

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580317

研究課題名（和文） 虚血病態下の脊髄におけるプリン化合物動態変化とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文） Release of purines and its mechanisms under ischemic conditions in spinal cord

研究代表者

乙黒 兼一 (OTSUGURO KEN-ICHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：40344494

研究成果の概要（和文）：虚血病態下の低酸素やアシドーシスにより神経機能は大きく影響を受ける。本研究課題では、脊髄神経経路の電気的活動の記録とともに、細胞外プリン化合物濃度を測定することで、脊髄組織から低酸素やアシドーシスによってアデノシンと共にイノシンが放出されること、アデノシンはアデノシン A1 受容体を介して神経活動を抑制することを示した。さらに、低酸素の神経活動への影響は、日齢や温度、神経経路によって大きく異なることが示され、この要因として抑制反応に対するアデノシンの関与の有無が重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It is well-known that hypoxia and acidosis significantly influence neuronal functions under ischemic conditions. In this study, an electrical activity of spinal neuronal pathways and extracellular purine concentration were measured. Hypoxia and acidosis released not only adenosine but also inosine from the spinal cord, and adenosine suppressed the neuronal activities via adenosine A1 receptors. In addition, the influence of hypoxia largely depended on age, temperature and neuronal pathways. It is suggested that adenosine plays an important role in this phenomenon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：獣医薬理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：アデノシン、脊髄、新生ラット、反射電位、低酸素、アシドーシス、虚血

1. 研究開始当初の背景

(1) アデノシンなどのプリン化合物が、低酸素などによって細胞外に蓄積し、虚血病態の形成・進行に重要な役割を持つことが示唆されているが、詳細は不明のままである。

(2) 研究代表者は、アデノシンなどのプリン化合物が受容体を介して様々な細胞機能

を調節していることを報告してきており、最近、アシドーシスや低酸素が脊髄組織からアデノシンを放出させ、神経活動を抑制していることを見出した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、低酸素やアシドーシス下

での脊髄における神経活動抑制とプリン化合物動態変化のメカニズムを詳細に検討し、プリン化合物の虚血病態形成における役割を明らかにする。

(2) 中枢神経組織である脊髄の機能を解析するために、細胞・分子レベルの検討に加え、神経ネットワーク構築を保持した標本を用いて、神経機能とプリン化合物動態を検討する。

(3) プリン化合物動態変化の詳細と、そのメカニズムを明らかにすることにより、虚血病態の改善に有効な薬物治療ターゲットの発見の基盤となる成果を目指す。

3. 研究の方法

(1) 動物は Wistar ラットを用い、自家繁殖により新生動物を得る。低酸素は N_2 を、高炭酸アシドーシスは 20% CO_2 を含むガスで通気した人工脳脊髄液を曝露することにより標本に適用する。

(2) 新生ラット摘出脊髄を用いた脊髄反射電位の測定。脊髄標本の後根を電気刺激し、隣接する後根や対応する前根より脊髄反射電位を記録する。これにより異なる経路を介する3種類 (MSR、sVRP、DRP) の脊髄反射電位を測定する (図1)。

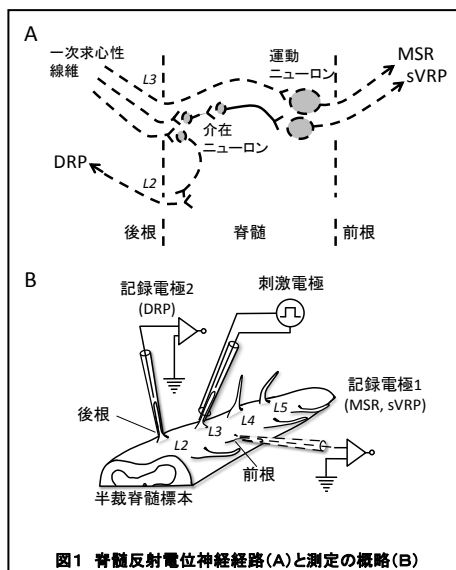


図1 脊髄反射電位神経経路(A)と測定の概略(B)

