

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791008
 研究課題名（和文） ペナンプラ領域におけるグルタミン酸再吸収に関わるギャップジャンクションの働き
 研究課題名（英文） The role of gap junction for glutamate re-uptake in penumbral region

研究代表者
 田村 健太郎 (TAMURA KENTARO)
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00423913

研究成果の概要：脳梗塞周辺のペナンプラ領域において発生するスプレディング・デプレッションは神経細胞損傷を増悪させる。ラット脳皮質静脈閉塞モデルを用いペナンプラ類似領域を作成し、ギャップジャンクションブロッカーを投与後、スプレディング・デプレッションを発生させると、発生する静脈梗塞が拡大した。これはペナンプラ領域においてギャップジャンクションはスプレディング・デプレッションに対して細胞保護的に働いていることを示す。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000		1,400,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：ペナンプラ，スプレディング・デプレッション，静脈梗塞

1. 研究開始当初の背景

発生した脳梗塞に対する治療の基本は、虚血の核の周囲に広がるペナンプラ領域における神経細胞死をできるだけ抑制することにある。これまで我々は、ラット皮質静脈閉塞モデルを用い、ペナンプラ類似領域における神経細胞死の病態につき様々な知見を重ねてきた。ラット大脳の隣接する 2 本の皮質静

脈を閉塞すると、その静脈に挟まれた領域の脳皮質血流量は正常血流量の 50% 程度に減少し、比較的長期間その状態が持続する。脳皮質に塩化カリウムを投与することでコルチカル・スプレディング・デプレッションを発生させると、そのエネルギー需要のため、皮質血管が拡張し脳血流が増加するが、閉塞静脈に挟まれた領域ではその増加を認めな

い。これは皮質血管が最大に近い拡張をしているという証拠となり、その領域が動脈梗塞におけるペナンプラと同等の領域であると考えられる。また経時的な脳血流の測定では、静脈閉塞後少なくとも2時間はその低血流が維持されており、動脈閉塞に比較してより長時間のペナンプラ領域を得ることができる。脳梗塞により神経細胞死が発生すると、細胞膜の崩壊により多量のカリウムが細胞外液に流出する。その過剰のカリウムによってスプレディング・デプレッションが発生し、ペナンプラ領域におけるエネルギー需要の増大を引き起こすことで、エネルギー供給が十分で無い神経細胞が死に至ることが明らかにされている。われわれの静脈閉塞モデルを用いた検討においても、人為的に発生させたスプレディング・デプレッションは閉塞5日後の脳梗塞体積を増大させることが示されている。また、スプレディング・デプレッション発生時には大量のグルタミン酸が神経細胞終末から放出され、暴露された神経細胞のアポトーシスを導入すると言われているが、われわれのモデルにおいてもスプレディング・デプレッション負荷4日後の摘出脳組織のTUNEL染色により脳梗塞周囲のアポトーシスの増加が示されており、このモデルのペナンプラモデルとしての有用性は高いと考える。最近、われわれはこのモデルを用いて、スプレディング・デプレッション発生時の細胞外グルタミン酸濃度の上昇をマイクロダイアリースを用いて測定し、KATPチャネル阻害剤であるジアゾキサイドが過剰のグルタミン酸放出を抑制することを示唆する結果を得た。今回われわれが行う研究では、放出されたグルタミン酸が細胞外において再吸収される機構に注目し、とくにアストロサイトのギャップジャンクションがグルタミン酸の再吸収にどう作用し、脳

梗塞の進展に対しどのような作用を持つのかを明らかにしたいと考えている。

アストロサイトと神経細胞をともに培養し、大量のグルタミン酸に暴露させると、神経細胞死が導入されるが、大量グルタミン酸と同時にギャップジャンクションブロッカーであるカルベノキソロンを投与すると、その神経細胞死は増加するという研究結果が報告されている。つまり、ギャップジャンクションブロッカーはグルタミン酸の再吸収を阻害し、神経細胞の障害を増加させることを示唆するが、逆に、別のギャップジャンクションブロッカーであるオクタノールを投与した中大脳動脈閉塞ラットは、対照群に比較して梗塞体積が減少したという報告がなされている。この報告においては、オクタノールがスプレディング・デプレッションを抑制し、その結果梗塞体積が減少したと考察されている。

このように、これまで脳虚血にかかわるギャップジャンクションの働きを検討した報告は多数あるが、脳虚血時におけるギャップジャンクションは神経細胞保護的に働くのか、逆に神経傷害的に働くのかは、特に *in vivo* においては議論の分かれるところであるが、これまでペナンプラ領域におけるギャップジャンクションの役割を検討した報告は少なく、われわれの静脈閉塞モデルを用いることで、それを明らかにすることができ、あらたな脳梗塞治療の基礎理論を立てることができると考えている。

2. 研究の目的

この研究では、アストロサイトのギャップジャンクションが細胞外グルタミン酸の再吸収にどう作用し、脳梗塞進展に対しどのような作用を持つのかを明らかにする。具体的には、皮質静脈閉塞モデルを用い、選択的ギャ

