

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591415

研究課題名(和文) シスチン・グルタミン酸交互輸送体機能障害による海馬酸化ストレス増強機序の解明

研究課題名(英文) Dysfunction of cystine/glutamate antiporter system in the hippocampus of epileptic rats

研究代表者

土井 拓 ( DOI TAKU )

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70274793

研究成果の概要(和文): 中枢神経疾患において細胞外グルタミン酸濃度上昇や抗酸化能低下の関連が示唆されている。今回、我々はラット海馬で細胞外グルタミン酸濃度上昇が抗酸化能低下をもたらすことを示した。また、鉄塩誘導てんかんモデルラットでは鉄塩注入 30 日後に鉄塩注入側海馬で抗酸化物質のグルタチオン産生に欠かせないシスチンを輸送するシスチン・グルタミン酸交互輸送体の mRNA 発現低下が認められた。併せて、鉄塩注入てんかんモデルラット海馬では抗酸化能が低下していることが確認された。グルタミン酸トランスポーターは酸化状態下では機能低下することが知られている。鉄塩注入てんかんモデルラット海馬では抗酸化能が低下し、抗酸化能低下は細胞外グルタミン酸濃度上昇に結びつき、細胞外グルタミン酸濃度上昇は抗酸化能低下をまねくという悪循環によって、てんかん原性が獲得されていくのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文): Animals were injected 3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (PCAM) and the nitroxide radicals were measured with microdialysis technique and an ESR analysis in the hippocampus. The antioxidant effect was measured to monitor sequential changes in the signal amplitude of nitroxide radical in the dialysate of both glutamate transporter inhibitor L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylic acid (L-trans PDC) and control animals. The pattern showed exponential decay with median half-life of the nitroxide radical took significantly longer in the L-trans PDC group. And we performed qualitative analysis of redox state and cystine/glutamate exchanger (xCT) mRNA expression in the interictal state in the hippocampus of Fe<sup>+++</sup>-induced epileptic rats. The expression of xCT mRNA in the ipsilateral hippocampus of Fe<sup>+++</sup>-induced rats was decreased compared with controls. The half-life of nitroxide radical in Fe<sup>+++</sup> group was statistically longer than that of control. The oxidative stress induced by the increased extracellular glutamate level through the suppression of glutamate transport activity results from transporters having a SH-redox modulatory site that is vulnerable to endogenous oxidants. Less cystine uptake induced by reduced xCT and increased extracellular glutamate leads to diminish of antioxidant glutathione, as a result reduces anti-oxidant ability. We conclude that collapse of glutamate regulation and antioxidant ability may be fundamental to Fe<sup>+++</sup>-induced epileptogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学  
キーワード：てんかん、グルタミン酸、酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

脳組織をはじめ生体は Vitamin E-C 系や還元型グルタチオン (GSH) -酸化型 (GSSG) 系などの抗酸化物質を備えており、酸化と還元間に「レドックス」という均衡系が存在するため、多少の酸化ストレスでは障害を来さない。しかし精神神経病態下においては酸化ストレスが様々な角度から関与していることが推測されている (Halliwell, 2006)。

1992 年にグルタミン酸トランスポーター (EAATs) がクローニングされ精神神経疾患における同蛋白の役割が議論されてきた。てんかんモデルにおける EAATs 発現低下 (Ueda et al., 2000)、その他、脳虚血・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症など精神神経病態では EAATs の発現低下・機能障害による細胞外グルタミン酸濃度 ( $\{GLU\}_o$ ) 上昇が報告されている (Campiani et al., 2003)。中枢神経疾患における  $\{GLU\}_o$  上昇と抗酸化能低下についての関連が示されている。中枢神経疾患では  $\{GLU\}_o$  上昇によってグルタミン酸受容体が賦活、phospholipase A2 (PLA2) と nitric oxide synthase (NOS) が活性化され、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) や一酸化窒素 (NO) など様々な酸化物質が産出される一方で、生体内抗酸化能力が慢性的に減弱しレドックスが崩壊する結果、海馬を中心とした辺縁系に選択的遅発性細胞壊死が漸次進行すると考えられる (Chinopoulos et al., 2006)。