(3) 細胞外プリン化合物濃度の測定。摘出脊髄を断片化し、細胞外液に放出されるアデノシンやイノシンなどのプリン化合物を高速度液体クロマトグラム (HPLC) 法により測定する。cAMP 量はエンザイムイムノアッセイ (EIA) 法により測定する。

(4) プリン化合物濃度のリアルタイム測定。アデノシンやイノシン、ATP 測定用バイオセンサーを脊髄標本に刺入し、局所のプリン化合物濃度変化をリアルタイムで測定する。

4. 研究成果

(1) 脊髄標本を高炭酸アシドーシス (20% CO_2) に曝露すると、脊髄反射電位 (MSR、sVRP) が速やかに抑制され、この抑制効果はアデノシン A1 受容体拮抗薬 CPT で減弱した (図2)。最近、海馬ではアシドーシスによって ATP が放出されその後アデノシンに分解されることが報告されたが、本実験では ATP 受容体拮抗薬や ATP 分解酵素の阻害薬は影響を与えないことから、脊髄ではアデノシンそのものがアシドーシスによって放出され、A1 受容体を活性化していることが示唆された。

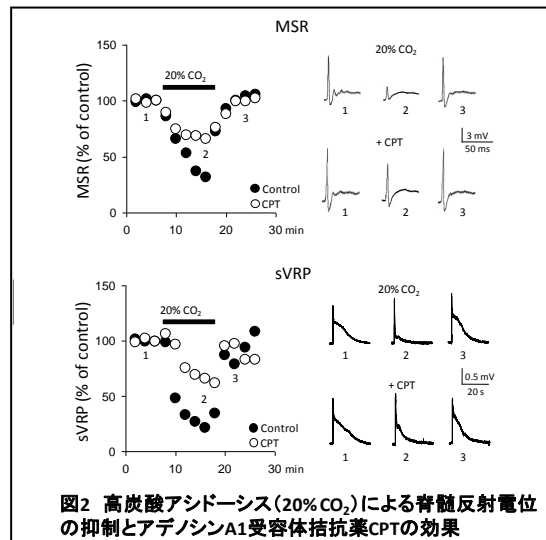


図2 高炭酸アシドーシス(20% CO_2)による脊髄反射電位の抑制とアデノシンA1受容体拮抗薬CPTの効果

(2) 高炭酸アシドーシスによるアデノシン放出は、アニオントランスポーターやギャップジャンクションヘミチャネルなどの阻害薬の影響を受けなかったことから、それらのチャネルやトランスポーターを介さない経路で放出されていると考えられた。また、外液のカルシウムを除去すると、アデノシン放出量は有意に増強されたことから、アシドーシスによるアデノシン放出に、カルシウムによって抑制される過程が関与していることが示唆された。

(3) さらに低酸素によっても脊髄からアデノシンが放出され、ATP や ADP、AMP、cAMP など他のプリン化合物量には変化が見られなかったが、イノシンはアデノシンと共に放出されることが示された (図3)。

(4) 低酸素によるアデノシン・イノシン放出は温度に大きく依存した。また高炭酸アシドーシスによる放出と同様に、低酸素によるアデノシン・イノシン放出も外液カルシウム除去により有意に増強されたことから (図4)、カルシウムで抑制を受ける共通のメカニズムが関与している可能性が考えられる。

