

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591818

研究課題名（和文） ミトコンドリアによる細胞内カルシウム緩衝作用と脳保護

研究課題名（英文） Brain protection through calcium buffering system in mitochondria

研究代表者

飯島 毅彦 (IIJIMA TAKEHIKO)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：10193129

研究成果の概要：

本研究では神経細胞において虚血耐性はいかに獲得されるかをミトコンドリアにおけるカルシウム緩衝能に注目して検討してきた。その結果、虚血耐性を獲得した神経細胞では、ミトコンドリアによるカルシウム緩衝能力が亢進していることが確認された。ミトコンドリアは fusion(融合)と fission(分裂)を起こしながら、細胞死を調節していることが近年注目されており、次にミトコンドリアの形態学注目し、超微構造の特徴を検討した。その結果、虚血耐性を示すものではミトコンドリアの内容物が増加し、管状のものが円形に変形してくるが見られた。一部のミトコンドリアでは内膜と外膜の断裂が見られ、ミトコンドリアの緩衝能の破綻した状態である mitochondrial permeability transition (mPT) の形態学的な現われだと考えられた。本研究で観察された現象も fusion fission の一形態と考えられ、今後この研究の方向性が見えてきた。虚血性神経細胞死を抑制する研究は、ミトコンドリアに働きかける細胞死調節にキーポイントがあるものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,117,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,497,000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：ミトコンドリア カルシウム 細胞死 アポトーシス 膜電位

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性神経細胞死を抑制あるいは予防する研究は、さまざまな観点から行われてきた。

興奮性アミノ酸によるミトコンドリアによる細胞死の制御機構の解明は、より理論的な神経細胞死のコントロールの方法を導き出すものとして注目されてきた。神経細胞死は

細胞内に  $Ca^{++}$  が流入することにより  $Ca^{++}$  依存性の protease などが活性化され、細胞死が起こる。しかし、単に細胞内  $Ca^{++}$  の増加が直ちに細胞死をもたらすわけではなく、細胞内  $Ca^{++}$  の増加はミトコンドリアにより取り込まれ、その緩衝作用により細胞内濃度の上昇を抑えて、急性の細胞死 (necrosis) へのステップに歯止めをかけている。一方、ミトコンドリアは apoptosis 関連タンパクの放出をコントロールし、必要に応じて apoptosis へのステップを開始させる指令器官でもある。免疫抑制薬であるサイクロスポリン A (CsA) の神経保護作用はミトコンドリアで発生する  $Ca$  イオンの放出をコントロールするものであり、理論的にもより裏づけの薬剤であるといえる。しかしながら、CsA による細胞保護作用の応用はミトコンドリアをターゲットにした薬剤の端緒に過ぎなかった。ミトコンドリアの細胞死調節機構のうち細胞内カルシウムの上昇を緩衝する作用を検討することが重要であるとの認識から、ミトコンドリアにおける細胞内カルシウム濃度緩衝作用に注目した研究を推進することとなった。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアによる細胞内  $Ca^{++}$  緩衝作用のメカニズムをさらに明らかにするとともに、引き続き起こる細胞死との関係を検討する。細胞内  $Ca^{++}$  緩衝作用は、これまでの検討で、ミトコンドリア膜電位の過分極が細胞内  $Ca^{++}$  濃度を上昇させる原動力になりうることを示してきた。これまで整備してきた蛍光画像測定装置が同時に 2 波長の蛍光を解析することができるため、ミトコンドリア膜電位とミトコンドリア内  $Ca^{++}$  濃度を同時に評

価できる。この実験系を確立し、膜電位とミトコンドリアによる  $Ca^{++}$  緩衝作用との関係を明らかにする。さらに近年注目されているミトコンドリアの fusion, fission の現象と細胞死の関連を超微構造を観察することにより明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 基本的設定

初代ラット海馬培養細胞を 35mm ディッシュに調整する。グリア細胞の増殖を防ぐために AraC を培養初期に加えたものを使用する。この条件は過去 6 年にわたり使用してきたものであり (Brain Res, 2003 993: 140-145 Neurochem Int. 2003 43(3):263-269)、30 分の OGD (無酸素無糖培養) にて apoptosis を起こし、120 分の OGD にて necrosis を起こすものである。この条件にて 1-2 週間培養し、ネットワークの確立したものをを用いる。

