

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19989

研究課題名(和文) 脊髄前角運動ニューロンに対する活性酸素の作用機序解明と新規脊髄保護療法の開発

研究課題名(英文) Effects of reactive oxygen species on spinal ventral horn neurons and investigation of neuroprotective therapy for spinal cord injury

研究代表者

大橋 正幸 (OHASHI, Masayuki)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：70706720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素の一つである過酸化水素は、脊髄前角において、興奮性シナプス前終末に直接作用し、N型電位依存性カルシウムチャネル(VGCC)、リアノジン受容体、イノシトール3リン酸受容体(IP3R)を活性化してグルタミン酸の放出を増加させた。また、抑制性シナプス前終末にも直接作用し、IP3R活性化によりGABA放出を増加させた。このGABAは興奮性シナプス前終末やシナプス後細胞に作用して、過酸化水素によるグルタミン酸過剰放出や細胞興奮性増強を抑制しており、生体防御機構として機能していると考えられた。さらに、N型VGCC阻害薬は脊髄損傷モデルラットにおいて脊髄保護効果を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated how pathological levels of H2O2, an abundant reactive oxygen species, regulate synaptic transmission and neuronal excitability in VH neurons of rats using a whole-cell patch-clamp approach. H2O2 increased the release of glutamate and GABA from presynaptic terminals. The increase in glutamate release involved N-type voltage-gated calcium channels (VGCCs), ryanodine receptors (RyR), and inositol triphosphate receptors (IP3R); the increase in GABA release, which inhibited glutamatergic transmission, involved IP3R. On the other hand, H2O2 decreased neuronal excitability via activation of extrasynaptic GABAA receptors. H2O2 depressed the medium and slow afterhyperpolarisation, suggesting that H2O2 per se has the potential to induce hyperexcitability in VH neurons via a decrease in conductance of small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels. Moreover, N-type VGCC inhibitor (ziconotide) attenuated damage induced by spinal cord injury in rat models.

研究分野：整形外科

キーワード：活性酸素 過酸化水素 脊髄損傷 二次障害 パッチクランプ 脊髄保護療法

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や虚血は運動麻痺を引き起こし、患者の生活の質を著しく低下させる重篤な病態である。これらの病態には、以前より活性酸素 (ROS) の関与が報告されている。ROS による神経障害の機序の一つとして、神経シナプスにおいて興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の過剰放出を生じ、シナプス後細胞のグルタミン酸受容体の活性化による過剰な興奮と、それに引き続く細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が細胞死を引き起こす、「グルタミン酸毒性」が報告されている。グルタミン酸受容体には NMDA 型、AMPA 型、カイニン酸 (KA) 型、代謝型 (mGlu) 受容体があるが、全てのグルタミン酸受容体を同時に阻害する薬剤は存在しないことから、治療標的をシナプス前終末とし、グルタミン酸の過剰放出自体を抑制する戦略の方が効果的な脊髄保護作用を期待できる。しかし、ROS によるシナプス前終末からのグルタミン酸過剰放出の機序は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ROS が脊髄前角運動ニューロンのシナプス伝達および細胞興奮性に対する作用機序を電気生理学的実験 (パッチクランプ法) で解明することである。さらに、ROS によるグルタミン酸の過剰放出を抑制することで、脊髄保護効果を発揮することができるかを、脊髄損傷モデルラットを用いて検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 電気生理学的実験

幼若ラットにウレタン麻酔を行って脊髄を摘出し、厚さ約 500  $\mu\text{m}$  の脊髄横断スライスを作成し、記録用チャンバーに移して人工脳脊髄液 (ACSF) で灌流した。近赤外線微分干渉顕微鏡を用いて脊髄前角第 IX 層のニューロンをテレビモニター下に観察しながら微小電極を誘導し、ホールセル・パッチクランプ記録を行った。ROS として、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 mM, 5 分) を灌流投与した。

#### シナプス伝達に対する作用機序の検討

記録は電位固定法で、電位依存性  $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬 (テトロドトキシン) 投与下に行った。保持膜電位を -70 mV とすることで微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic current, mEPSC) を、保持膜電位を 0 mV とすることで微小抑制性シナプス後電流 (miniature inhibitory postsynaptic current, mIPSC) を記録した。

