

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791040

研究課題名（和文） 低酸素性虚血性脳症における神経細胞の樹状突起に発現する電位依存性チャンネルの制御

研究課題名（英文） The regulation of voltage-gated ion channels expressed on neuronal dendrites in hypoxic-ischemic encephalopathy

研究代表者

有光 威志 (ARIMITSU TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60383840

研究成果の概要（和文）：

これまでの研究から、低酸素性虚血性脳症において、興奮毒性によって神経細胞が障害されることが報告されている。本研究より、神経細胞の興奮状態の変化は、大脳皮質神経細胞に発現する hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN) 1 タンパク質の総タンパク質量と細胞膜表面での発現量を制御することにより、HCN1 の機能をコントロールしていることが示された。これらの HCN1 タンパク質の制御が神経の内在的興奮性を調節し、神経細胞の興奮状態をコントロールしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Previous study demonstrates that excitotoxicity damages neurons in hypoxic-ischemic encephalopathy. Present study suggests that changes in neuronal activity leads to coordinated changes in protein expression and surface expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN) 1 and control the function of endogenous HCN1 protein in cortical neurons. These changes in HCN1 protein expression would modulate the intrinsic excitability of neurons, controlling changes in neuronal activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：樹状突起、電位依存性チャンネル、神経細胞、小児科学、新生児医学

## 1. 研究開始当初の背景

低酸素性虚血性脳症（Hypoxic-ischemic encephalopathy、以下 HIE と略す）は、胎児・新生児が低酸素・虚血に暴露されることで脳組織に損傷が起こった状態である。HIE の頻

度は満期産児では 1000 出生に対して約 6 人と報告されており決して稀ではない。15～20%が新生児期に死亡し、生存例においても 25～30%が神経学的後遺症を残すと報告されており、新生児医療にとって重要な課題の

一つである。現在、脳低温療法が新しい治療法として試みられているが、まだ明らかに予後を改善するに至っていない (S. Jacobs et al., *Cochrane Database Syst Rev*, 2007)。脳低温療法やエリスロポイエチン(EPO)などが神経細胞の細胞死を防ぐという神経保護効果については研究されつつあるが、HIEにおける生存した神経細胞の機能については未だ研究が進んでいない。

一方近年、樹状突起の電位依存性チャンネルが、高次脳機能の発現や脳のホメオスタシスの維持、すなわち運動機能・学習機能・記憶などや、神経細胞の異常興奮である痙攣の抑制に必要であることが明らかとなった (H. C. Lai et al., *Nat Neurosci*, 2006)。また低酸素や虚血が電位依存性チャンネルを翻訳後修飾することが分かってきた。さらに、低酸素や虚血などのストレスにより発現する様々な因子が電位依存性チャンネルを変化させることが分かっている。このような知見を省みる時、HIEでの神経細胞の樹状突起の電位依存性チャンネルにおいても、分子レベルでの機能制御が起こっているという仮説に辿り着いた。樹状突起における電位依存性チャンネルの重要性はかつてより注目されていた。その研究はもっぱら電気生理学的手法により機能的な解析が進められてきたが、分子レベルでの研究は今なお非常に限られている。この様な経緯から、分子レベルでの実験技術をHIEにおける神経細胞の樹状突起の研究に応用するという本研究を構想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vivo*と*in vitro*を用いて、HIEにおいて神経細胞の樹状突起の電位依存性チャンネルが、急性期の神経細胞のホメオスタシスの維持・慢性期の高次脳機能にどのように寄与しているかを明らかにすることで

ある。このメカニズムの解明は、HIEに対する新たな治療法へ発展すると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) *In vitro*におけるHIEで変化する電位依存性チャンネルの分子レベルでの変化の薬理学・生化学的な解析

神経細胞を分散培養し、2-3週間の培養の後、成熟したところで、HIEで脳内に生じるグルタミン酸や神経細胞を興奮させるGABA阻害薬、低酸素、一酸化窒素(NO)など様々な刺激を加える。これらの刺激を加えた後に、細胞膜非透過性の架橋剤を用いて細胞膜表面の分子を架橋し、神経細胞膜に発現しているタンパク質を分画する。得られたサンプルを定量的ウェスタンブロット解析することで、様々な電位依存性チャンネルの細胞膜での発現を非刺激条件下のものと比較する。さらに、これらの現象の薬理学・生化学的な解析を行う。具体的には、様々な脱リン酸化酵素や糖プロセッシング関連の阻害剤などを用いて解明していく。

そして、生化学的な手法により得られた知見をイメージングにより確かめ、電気生理学的手法により機能解析することを試みる。イメージングとしては、免疫染色やカルシウムイメージングなどを行う。具体的には、カルシウム感受性蛍光指示薬 (fluo-5F, acetoxymethyl) を培地に加え、30分後に共焦点顕微鏡を用いて、神経細胞内へのカルシウム流入を観察する。また、電気生理学の実験としては、ホールセル・パッチクランプ法を用いて、電流固定法により電位記録を行う。具体的には、神経細胞膜の興奮状態とvoltage sagなどを記録する。

(2) マウスを用いたHIEモデルの確立

HIEに対応したRice-Vannucci model (JE.