また一方、グルタチオン (GSH) は Vitamin C/E などと異なり、生体内で合成される重要な抗酸化物質である。その GSH 生成の基質となるシステチンを取り込む機能を持っているシステチン・グルタミン酸アンチポーター (xCT) は多選択性アミノ酸トランスポーターファミリーで、 $Na^+$  非依存性・酸性アミノ酸輸送系 xc<sub>1</sub> に属し、システチンの細胞内への取り込みをグルタミン酸の濃度勾配を利用して行う交互輸送体である (Kim et al., 2001)。様々な中枢疾患では EAATs の機能不全により  $\{GLU\}_o$  が上昇し、細胞内外のグルタミン酸濃度勾配が消失、その結果抗酸化能維持にとって重要な xCT システムの機能不全がもたらされることが推定されている (Lewerenz et al., 2006)。

### 2. 研究の目的

ネクローシス/アポトーシス誘導促進因子の増強と xCT システム機能障害との関連研究は、これまでは培養細胞系を用いたものである (Lewerenz et al., 2006)。今回、我々は無麻酔・自由行動条件下のラット脳内で細胞外グルタミン酸濃度上昇酸化物質の産生・増加と抗酸化能力の低下を検証し、従来のグルタミン酸神経細胞興奮毒性仮説を補強することを目的に実験を行った。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1.

#### 1-1. 実験動物

雄性 Wistar ラット (体重 200-250 g) を用いた。pentobarbital 麻酔下に定位脳手術 (bregma から後方 5.6 mm、右に 5 mm) で右海馬腹側部灌流目的であるマイクロダイアリース用のガイドカニューレを植え込み、5 日間の回復期を設けた後、マイクロダイアリース probe を急性留置した。probe 留置後 2 時間の人工脳脊髄液の灌流を行ったのち以下のような操作を行った。

#### 1-2. L-trans PDC 灌流下におけるフリーラジカルの測定

人工脳脊髄液と spin trap 剤 150 mM -(4-pyridyl-N-oxide)-N-tert-butyl nitron (POBN) を灌流した群 (n = 6) とそれらに 60 分 1 mM L-trans PDC を加え灌流した群 (n = 6) との 2 群を設けた。灌流液を electron spin resonance (ESR) のレゾネーターに直接誘導し、L-trans PDC 投与による急性 xCT システム機能障害モデルにて生じるフリーラジカルの経時的变化をオンラインで観測した。ESR 計測には RE-1X、日本電子を用い、信号強度 (低磁場側のスペクトルのピーク長) の時間変化を記録した。ESR 測定条件は次の通りである。microwave power 4 mW, microwave frequency 9.42 GHz, static magnetic field 335.3 mT, modulation width 0.125 mT, sweep width 1.1 mT, sweep speed = 0.2 mT/min, gain = 2500 ×。

#### 1-3. L-trans PDC 灌流下における抗酸化能測定

EAATs の機能抑制が起こり  $\{GLU\}_o$  濃度が上昇することが知られている。人工脳脊髄液のみ灌流した群 (n = 6) と人工脳脊髄液に L-trans PDC を加えた群 (n = 6) の 2 群を設けた。プローブ留置後 2 時間人工脳脊髄液で灌流し、L-trans PDC 群は L-trans PDC の灌流から 10 分後に、血液脳関門透過性ニトロキシドラジカルである 3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (PCAM) を 0.4 mmol/kg の用量で腹腔内投与し、脳内微小透析法から回収される灌流液を ESR の共振器に直接誘導し、PCAM の減衰速度から脳内抗酸化能を評価した。コントロール群は L-trans PDC を含まない人工脳脊髄液を灌流し PCAM を腹腔内に投与した。ESR 測定条件は以下の通りである。Microwave power 4 mW, microwave frequency 9.42 GHz, static magnetic field 3294 G, modulation width 1 G, sweep width 8.5 G, sweep speed = 3.2 G/min, gain = 40 ×。