$\text{H}_2\text{O}_2$  投与による mEPSC、mIPSC の頻度、振幅の変化を検討した。

#### 細胞興奮性に対する作用機序の検討

電流固定法で、-80 ~ 220 pA のステップパルス電流に対する膜電位の変化、活動電位 (AP) の発生頻度、振幅、rheobase (少なくとも一つの AP が発生する最も低い電流)、膜抵抗、後過分極電位 (AHP) などを解析した。

### (2) 脊髄損傷モデルラットを用いた実験

Wistar 系成熟ラット (雄、400 - 450 g) を用い、吸入麻酔薬 (イソフルレン) で全身麻酔下に皮膚切開し、第 8 胸椎および第 4 腰椎の椎弓を切除した。まず、第 4 腰椎高位で硬膜とくも膜を切開し、くも膜下カテーテルを留置した。次いで、第 8 胸椎高位で専用のデバイス (Infinite Horizons Impactor) を用いて 80 kilodynes の力で脊髄に圧挫を加え、不全脊髄損傷モデルを作成した。電気生理学的実験で ROS の興奮毒性に対する抑制効果を認めた N 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル阻害薬の一つであるジコノチド (ZIC) の脊髄保護効果をも膜下投与で検討した。対照群では溶媒のみ投与した。

運動機能を Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score で評価した。オープンフィールド上でのラットの行動を ZIC 群と対照群を識別できない状態で観察、評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 電気生理学的実験

#### シナプス伝達に与える影響

$\text{H}_2\text{O}_2$  を灌流投与すると、mEPSC の振幅は不変であったが、頻度は二相性の変化を示した。mEPSC の頻度は  $\text{H}_2\text{O}_2$  投与開始 2 - 5.5 分でコントロールの 163% に増加したが、その後は減少に転じ、 $\text{H}_2\text{O}_2$  投与終了後 10 分でコントロールの 52% に減少した。この結果は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  が興奮性シナプス前終末に直接作用し、グルタミン酸の放出に影響を与えていることを示している。シナプス前終末からの神経伝達物質放出確率は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存することが報告されており、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の作用機序に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化が関与しているかを検討した。 $\text{Ca}^{2+}$  を除去した ACSF を用いると、 $\text{H}_2\text{O}_2$  による mEPSC の頻度増加が抑制されたことから、シナプス前終末への  $\text{Ca}^{2+}$  流入増加が関与していることが判明した。電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (Voltage-gated calcium channel, VGCC) の各サブタイプの阻害薬を投与したところ、N 型 VGCC 阻害薬により  $\text{H}_2\text{O}_2$  による mEPSC の頻度増加は完全に抑制された。次に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵庫である小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出増加が関与しているかを検討するため、小胞体中存在するリアノジン受容体 (RyR) またはイノシトール 3 リン酸受容体 ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) に対する阻害薬をそれぞれ投与した。その結果、RyR 阻害薬では mEPSC の頻度増加が、 $\text{IP}_3\text{R}$  阻害薬で mEPSC の頻度増加と減少の両者が抑制された。以上から、 $\text{H}_2\text{O}_2$  は興奮性シナプス前終末に直接作用し、N 型 VGCC の活性化を介したシナプス前終末への  $\text{Ca}^{2+}$  流入、および RyR、 $\text{IP}_3\text{R}$  の活性化を介した小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出によりグルタミン酸の放出を増強することが示された (図 1A)。次に、 $\text{H}_2\text{O}_2$  投与による mEPSC 頻度減少の機序を検討したところ、 $\text{GABA}_A$  受容体阻害薬により抑制された。この結果は  $\text{H}_2\text{O}_2$  投与により抑制性神

経伝達物質である GABA が過剰に放出され、興奮性シナプス前終末の GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化によりグルタミン酸放出が減少している可能性を示唆している (図 1B)。