Rice et al., *Ann Neurol*, 1981) を作成する。具体的には、出生 7~10 日目のマウスを使用し、麻酔下で頸部正中切開、右総頸動脈結紮する。そして 1.5 時間後に低酸素条件下で 15 分間処置を行う。実際に脳が低酸素・虚血に暴露されたことを低酸素誘導因子 1 (HIF1) などの分子を検出することで確認する。この方法で HIE モデルの作成が困難である場合は、使用するマウスの日齢、結紮時間、酸素濃度や低酸素への暴露時間を調節する。脳をパラフォルムアルデヒドで固定した後、凍結切片を作成し、その切片を、グリア細胞のマーカーである GFAP、ミクログリアの活性化に重要なタンパク質である Iba1、オリゴデンドロサイトのマーカーである MBP に対する抗体などを用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

### (3) *In vivo*における高次脳機能の評価

HIEの長期予後に対する影響を調べるため、非侵襲的脳機能測定法である近赤外分光法 (near-infrared spectroscopy、以下NIRSと略す) により *in vivo*の高次脳機能の評価する。具体的には、慶應義塾大学病院で出生した新生児のうち、新生児病棟入院中で、治療や特別なモニタリングが必要ない新生児を対象とする。頭部に複数のNIRSプローブを装着し、音声刺激を与える。その際の脳血液中のヘモグロビン (Hb) 変化量を測定し、脳内の相対的な活動部位の局在を画像化する。また、脳波電極、眼球運動電極、心電図電極、筋電図電極、呼吸センサーも装着し、身体の血行動態や睡眠状態を同時に計測する。脳機能計測は、日立メディコ社の光トポグラフィ装置 (ETG-4000、医療機器認証済)、その他の生理指標は、ティアック社の多用途生体信号装置 (Polymate) で計測する。

音声の刺激方法としては、言語の抑揚・母

音の変化に対してHb変化量を測定する手法を用いる。具体的には、基本の音声刺激として /itta/ (行った) を繰り返し呈示し、聞き慣れたところで、最終母音の異なる音韻変化条件/itte/ (行って)、もしくは語末の音調が異なる抑揚変化条件/itta?/ (行った?) を提示する。

## 4. 研究成果

(1) *In vitro*におけるHIEで変化する電位依存性チャネルの解析

①これまでの研究から、低酸素性虚血性脳症において、グルタミン酸の興奮毒性によって神経細胞が障害されることが報告されている。神経細胞に発現する

hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN) 1は、神経細胞の内在的興奮性を変化させる過程において決定的な意味を持つと考えられている。マウス大脳皮質の分散培養神経細胞を用いて、神経細胞の興奮状態に依存したHCN1の分子細胞レベルでの制御機構を明らかにした。まず、電気生理学的手法とカルシウムイメージングにより、テトロドトキシン処理により神経細胞の興奮状態を可逆的に調節できることが示された。次に、ウェスタンブロッティングを行い、神経活動が低下するとHCN1の総タンパク質量は低下し、神経活動が元に戻ると総タンパク質量が回復することが示された。ここで、*in vitro*のグリコシダーゼによる糖鎖切断実験の結果から、HCN1タンパク質は生理条件下においてEndo H耐性の糖鎖修飾を受けており、神経活動の低下により、これが減少することが示された。さらに、細胞膜非透過性の架橋剤を用いて細胞膜表面の分子を架橋した後に、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、細胞膜表面のHCN1タンパク質は、神経活動の低下によって減少し、神経活動が

戻ることによって回復することが示された。これらの結果を踏まえて、電気生理学的手法を用いて、神経活動が低下すると、HCN1の機能が低下することを示した。

本研究より、神経細胞の興奮状態の変化は、大脳皮質神経細胞に発現する HCN1 タンパク質の総タンパク質量と細胞膜表面での発現量を制御することにより、HCN1 の機能をコントロールしていることが示された。これらの HCN1 タンパク質の制御が神経の内在的興奮性を調節し、神経細胞の興奮状態をコントロールしていると考えられる。

②低酸素性虚血性脳症の神経学的後遺症として、高次脳機能障害をきたすことが知られている。また、HCN1 は、運動学習やワーキングメモリーなどの高次脳機能の発現に重要な役割を果たしていると考えられている。近年、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体が HCN を介してワーキングメモリーを増強することが報告されているが、HCN1 がタンパク質レベルでどのような制御を受けているのかは明らかでない。

マウス大脳皮質の分散培養神経細胞を用いて、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体による HCN1 の分子レベル及び細胞レベルでの制御機構を明らかにすることを目的とした。まず、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体のアゴニストであるクロニジンを用いて、神経細胞の  $\alpha 2A$  アドレナリン受容体を刺激した。そして、細胞膜表面での HCN1 タンパク質の発現量を調べるために、細胞膜非透過性の架橋剤を用いて細胞膜表面の分子を架橋した後に、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、細胞膜表面の HCN1 タンパク質の発現量は、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体の刺激により、低下する傾向が示された。そこで、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体の刺激による経時的な細胞膜表面での発現量の変化を調べた結果、HCN1 タンパク