#### 実験 2.

##### 外傷性てんかんモデルの作製

250 - 280 g の雄性 Wistar 系ラットに

pentobarbital 麻酔下、定位的に右扁桃体に 100 mM FeCl<sub>3</sub> 1.0 μl を注入した。対照群には鉄塩と同じ pH 2.2 に調製した 0.9% NaCl 水溶液 1.5 μl を右扁桃体に注入した。

### 外傷性てんかんモデルラットにおける xCT mRNA 発現解析

鉄塩注入から 30 日後に両側海馬を摘出した。対照群は pH 2.2 NaCl 水溶液注入から 30 日後に両側海馬を摘出した。TRIzol (invitrogenTM, USA) を用いて total RNA を抽出し、1000 ng total RNA を鋳型に逆転写反応を行い、cDNA を獲得した。primer として Forward CCTGGCATTGGACGCTACAT、Reverse TCAGAATTGCTGTGAGCTTGCA (Tomi et al, 2002) を用いて real-time PCR を施行した。内部コントロールとして glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

### 外傷性てんかんモデルラットにおける抗酸化能測定

鉄塩あるいは対照液注入から 55 日後に pentobarbital 麻酔下に定位的に右海馬を灌流するためのガイドカニューレを植え込んだ。5 日間の回復期をおいた扁桃体注入から 60 日後にマイクロダイアリース probe を急性留置した。probe 留置後 2 時間の人工脳脊髄液の灌流を行った。PCAM (2 mmol/kg) を腹腔内投与し、脳内微小透析法から回収される灌流液を ESR の共振器に直接誘導し、PCAM の減衰速度から脳内抗酸化能を評価した。ESR 測定条件は以下の通りである。Microwave power 4 mW, microwave frequency 9.42 GHz, static magnetic field 3310.5 G, modulation width 1 G, sweep width 8.5 G, sweep speed = 3.2 G/min, gain = 40 ×。

## 4. 研究成果

### 実験 1.

#### L-trans PDC 灌流下におけるフリーラジカルの測定 (図 1)

##### 【結果】

L-trans PDC 灌流群では L-trans PDC 灌流 20 分から 50 分後にかけて 30 分後にピークのある内因性の脂肪酸ラジカル上昇が認められた。

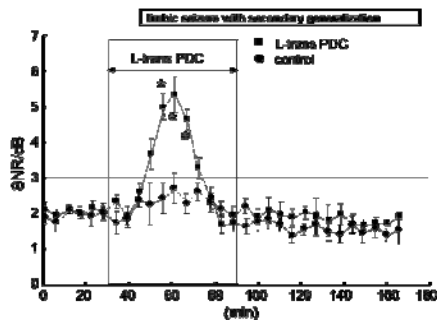


図 1. L-trans PDC 灌流に伴う ESR 信号強度の変化

1. A statistical analysis was carried out using a two-way (GROUP × TIME - COURSE)

ANOVA with repeated measures followed by Fisher's Protected LSD. The data were considered to be significant at the level of  $P < 0.05$ . \* $P < 0.01$  data from 1 mM L- trans PDC perfusion compared to the corresponding value of the control.

### L-trans PDC 灌流下における抗酸化能測定 (図 2)

PCAM 投与後、右腹側海馬の灌流液における PCAM は指数関数的に減衰し、減衰のパラメータとして半減期を用いた。L-trans PDC 群の半減期は  $17.419 \pm 3.299$  分、コントロール群は  $9.582 \pm 3.001$  分で有意に L-trans PDC 群で延長していた。