### (2) ミトコンドリア膜電位の評価

ミトコンドリア膜電位は電位依存性色素 TMRE にて蛍光強度の変化により定量化する。Oligomycin 負荷により、脱分極したときの蛍光強度を 0 mV とし、なんら負荷をしていないものをコントロールとし、Nernst の式により膜電位を評価する。

### (3) グルタミン酸による $Ca^{++}$ 負荷試験による細胞内およびミトコンドリア内 $Ca^{++}$ 濃度の評価

細胞内  $Ca^{++}$  濃度は蛍光色素である fluo-3 を用い、ミトコンドリア内  $Ca^{++}$  濃度は rhod-2 を用いる。それぞれ細胞内に取り込まれる AM 体を使用する。2  $\mu$ M に調整し、20 分の負荷後洗浄し使用する。グルタミン酸負荷による  $Ca^{++}$  負荷を行う。ディッシュ内濃度を 0.2mM になるようにグルタミン酸をディッシュに

注入する。5 秒間隔でそれぞれの蛍光を撮影する。シャッターのコントロールは Luminavision にて行う。同じ細胞から異なる蛍光を交互に撮影するためにフィルターエクスチェンジャーを用いる。約 5 分間の撮影を行い、両者の蛍光強度の変化より細胞内 Ca<sup>++</sup>濃度の上昇に対し、ミトコンドリアによる緩衝作用がどの程度機能しているかを明らかにする。これを 30 分 OGD, 120 分 OGD のモデルで行うことにより 30 分 OGD によりミトコンドリアによる Ca<sup>++</sup>緩衝作用の変化があるかを観察する。

#### (4) 超微構造の観察

30 分 OGD、120 分 OGD モデルを 2.5% グルタルアルデヒドで固定し、超微構造を観察する。Fusion および fission の現象が起きているかどうか形態学的な違いを検討する。

#### 4. 研究成果

本研究では神経細胞において虚血耐性はいかに獲得されるかをミトコンドリアにおけるカルシウム緩衝能に注目して検討してきた。その結果、虚血耐性には、ミトコンドリアによるカルシウム緩衝能力が亢進していることが示された。さらに、超微構造の特徴を検討したところ、虚血耐性を示すものではミトコンドリアの内容物が増加し、管状のものが円形に変形してくるが見られた。一部のミトコンドリアでは内膜と外膜の断裂が見られ、ミトコンドリアの緩衝能の破綻した状態である mitochondrial permeability transition (mPT) の形態学的な現われだと考えられた。ミトコンドリアは fusion (融合) と fission (分裂) を起こしながら、細胞死を調節していることが近年注目されており、本研究で観察された現象も fusion fission の

一形態と考えられ、今後この研究の方向性が見えてきた。虚血性神経細胞死を抑制する研究は、ミトコンドリアに働きかける細胞死調節にキーポイントがあるものと考えられる。

#### 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 2 件)

- ① Tanaka K, Iijima T, Mishima T, Suga K, Akagawa K, Iwao Y Ca<sup>2+</sup> buffering capacity of mitochondria after oxygen-glucose deprivation in hippocampal neurons Neurochemical Research 2008, 34(2):221-6. 査読有
- ② Iijima T, Tanaka K, Matsubara S, Kawakami H, Mishima T, Suga K, Akagawa K, Iwao Y, Calcium loading capacity and morphological changes in mitochondria in an ischemic preconditioned model Neuroscience Lett 2008, 448(3): 268-72 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Iijima T, Tanaka K, Matsubara S, Kawakami H, Mishima T, Suga K, Akagawa K, Iwao Y, Calcium loading capacity and morphological changes in mitochondria in an ischemic preconditioned model Keystone Symposia “Mitochondrial dynamics and Physiology”, March 24, 2009, Whistler, Canada
- ② 飯島毅彦 シンポジウム ミトコンドリア膜電位による細胞内カルシウム緩衝作用の調節と神経細胞死 日本蘇生学会 岡山 平成 19 年 10 月 6 日

- ③ Tanaka K, Iijima T, Mishima T, Suga K, Akagawa K, Ca<sup>++</sup> buffering capacity of mitochondria after oxygen glucose deprivation in hippocampal neuron Annual meeting of American Society of Anesthesiologists, San Francisco, Oct. 13 2007.

[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]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯島 毅彦 (IIJIMA TAKEHIKO)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号：10193129

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

三嶋 竜弥 (MISHIMA TATSUYA)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号：30306675

須賀 圭 (SUGA KEI)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号：40317095