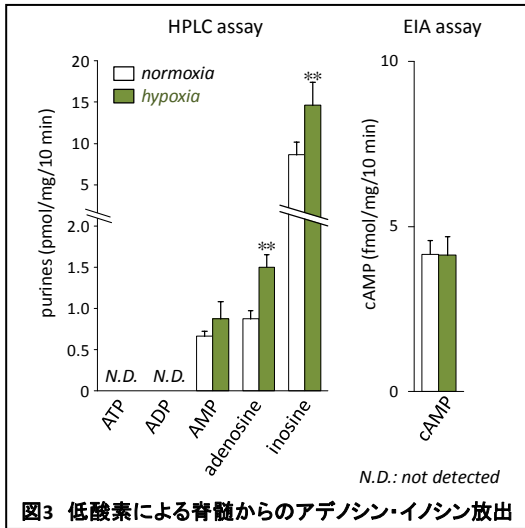


図3 低酸素による脊髄からのアデノシン・イノシン放出

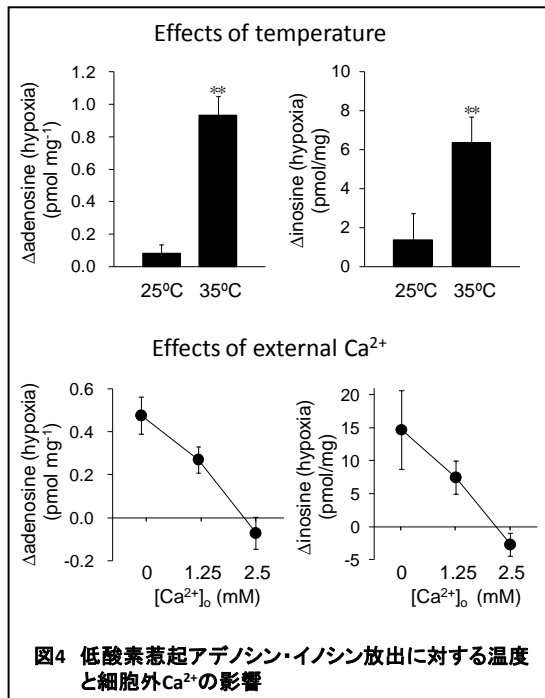


図4 低酸素惹起アデノシン・イノシン放出に対する温度と細胞外Ca²⁺の影響

(5) 平衡ヌクレオトランスポーター (ENT) 阻害薬である NBTI とジピリダモール (DIP) は、低酸素惹起アデノシン放出には影響を与えなかったが、イノシン放出を消失させたことから、イノシンは ENT を介して放出されていることが示唆された。またイノシン放出はアデノシンをイノシンへと変換する酵素であるアデノシンデアミナーゼ阻害薬 EHNA によっても消失した。以上の結果から、低酸素によって放出されるイノシンは、細胞内でアデノシンからアデノシンデアミナーゼ (ADA) によって変換され、ENT を介して放出されたもの、またアデノシンは、いまだ未同定の経路を介し、細胞内から直接放出されていることが示唆された (図 5)。

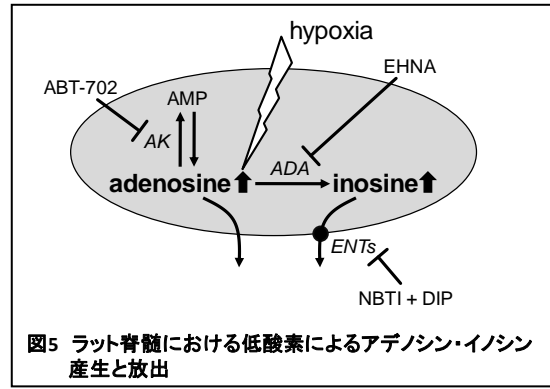


図5 ラット脊髄における低酸素によるアデノシン・イノシン産生と放出

(6) 摘出脊髄標本を低酸素に短時間 (10 分間) 曝露すると、5-8 日齢 (P5-8) では、MSR、sVRP、DPR の全ての反射電位が速やかに抑制された。一方、0-3 日齢 (P0-3) では抑制効果が P5-8 に比べて有意に弱かった。特に MSR は P0-3 では低酸素でほとんど抑制されず、日齢に大きく依存することが示されたが、sVRP では P0-3 でも、低酸素による明らかな抑制効果が認められた。(図 6)。