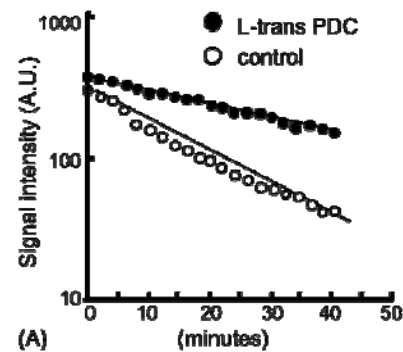
### 実験 2

#### 外傷性てんかんモデルラットにおける xCT mRNA 発現変化 (図 3)

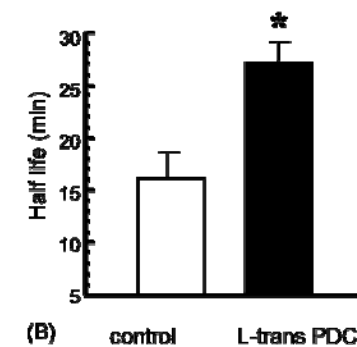
外傷性てんかんモデルラットで鉄塩注入から 30 日後の xCT mRNA 発現量は鉄塩注入側である右海馬でコントロール群と比較して有意に発現が低下していた。対側では有意な発現変化はみられなかった。

#### 外傷性てんかんモデルラットにおける抗酸化能 (図 4)

PCAM 投与後、右腹側海馬の灌流液における PCAM は指数関数的に減衰し、減衰のパラメータとして半減期を用いた。外傷性てんかんモデル群の半減期は  $35.02 \pm 4.78$  分 (mean ± SEM)、コントロール群は  $19.52 \pm 3.67$  分と有意に外傷性てんかんモデル群で延長していた。



(A)



(B)

control L-trans PDC

図2. PCAM投与後の海馬灌流液のL-trans PDC灌流群とコントロール群におけるESR信号強度の経時的変化 (A)とその半減期 (B) Each column represents the mean + S.E. value of half-life for each group (B). The difference in the values between the control and L-trans PDC group was significant (Mann-Whitney U-test, \*p < 0.01).

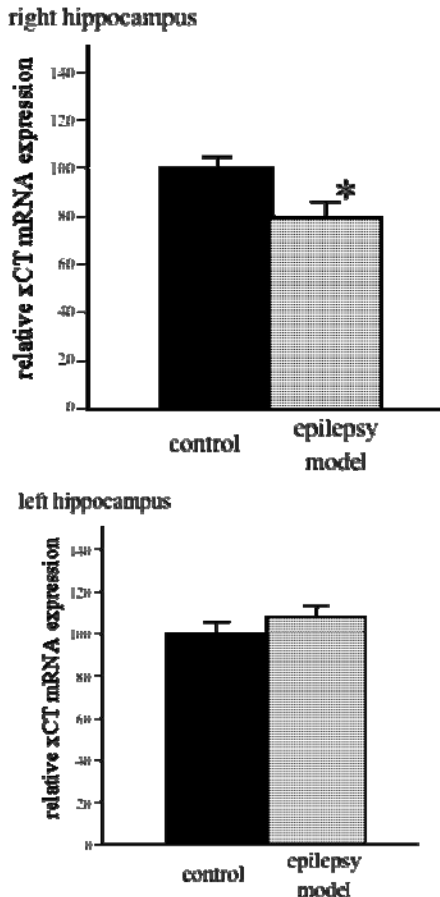


図3. 鉄塩誘導てんかんモデルラット海馬におけるxCT mRNA発現変化 Data represent the mean + SEM. \*p < 0.05 compared with rt. hippocampus of control animals. Significant different was calculated by Student's t-test.

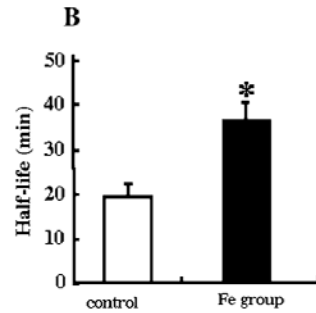
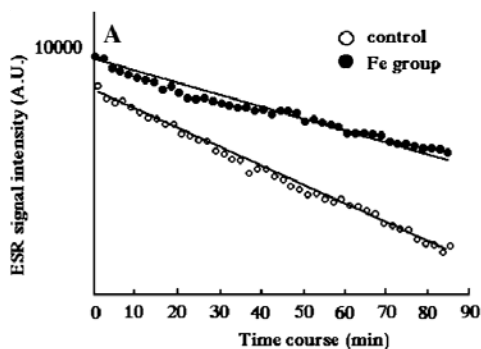


図4. PCAM投与後の海馬灌流液のコントロール群と鉄塩てんかんモデル群におけるESR信号強度の経時的変化 Aとその半減期 B Data represent the mean + SEM. \*p < 0.05 compared with controls. \*P < 0.01 by Mann-Whitney U test.