質の細胞膜表面での発現量は、時間依存的に減少する傾向が示された。

本研究の結果より、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体は HCN1 タンパク質の細胞膜表面での発現量を減少させることで、ワーキングメモリーを増強させる可能性のあることが示された。

## (2) マウスを用いた HIE モデルの検討

低酸素性虚血性脳症の発症メカニズムとして、様々な炎症性サイトカインの重要性が示唆されている。リポ多糖は、大腸菌由来のエンドトキシンであり、母体への投与により、胎児に様々な炎症性サイトカインを誘導し、循環障害と脳障害を引き起こすことが知られている。そこで *in vivo* における炎症性サイトカインによる新生児の脳障害を調べるため、動物モデルを作成した。妊娠マウスにリポ多糖を腹腔内投与し、出生したマウスを還流固定した後に、脳をパラフォルムアルデヒドで固定した。その後、凍結切片を作成し、その切片を、グリア細胞のマーカーである GFAP、ミクログリアの活性化に重要なタンパク質である Iba1、オリゴデンドロサイトのマーカーである MBP に対する抗体などを用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。還流固定の有無、凍結切片の厚さなどを検討し、還流固定を行い、凍結切片の厚さは  $10 \mu\text{m}$  の条件が最適であることが判明した。しかし、日齢 2 より若いマウスでは、安定した結果を得るためには、さらに詳細な条件検討が必要と考えられた。脳障害の程度を経時的に調べるため、日齢 2 から日齢 21 までのマウスを対象に上記実験を行った。

これまでの研究から、炎症性サイトカインが新生児のオリゴデンドロサイトを障害することは報告されているが、その詳細なメカニズムや、ミクログリアなどオリゴデンドロサイト以外の細胞に対する影響は、いまだに

不明な部分が多い。本研究の結果は、炎症性サイトカインによる脳障害のメカニズムを明らかにできる可能性がある。

### (3) *In vivo*における高次脳機能の評価

実験の結果、新生児でも音変化検出の脳反応が得られた。新生児は抑揚変化に対して聴覚野近傍で右半球優位な脳反応を示した。音韻条件の母音変化に対しては聴覚野近傍の反応の左右差はみられなかったが、言語野の一部である縁上回で左優位な強い反応がみられた。

本研究の結果により、研究対象を動物からヒトまで広げることにより、新生児の脳障害についてさらに深く研究できる可能性が示された。本研究をさらに発展させれば、低酸素性虚血性脳症による高次脳機能障害のメカニズムを明らかにできる可能性がある。

## 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)

1. Hokuto I, Matsuzaki Y, Miwa M, Arimitsu T, Okishio E, Ikeda K, Hepatocyte growth factor levels of cord blood in healthy term newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 97: F389, 2012. doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03698.x.、査読有
2. Arimitsu T, Uchida-Ota M, Yagihashi T, Kojima S, Watanabe S, Hokuto I, Ikeda K, Takahashi T, Minagawa-Kawai Y., Functional hemispheric specialization in processing phonemic and prosodic auditory changes in neonates. *Front*

*Psychol*, 2:202, 2011. doi:

10.3389/fpsyg.2011.00202.、査読有

3. Arimitsu T, Nuriya M, Ikeda K, Takahashi T, Yasui M, Activity-dependent regulation of HCN1 protein in cortical neurons, *Biochem Biophys Res Commun*, 387:87-91, 2009. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.127.、査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 有光威志、在胎週数による新生児の音声誘発脳反応の変化、第 56 回日本未熟児新生児学会、2011 年 11 月 14 日、東京国際フォーラム (東京都)
2. 有光威志、近赤外分光法による早産児の音声誘発脳反応、第 47 回日本周産期・新生児医学会、2011 年 7 月 11 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
3. 有光威志、近赤外分光法による新生児の音声誘発脳反応、日本未熟児新生児学会、2010 年 11 月 6 日、神戸国際会議場 (兵庫県)
4. 有光威志、高次脳機能に関わる hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 タンパクの分子・細胞学的制御機構、日本未熟児新生児学会、2009 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 4 件)

1. Uchida-Ota M, Arimitsu T et al., Preliminary report on differences in cerebral hemodynamic responses to

mother's voice between preterm and term neonates. In CARLS series of advanced study of logic and sensibility. 5, (2011), p.149-162. 査読無 (他5名、2番目)

2. 有光威志、武内俊樹、池田一成、「神経系低体温療法の生理学・生化学 どのように新生児の脳を保護しているのか?」、『小児看護』、へるす出版、34巻、pp1428-1433、2011、査読無
3. Minagawa-Kawai Y, Arimitsu T et al., "Early cerebral bases of phonemic and prosodic cue decoding assessed with neonate NIRS" in CARLS series of advanced research Vol. 4, pp165-175, Keio University Press. 2010. 査読無 (他5名、2番目)
4. 有光威志、池田一成、「早期産帝王切開による児の影響」、『周産期医学』、東京医学社、40巻、pp1491-1494、2010、査読無

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有光 威志 (ARIMITSU TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60383840