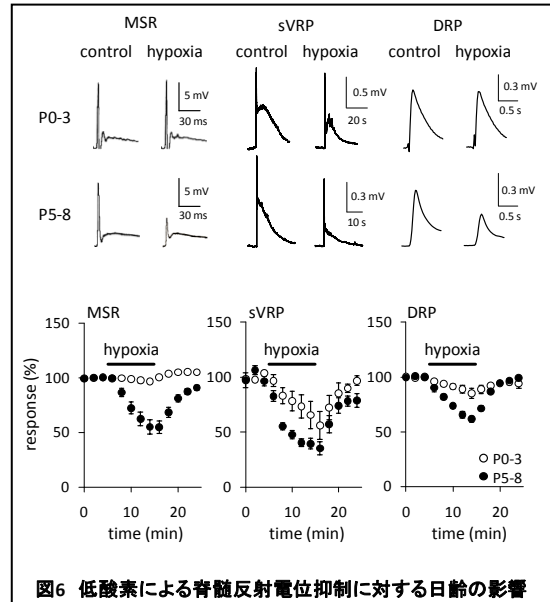
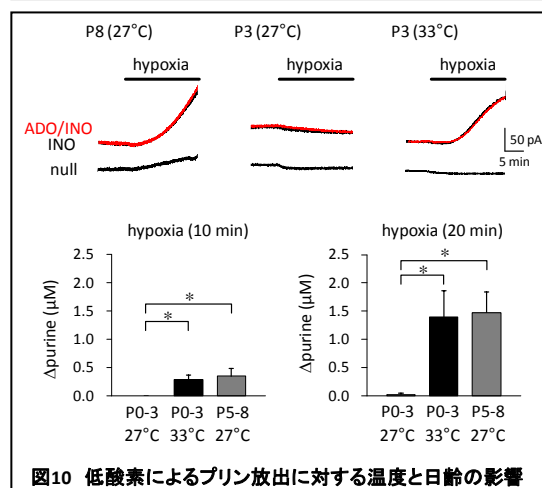
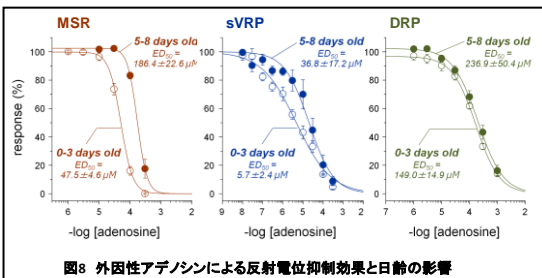
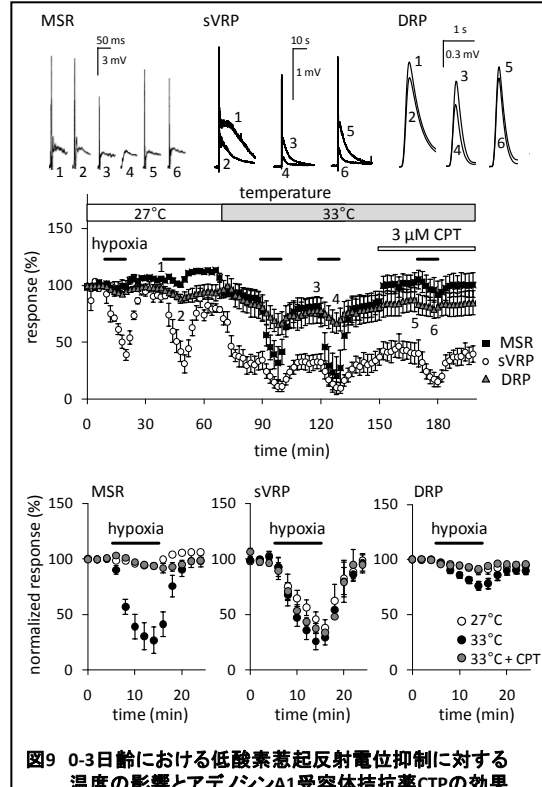
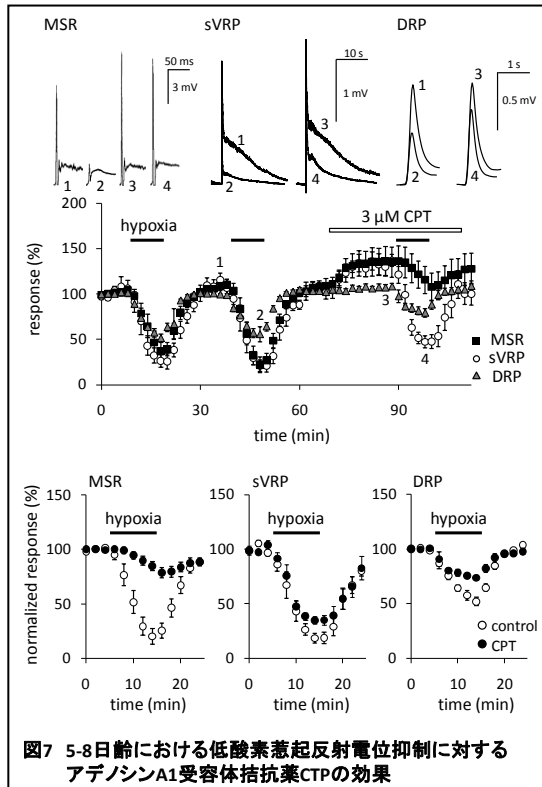