### 【考察】

実験 1 から EAATs の阻害薬である L-trans PDC の灌流によって脂肪酸ラジカルの生成がもたらされることが、抗酸化能が減弱することが示された。L-trans PDC 投与によって EAATs の機能が阻害され、細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、グルタミン酸受容体が賦活され、phospholipase A2 (PLA2) と nitric oxide synthase (NOS) が活性化、スーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)や一酸化窒素(NO)など様々な酸化物質が産出される (Chinopoulos et al., 2006)。またこれと同時に細胞外グルタミン酸濃度上昇は xCT の機能不全をもたらすとされる。xCT は GSH の産生に重要なシステインの取り込みをグルタミン酸の濃度勾配を利用して行う交互輸送体である。グルタミン酸トランスポーター (EAATs) の機能不全により細胞外グルタミン酸濃度が上昇し細胞内外のグルタミン酸濃度勾配が消失し、xCT システムの機能不全がもたらされ、システインの取り込み、GSH 産生が障害されるとされている (Lewerenz et al., 2006)。グルタミン酸トランスポーターの機能低下によって生体内、無麻酔行動下の動物で抗酸化能低下が示された。

実験 2 からは外傷性てんかんモデルにおいて抗酸化能が減弱していることが見いだされた。グリアに存在するグルタミン酸トランスポーターは少なくとも 60~80% のグルタミン酸再吸収を担うとされる (Rothstein et al., 1996)。我々は外傷性てんかんモデルにおけるグリア型のトランスポーターである GLAST 発現低下 (Ueda et al., 2000) を報告した。また、カイニン酸誘導てんかんモデルにおいて GLAST, GLT-1 発現低下が観察された (Ueda et al., 2001)。グルタミン酸トランスポーターの発現低下はグルタミン酸再吸収低下、細胞外グルタミン酸濃度上昇に結びつき、実験 1 と同様の機序で抗酸化能が低下するものと考えられる。また、グルタミン酸トランスポー

ーには酸化還元状態で影響を受ける SH 基が存在し、酸化状態下では輸送機能低下を来す (Trotti et al., 1997)。グルタミン酸トランスポーター発現低下は抗酸化能を低下させ、酸化状態を作り、それがグルタミン酸トランスポーターの機能を低下させ、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させる。またそれが更に抗酸化能を低下させるという悪循環が存在するものと考えられる。鉄塩注入側海馬では注入 30 日後に xCT mRNA の発現が低下していた。細胞外グルタミン酸濃度上昇は xCT の機能不全をもたらすが、xCT 発現も低下していると考えられた。

外傷性てんかんモデルにおける抗酸化能低下、グルタミン酸再取り込み低下などがてんかん原性獲得に結びついていくものと考えられた。

【文献】Campiani G, Fattorusso C, De Angelis M, Catalanotti B, Butini S, Fattorusso R, Fiorini I, Nacci V, Novellino E (2003) Neuronal high-affinity sodium-dependent glutamate transporters (EAATs): targets for the development of novel therapeutics against neurodegenerative diseases, *Curr Pharm Des.* 9, 599-625.  
Chinopoulos C, Adam-Vizi V (2006) Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme, *FBES J.* 273, 433-450.  
Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?, *J Neurochem.* 97, 1634-1658  
Kim JY, Kanai Y, Chairoungdua A, Cha SH, Matsuo H, Kim DK, Inatomi J, Sawa H, Ida Y, Endou H (2001) Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells, *Biochim Biophys Acta.* 1512, 335-344.  
Lewerenz J, Klein M, Methner A (2006) Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc<sup>-</sup> protects from oxidative glutamate toxicity, *J Neurochem.* 98, 916-925  
Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate, *Neuron.* 16, 675-686.  
Trotti D, Nussberger S, Volterra A, Hediger MA (1997) Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1, *Eur J Neurosci.* 9, 2207-2212.  
Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Yokoyama H, Nakajima A, Mitsuyama Y, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H, Willmore LJ

(2001) Collapse of extracellular glutamate regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of glutamate transporter function in rats with chronic seizures induced by kainic acid, *J Neurochem.* 76, 892-900  
Ueda Y, Willmore LJ (2000) Sequential changes in glutamate transporter protein levels during Fe<sup>3+</sup>-induced epileptogenesis, *Epilepsy Res.* 39, 201-209

## 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)

Ueda Y, Doi T, Takaki M, Nagatomo K, Nakajima A, Willmore LJ (2009) Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: in vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. *Brain Res.* 1266, 1-7, 査読有  
Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, Willmore LJ (2009) Role of Glutamate and GABA Transporters in Development of Pentylentetrazol-Kindling, *Neurochem Res.* 34, 1324-1331, 査読有  
Doi T, Ueda Y, Takaki M, Willmore LJ (2011) Differential molecular regulation of glutamate in kindling resistant rats, *Brain Res.* 1375, 1-6, 査読有

### [学会発表](計 10 件)

土井 拓、植田 勇人、高木麻夕子、PTZによるキンドリング完成群と非完成群におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの発現比較、第42回日本てんかん学会、2008年10月19日(東京)  
植田 勇人、土井 拓、長友慶子、高木麻夕子、中島 暉、レベチラセタムの脳内抗酸化能増強効果に起因する神経細胞保護作用の基礎研究、第42回日本てんかん学会、2008年10月19日(東京)  
Ueda Y, Doi T, Chihara Y, Nakajima A, Willmore LJ, Neonatal hypoxic-ischemic injury results in sensitivity to seizures and down-regulation of antioxidant ability in mature rats, American Epilepsy Society Annual Meeting, 2009年12月7日(米国ボストン)  
Doi T, Ueda Y, Takaki M, Chihara Y, Willmore LJ, Differential molecular regulation of glutamate in kindling resistant rats, American Epilepsy

Society Annual Meeting, 2009年12月7日 (米国ボストン)  
Chihara Y, Ueda Y, Doi T, Willmore LJ, Differential latency between glutamate and GABA release with seizures induced by NMDA, American Epilepsy Society Annual Meeting, 2009年12月7日 (米国ボストン)  
土井 拓、植田 勇人、高木麻夕子、千原悠里、PTZキンドリングにおけるグルタミン酸制御機構の分子生物学的検討、第43回日本てんかん学会、2009年10月22日 (弘前)  
千原悠里、植田 勇人、土井 拓、ウイルモアジェームス、NMDA誘発性痙攣に伴うグルタミン酸、GABAの遊離動態パターンの相違、第43回日本てんかん学会、2009年10月23日 (弘前)  
土井 拓、植田 勇人、金丸 愛、渡嘉敷尚子、PTZによるキンドリング完成群と非完成群における海馬CI-トランスポーター及びGABAトランスポーター mRNAの発現比較、第44回日本てんかん学会、2010年10月14日 (岡山)  
植田 勇人、土井 拓、金丸 愛、渡嘉敷尚子、鉄塩誘導てんかんモデルにおけるグルタミン酸代謝関連分子の発現異常、第44回日本てんかん学会、2010年10月14日 (岡山)  
Ueda Y, Chihara Y, Doi T, Willmore LJ, Increased endoplasmic reticulum stress in the amygdaloid kindling model of rats, American Epilepsy Society Annual Meeting, 2010年12月6日 (米国サンアントニオ)

〔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〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者  
土井 拓 (DOI TAKU)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号：70274793

(2)研究分担者  
植田 勇人 (UEDA YUTO)  
宮崎大学・医学部・准教授  
研究者番号：70244192

中島 暉 (NAKAJIMA AKIRA)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号：10041857

船橋 英樹 (HUNAHASHI HIDEKI)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号：10404435

蛭原 功介 (EBIHARA KOSUKE)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号：20510720

(3)連携研究者

研究者番号：