ップジャンクションブロッカーであるカルベノキソロンを脳室内投与し、ペナンプラ領域で発生させたスプレディング・デプレッションに対する効果、および静脈梗塞拡大に対する効果を検討し、さらにスプレディング・デプレッション発生時にマイクロダイアリースを用いた細胞外グルタミン酸濃度の測定を行い、ペナンプラにおける虚血あるいはグルタミン酸毒性に対するギャップジャンクションの役割について新しい知見を得る。

3. 研究の方法

雄 Wistar ラットを用いる。抱水クロラールで麻酔下に気管内挿管を行い、人工呼吸管理を行う。尾動脈を確保し持続的に平均血圧を測定し、薬剤投与路として左大腿静脈を確保する。左頭頂開頭を行い、マイクロダイアリースのプローブ（膜長 2mm）を、脳表の隣接する 2 本の皮質静脈の間に留置し（半透膜全体が皮質内に留置できるように、水平に近い角度でマイクロマニピレーターを用いて留置する）、次いでローズベンガルを静脈内投与し、光凝固法で閉塞させる。次いで右側脳室にカルベノキソロン 50 マイクログラムあるいは生理食塩水を投与し、同時にあらかじめ脳皮質に留置しておいたガラスピペットから 150 マイクロモル/リットルの塩化カリウムを投与して、スプレディング・デプレッションを発生させる。スプレディング・デプレッションの発生は、皮質インピーダンスの測定によって確認する。7 分毎に同様に塩化カリウムを投与し、合計 10 回のスプレディング・デプレッションを発生させ、また同時に脳血流を経時的に測定する。マイクロダイアリースプローブ内に、2ml/分で人工髄液を灌流させ、7 分毎にサンプルを回収し、HPLC を用いてグルタミン酸濃度を

測定する。

手技終了後閉創し、7 日後に脳を灌流固定して、組織学的に梗塞体積を比較する。

4. 研究成果

ペナンプラ領域におけるギャップジャンクションの役割はほとんど解明されておらず、ギャップジャンクションが細胞保護的に働くのか、細胞傷害的に働くのかは議論が分かれている。本研究は現在進行中であり、以下にこれまでに自ら行ってきた研究結果を述べる。以下の 4 点が明らかになった。カルベノキソロンを、静脈閉塞を行っていないラットに脳室内投与すると、1) 組織学的な脳損傷は発生しない。2) 脳血流が増加するが代謝の増加を伴わない (animal PET による評価を行った)。3) スプレディング・デプレッションの発生は抑制されず、逆に発生頻度は増加した。4) スプレディング・デプレッションの伝播速度が増加した。5) 7 日後の静脈梗塞が有意に増加した ($3.59 \pm 0.43 \text{ mm}^3$ 対 $1.63 \pm 0.29 \text{ mm}^3$)。1), 2) の結果から、カルベノキソロンそれ自体では脳代謝亢進作用や細胞傷害作用を持たず、われわれのペナンプラモデルにおける梗塞体積の増加は、ギャップジャンクションをブロックする働きを反映し、その評価が可能であると考え。また、アストロサイトはギャップジャンクションによって合胞体をつくり細胞外におけるカリウムイオンなどのバッファリングの役割を担うと考えられており、3), 4) の結果はこの考えに合致する。アストロサイトがグルタミン酸に対しても同様のバッファリング・再吸収機能を持つとすれば（これはマイクロダイアリースを用いたグルタミン酸濃度の測定によって明らかになると考えるが、現在結果を解析中である）、われわれの静脈閉塞モデルで梗塞体積が大きくなるという結果は、その考えの傍証となると考

える。加えて、これまで報告されたギャップジャンクションブロッカーを用いた研究結果のうち、ブロッカーが細胞保護的に働いたとする報告においては、ブロッカーがスプレディング・デプレッションを抑制することがその機序であると結論するものが多いが、3)の結果によってすくなくともカルベノキソロンはスプレディング・デプレッションの抑制作用がなく、この機序による梗塞増大を抑制する効果がないことが判明した。

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)

[学会発表] (計 3件)

- 1) Glial gap-junctions in the rat brain :
Are they essential for brain function during brain ischemia ?
Tamura K., Tamaki R., Nakase H., Sakaki T., Alessandri B., Heimann A., Kempinski O.
The 23rd International Symposium on Cerebral Blood flow, Metabolism and Function & The 8th International Conference on Quantification of Brain Function with PET Osaka 2007.5.24
- 2) Novel neuroprotectivtice approaches in experimental model of cerebral venous infarction.
Nakase H., Tamura K., Tamaki R., Nishioka T., Kimura R., Sakaki T., Heimann A., Kempinski O.
The 23rd International Symposium on Cerebral Blood flow, Metabolism and Function & The 8th International Conference on Quantification of Brain Function with PET Osaka 2007.5.24
- 3) Neuroprotection in experimental model of cerebral venous infarct.
Nakase H., Tamura K., Tamaki R., Nishioka T., Kimura R., Sakaki T., Heimann A., Kempinski O.
The 2nd Meeting of Asian Stroke Forum Kyoto 2007.9.27

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 健太郎 (TAMURA KENTARO)

奈良県立医科大学・医学部・脳神経外科学・助教

研究者番号 : 00423913

(3)連携研究者

中瀬 裕之 (NAKASE HIROYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 10217739