図6 低酸素による脊髄反射電位抑制に対する日齢の影響

(7) P0-5 における低酸素による反射電位抑制効果は、アデノシン A1 受容体拮抗薬 CPT で有意に減弱した。しかしながら、MSR 抑制は CPT によって消失したが、sVRP 抑制は大部分が CPT 耐性であり、神経経路によってアデノシンの関与の度合いが異なることが示唆された (図 7)。

(8) 外因性に投与したアデノシンの効果を日齢で比較したところ、P0-3 及び P5-8 のどちらの脊髄でも、アデノシンは濃度依存性に MSR、sVRP、DPR を抑制し、日齢による大きな差は認められなかった (図 8)。



(9) P0-3日齢において、通常の実験温度である 27°C では、低酸素による MSR 抑制はほとんど生じないが、33°C に温度を上昇すると、低酸素による MSR 抑制が出現し、この抑制効果も CPT で消失した。一方、sVRP の抑制は、温度に関わらず出現し、CPT 耐性も温度の影響を受けなかった (図 9)。

(10) バイオセンサーを用い、低酸素によるアデニン・イノシン放出を測定したところ、27°C において P5-8 では有意なプリン放出が生じたが、P0-3 では生じなかった。一方、温度を 33°C に上昇させると、P0-3 においても低酸素によるプリン放出が出現した (図 10)。以上の結果より、P0-3 において低酸素による MSR 抑制が見られなかったのは、アデニン放出が生じなかったためであることが示唆された。

(11) 今研究により、低酸素やアシドーシスにより脊髄組織からアデニンが放出されることが明らかとなった。また、イノシンも同時に放出されることも示された。低酸素

で放出されたアデノシンは、A1 受容体を介して、脊髄の神経活動を抑制することが示されたが、脊髄神経の経路によって低酸素の影響が大きく異なることが初めて示された。低酸素による抑制には、アデノシン依存性と非依存性のメカニズムが存在し、神経経路によってそれぞれに対する依存度が異なることが、日齢や温度の影響の差となっていることが示唆された。

このような結果は、細胞・分子レベルの実験では明らかにできなかったことであり、中枢神経系機能の解析には、組織レベルでの検討が必要不可欠であることが示された。今後さらに検討を加え、アデノシンやイノシン放出メカニズムが明らかになれば、虚血性疾患病態の解明とその治療薬の開発に大きく貢献するものと期待できる。

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 3 件)

- ①Otsuguro K, Wada M, Ito S. Differential contributions of adenosine to hypoxia-evoked depressions of three neuronal pathways in isolated spinal cord of neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* (2011) in press. 査読有
- ②Takahashi T, Otsuguro K, Ohta T, Ito S. Adenosine and inosine release during hypoxia in the isolated spinal cord of rats. *Br. J. Pharmacol.* (2010) 161, 1806-1816. 査読有
- ③Otsuguro K, Ban M, Ohta T, Ito S. Roles of purines in synaptic modulation evoked by hypercapnia in isolated spinal cord of neonatal rat *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* (2009) 156, 1167-1177. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ①乙黒兼一、脊髄反射電位に対するアデノシンの作用と低酸素惹起シナプス伝達抑制への関与、第 38 回薬物活性シンポジウム、平成 22 年 11 月 11 日、教育文化会館 (札幌市)
- ②乙黒兼一、低酸素暴露によるラット脊髄からのプリン化合物放出、第 147 回日本獣医学会、平成 21 年 4 月 4 日、栃木県総合文化センター (宇都宮市)
- ③乙黒兼一、二酸化炭素の薬理作用、第 146 回日本獣医学会、平成 20 年 9 月 24 日、シーガイア (宮崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乙黒 兼一 (OTSUGURO KEN-ICHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：40344494

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし