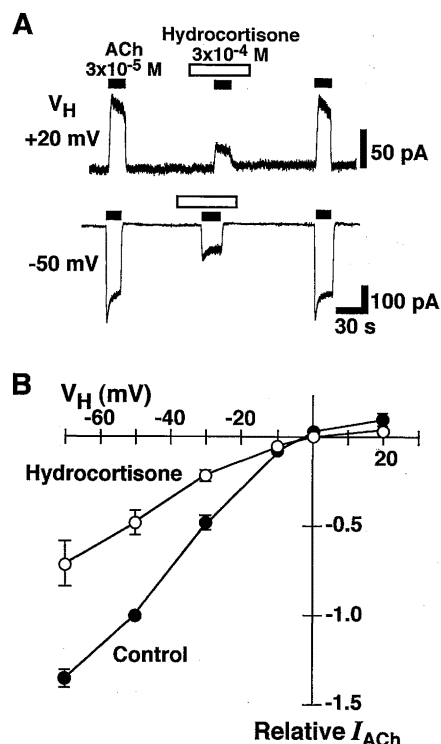


図4 ハイドロコルチゾン存在・非存在下におけるACh誘発電流の電流-電圧関係

A, 保持電位 +20 と -50 mV で 3×10^{-4} M ハイドロコルチゾンによるACh誘発電流の抑制作用。B, ハイドロコルチゾン有無における電流-電圧関係。縦軸は保持電位 -50 mV における 3×10^{-5} M ACh 単独での内向き電流値に対する比率として示す。各点は4~5例の平均値。

細胞膜の外側からだけでなく内側からも抑制し, その作用に電位依存性のあることが報告されている^{6,7)}。一方, アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた $\alpha 4$ 及び $\alpha 1$ サブユニットからなるニコチン受容体のプレグネノロン(ステロイドホルモン)による抑制は電位依存性を示さない¹³⁾。本研究において, ハイドロコルチゾンは傍気管神経節ニューロンのアセチルコリン応答を非競合的に抑制した。従って, ハイドロコルチゾンはニコチン受容体・チャネルに直接作用していると考えられるが, ハイドロコルチゾンのより詳細な作用部位については今後さらなる検討が必要である。

気道における感覚情報は知覚神経を介して中枢へと伝えられるが, 炎症等により気道上皮が障害

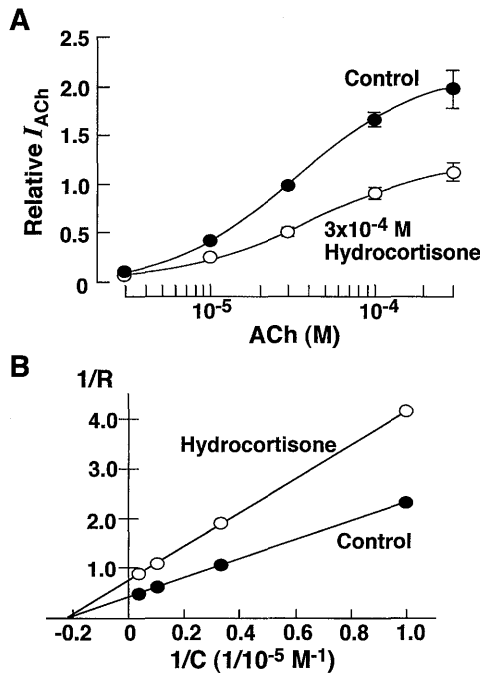


図5 ACh 誘発電流の濃度応答関係に対するハイドロコルチゾンの作用
A, ACh 誘発電流の濃度応答関係に対するハイドロコルチゾン ($3 \times 10^{-4} M$) の作用. 各点は5例の平均値. B, Lineweaver-Burk プロット.

をうけると知覚神経が露出するため、神経の易刺激性をきたし、炎症性気道疾患では中枢を介した迷走神経反射経路の緊張が高まっていると考えられる⁹⁾。また、気道の知覚神経終末部で発生した活動電位は知覚神経を上行して中枢へと情報を伝えるだけでなく、その一部は末梢分岐部を介して逆行し、分岐末端からサブスタンス P などのタキキニン類やカルシトニン遺伝子関連ペプチドを放出させる⁵⁾。気道の知覚神経分岐は傍気管神経節にも投射し、その末端から放出される神経ペプチドによって本神経節ニューロンが興奮することも報告されている⁵⁾。従って、炎症性気道疾患では、アセチルコリンの過放出が起きていると考えられ、実際、喘息患者に抗コリン薬を吸入させると、健康人に比べて大きな気道拡張が認められる¹⁰⁾。ハイドロコルチゾンが傍気管神経節ニューロンのニコチン性 ACh 受容体応答を抑制したことから、ハイドロコルチゾンは迷走神経節前繊維終末から節後ニューロンへのシナプス伝達を抑制して気道を支配する迷走神経の活性を低下させることによ

り気道平滑筋を弛緩させ喘息の症状を緩和する可能性がある。

参考文献

- 1) Aibara K, Ebihara S and Akaike N (1992): Voltage-dependent ionic currents in dissociated paratracheal ganglion cells of the rat. *J. Physiol. (Lond)* 457: 591-610.
- 2) Barnes PJ (1986): Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev Respir Dis* 134: 1289-1314.
- 3) Barnes PJ (1990): Effect of corticosteroids on airway hyperresponsiveness. *Am Rev Res Dis* 141: s70-s76.
- 4) Barnes (1992): Modulation of transmission in airways. *Physiol. Rev.* 72: 699-729.
- 5) Barnes PJ, Chung KF and Page CP (1998): Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacological. Rev.* 50: 515-595.
- 6) Bouzat C and Barrantes FJ (1993): Hydrocortisone and 11-deoxy-cortisone modify acetylcholine receptor channel gating. *Neuroreport* 4: 143-146.
- 7) Bouzat C and Barrantes FJ (1996): Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoid hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade. *J. Biol. Chem.* 271: 25835-25841.
- 8) Hakoda H and Ito Y (1990): Modulation of cholinergic neurotransmission by peptide VIP, VIP antiserum and VIP antagonists in dog and cat trachea. *J. Physiol. (Lond)* 428: 133-154.
- 9) Ichinose M (1998): Airway autonomic nervous system dysfunction and asthma. *Folia Pharmacol. Jpn* 111: 195-203.
- 10) Jacoby DB, Gleich GJ and Fryer AD (1993): Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J. Clin. Invest.* 91: 1314-1318.
- 11) Larsen JS & Jackson SK (1996): Antileukotriene therapy asthma. *Am. J. Health Syst Pharm.* 53: 2821-2830.
- 12) Munck A, Mendel DB, Smith LI & Orti E (1990): Glucocorticoid receptors and actions. *Am Rev Res Dis* 141: s2-s10.
- 13) Valera S, Ballivet M and Bertrand D (1992): Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9949-9953.
- 14) White MV, Slater JE and Kaliner MA (1987):

- Histamine and asthma. *Am Rev Respir Dis* 135: 1165-1176.
- 15) Wu FS and Chen SC (1997): Mechanism underlying the effect of pregnenolone sulfate on the kainate-induced current in cultured chick spinal cord neurons. *Neurosci. Lett.* 222: 79-82.
- (受付 2001-11-21)