保持膜電位を 0 mV とし、グリシン受容体阻害薬を投与することで GABA 性 mIPSC を記録した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を投与すると、GABA 性 mIPSC の振幅は不変であったが、頻度はコントロールの 648% へ有意に増加し、投与終了後 10 分の時点でも頻度増加は持続していた (223%)。この変化は IP<sub>3</sub>R 阻害薬を投与することで抑制された。以上より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は抑制性シナプス前終末にも直接作用し、小胞体の IP<sub>3</sub>R の活性化を介して GABA 放出を増加させることが示された。この結果は IP<sub>3</sub>R 阻害薬で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による mEPSC の頻度増加および減少が抑制されたことに矛盾しない (図 1B)。

過剰に放出された GABA は興奮性シナプス前終末に作用してグルタミン酸の放出を抑制していたことから、「グルタミン酸毒性」に対する生体の防御機構と考えられる。従って、N 型 VGCC 阻害薬や RyR 阻害薬を用いることで、GABA による神経保護作用を損なうことなく、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるグルタミン酸の過剰放出を選択的に抑制することが可能となり、効率的な神経保護効果を期待できる。

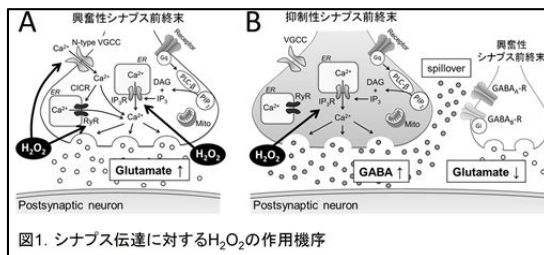


図 1. シナプス伝達に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の作用機序

### 細胞興奮性に与える影響

電流固定法でステップパルス電流を加えて細胞興奮性の変化を検討した (図 2)。膜抵抗 R<sub>in</sub> は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与によりコントロールの 79.5%±5.0% に

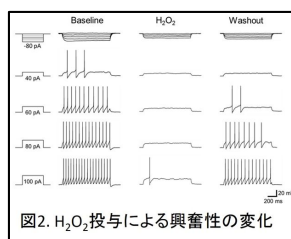


図 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与による興奮性の変化

有意に低下した。一方、rheobase は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与により有意に増加し (コントロール比 160.2%±18.5%)、AP 発生数も有意に減少した。AHP に関しては、medium および slow-AHP (mAHP, sAHP) の振幅は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与によりそれぞれコントロールの 89.8%±2.7%、30.5%±7.8% へ有意に減少したが、fast-AHP は有意な変化を認めなかった。

次に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与によるこれらの変化に GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化が関与しているか否かを検討するために、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害剤であるピククリン (BIC) 存在下に同様の実験を行った (図 3)。AP 発生数、R<sub>in</sub>、rheobase の変化は BIC 20 μM で抑制されず、BIC 40

μM で完全に抑制され、BIC 100 μM では AP 発生数、R<sub>in</sub> は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与により有意に増加し、rheobase は有意に減少した。

GABA<sub>A</sub> 受容体には、シナプス内に存在するシナプス内 GABA<sub>A</sub> 受容体とシナプス外に存在するシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体があり、後者は GABA に対してより高親和性であることが知られている。シナプス内 GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化を反映する GABA 作動性 sIPSC は

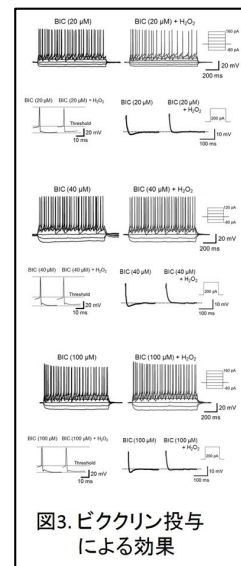


図 3. ピククリン投与による効果

BIC 20 μM で完全に抑制され、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与時も同様であった。前述の電流固定法での実験において、BIC 20 μM では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の作用を抑制できなかったことから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による興奮性や膜特性の変化にはシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体が関与していると考えられた。そこで、

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与によりシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化が増強しているか否かを検討するため、電位固定法 (保持膜電位 = 0

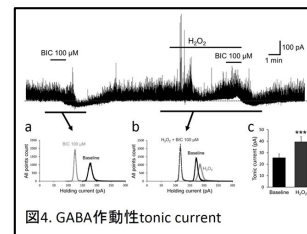


図 4. GABA 作動性 tonic current

mV) にて GABA 作動性 tonic current の変化を検討したところ、その振幅は 26.5±3.4 pA から 39.3±4.6 pA へと有意に増加した (図 4)。

以上より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は mAHP および sAHP を抑制することで細胞興奮性を増強させるが、過剰に放出された GABA によりシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体が活性化し、結果として細胞興奮性は低下していた。したがって、シナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体は ROS による興奮毒性に対する生体防御機構としての働きがあると考えられ、新たな治療標的となり得る。また、mAHP、sAHP 抑制機序に関しても今後更なる解析を行うことで、治療標的となり得ると考える。

### (2) 脊髄損傷モデルラットを用いた実験

BBB score を用いた運動機能評価では、ZIC 群 (n = 4)、対照群 (n = 4) とともに、損傷 4 時間後より後肢運動機能は改善傾向を認めた。各記録時点において対照群と ZIC 群の BBB

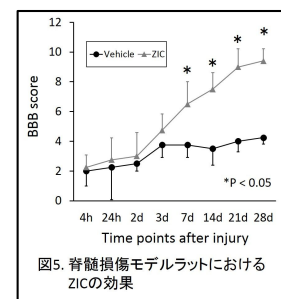


図 5. 脊髄損傷モデルラットにおける ZIC の効果

score を比較すると、脊髄損傷後 7 日以後で ZIC 群の BBB score が対照群と比較して有意に高かった。

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)

Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Shoji H, Ohashi N, Baba H, Endo N, Kohno T. Hydrogen peroxide modulates neuronal excitability and membrane properties in ventral horn neurons of the rat spinal cord. *Neuroscience* 2016;33:206-220 (査読有)

Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Katsumi K, Ohashi N, Baba H, Endo N, Kohno T. Hydrogen peroxide modulates synaptic transmission in ventral horn neurons of the rat spinal cord. *J Physiol* 2016;594:115-134 (査読有)

大橋正幸、河野達郎、平野徹、渡辺慶、大橋宣子、馬場洋、遠藤直人. 過酸化水素の脊髄前角ニューロンに対する作用の検討. *脊髄機能診断学* 2014;35:65-71 (査読有)

[学会発表](計 6 件)

大橋正幸、河野達郎、平野徹、渡辺慶、勝見敬一、遠藤直人. 過酸化水素の脊髄前角シナプス伝達に対する作用. 第 35 回脊髄機能診断研究会、東京商工会議所(東京都・千代田区) 2014.

大橋正幸、河野達郎、平野徹、渡辺慶、勝見敬一、遠藤直人. 脊髄前角細胞のシナプス伝達における酸化ストレスの影響 - patch-clamp 法による解析 -. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市) 2014.

Ohashi M, Kohno T, Endo N. Hydrogen peroxide-mediated modulation of synaptic transmission in rat spinal ventral horn neurons. 第 92 回日本生理学会大会、神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市) 2015.

Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Katsumi K, Endo N, Baba H, Kohno T. Hydrogen peroxide modulates synaptic transmission in ventral horn neurons of the rat spinal cord. *Society for Neuroscience 45<sup>th</sup> Annual Meeting, Chicago, USA, 2015.*

大橋正幸、平野徹、渡辺慶、庄司寛和、河野達郎、遠藤直人. 活性酸素は脊髄前角において N 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルの活性化を介してグルタミン酸放出を増強する. 第 45 回日本脊椎脊髄病学会学術集会、幕張メッセ(千葉県・千葉市) 2016.

大橋正幸、平野徹、渡辺慶、庄司寛和、河野達郎、遠藤直人. 活性酸素は脊髄前角において N 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルの

活性化を介してグルタミン酸放出を増強する. 第 89 回日本整形外科学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2016.

Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Shoji H, Ohashi N, Baba H, Endo N, Kohno T. Hydrogen peroxide modulates neuronal excitability and membrane properties in ventral horn neurons of the rat spinal cord. *Society for Neuroscience 46<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, USA, 2016.*

[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

大橋 正幸 (OHASHI Masayuki)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号: 70706720

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )