

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 24 年 5 月 14 現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791568

研究課題名（和文）一過性脳虚血に対する舌下神経前位核ニューロンの脆弱性

研究課題名（英文）Vulnerability of neurons in the prepositus hypoglossi nucleus against transient ischemia.

研究代表者

紫野 正人（SHINO MASATO）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：20550015

研究成果の概要（和文）：内側前庭神経核や舌下神経前位核ニューロンは一過性虚血（5 分間 OGD 負荷）に対して、その膜電位を過分極させて自発発火を停止し、生理的条件下に戻すことで脱分極して自発発火を回復した。このことは、ニューロン自身の内因性膜特性の変化によって生じる。さらにその責任となるイオンコンダクタンスは ATP 感受性カリウムチャネルを介した外向きカリウム電流であることが薬理学的実験から明らかとなった。虚血に対して一過性過分極から自発発火の停止を導く内因性膜特性変化は、虚血に対する過剰な自発発火による細胞死から自身を守るためのニューロンの自己防衛機序ととらえることができる。

研究成果の概要（英文）：The neurons in the medial vestibular and the prepositus hypoglossi nucleus are hyperpolarized due to transient outward potassium current through KATP channels during transient ischemia. This mechanism is thought to be a self-defense system which enables to prevent neurons from ischemic injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：前庭

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：舌下神経前位核、虚血、内側前庭神経核、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会において、メマイ・平衡障害は高齢者で頻りに遭遇する病態である。高齢者のメマイ・平衡障害は、中枢代償機構の低下、長期臥床による筋力低下、改善意欲の低下など様々な要因により生活の質を著しく低下させる。このようなメマイ・平衡障害の原因として、CT、MRI で器質性病変を検出

できない一過性脳虚血発作である椎骨脳底動脈循環不全症（Vertebrobasilar Insufficiency; VBI）が挙げられる。椎骨脳底動脈系は末梢前庭器、蝸牛、第Ⅷ脳神経、脳幹、小脳などに広く血液を供給しているため、当該血管系の循環不全により理論上、その灌流域にあるすべての器官の機能障害が生じうる。しかし、実際の日常診療の場では、

メマイ単独の症状を呈することが少なくない。VBI は中枢性メマイに分類されるものの生じる眼振は定方向性の水平回旋混合性眼振が多く、注視眼振のような、いわゆる中枢性の眼振はまれである。そこで、椎骨脳底動脈の灌流域に存在し、水平性眼球運動に関与する脳幹神経核である舌下神経前位核 (Prepositus Hypoglossi Nucleus; PHN) と内側前庭神経核 (Medial Vestibular Nucleus; MVN) の虚血耐性に着目した。舌下神経前位核と内側前庭神経核は、水平眼球運動において、外側三半規管からの頭部回転速度情報を眼球位置情報に変換するという神経積分器としての役割が報告されている。したがって舌下神経前位核や内側前庭神経核を含む脳幹が脳梗塞などで不可逆性の障害を受けると、側方注視眼振がみられる。ネコやサルなどの *in vivo* の報告からも、舌下神経前位核の物理的・化学的破壊により眼位が保持できず、側方注視眼振が出現することが証明されている。一方、*in vitro* の実験系から、舌下神経前位核と内側前庭神経核は多様な電気生理学的特性を持つニューロンから構成されることを申請者は報告した。臨床の現場で椎骨脳底動脈循環不全症に伴う水平性眼振が生じることにはしばしば遭遇するが、ニューロンレベルでそれぞれの神経核が循環不全、すなわち一過性虚血に対してどのような反応を示すのかは十分に理解されていない。そこで、水平性眼振解発の中心的役割をになう舌下神経前位核や内側前庭神経核の虚血に対する振舞いを調べるとい研究テーマの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、舌下神経前位核・内側前庭神経核に虚血負荷を与えた時の反応を調べることである。神経核としての働きは、その構成最小単位である個々のニューロンに反映されているため、本研究では舌下神経前位核ニューロン、内側前庭神経核ニューロンに着目し、一過性脳虚血によってのこれらニューロンの電気生理学的特性がどのように変化するかを観察することで椎骨脳底動脈循環不全症の眼振出現のメカニズムを明らかにする。これにより、新たな薬剤の開発やメマイ治療法の確立に有効であると考えられる。

3. 研究の方法

本研究の目的は一過性虚血に対するニューロンの可逆性変化を機能的アプローチでとらえることである。このためニューロンが生きている状態を維持することが必要不可欠である。したがって申請者は実験方法として

電気生理学的手法、なかでも代の脳科学分野においてニューロンの機能を調べるうえで、第一選択であり、同時に細胞内染色も可能で、形態学的な評価も可能なテクニックである、スライスパッチクランプ法を採用してニューロンの膜特性変化を調べた。また、虚血負荷としては、無グルコース無酸素刺激 (Oxygen-Glucose deprivation; OGD) を用いた。この虚血刺激方法は、すでに海馬、小脳、脳幹などで広く用いられている方法である。虚血時間は既存の論文や、人間における心肺停止時間 (= 脳虚血) のゴールデンタイムである5分間とした。具体的には、まず生理的条件下でニューロンの自発発火を記録する。同時にスパイク後過分極の形、スパイク幅、スパイク生成閾値などのパラメータについても測定を行う。その後、無酸素・無グルコースの細胞外液 (OGD) を脳幹スライスに還流させて一過性脳虚血状態にし、5分後再び生理的条件下に戻す。この一連の時間経過においてニューロンの膜電位が定常状態と比較してどのように変化するかを記録する。さらに、虚血によって生じる変化の原因となるイオンコンダクタンスについても各種の阻害剤を用いて検討する。一方で、舌下神経前位核と内側前庭神経核を構成するニューロンは全く同一ではなく、膜特性が異なるものも存在する。このことから、両者に特徴的な膜特性を持つニューロンについても検討する。

4. 研究成果

スライスパッチクランプ法の電流固定法にてニューロンの自発発火を記録した。内側前庭神経核ニューロンは自発発火をしていることが知られている。本研究でも同様に多くのニューロンで自発発火が記録できた。5分間 OGD 負荷を与えると、ニューロンの膜電位は速やかに過分極し、その結果、ニューロンの自発発火が停止した。虚血後に生理的条件下に戻す (酸素とグルコースを供給する) とニューロンの膜電位は脱分極し、自発発火を再開した。OGD 前、中、後でスパイク生成閾値を比較すると、OGD 中は有意に低下していた。また、OGD 前後の比較では有意な差は認めなかった (Fig. 1)。

Fig. 1 虚血による自発発火と閾値の変化



次に、一過性過分極がどのような要因に起因

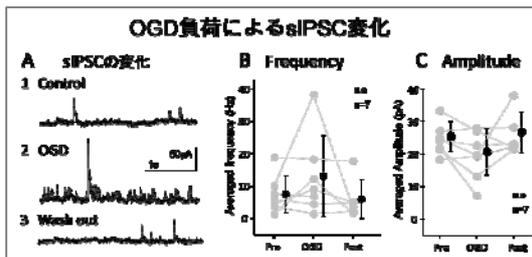
するのかを調べるため、二つの仮説を検討した。第一にニューロンへの外因性要素の影響である。内側前庭神経核や舌下神経前位核に限らず、ニューロンには多くの興奮性・抑制性神経線維入力があり、ニューロンの活動性を規定している。虚血によりプレシナプスからの抑制性入力が増大し、ニューロンの過分極が生じる可能性を検討した(Fig. 2)。

Fig. 2 外因性要素の仮説シエーマ



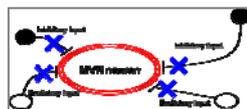
ニューロンへの興奮性入力を阻害剤で遮断した状態で、OGD 負荷時の自発性抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory postsynaptic current; sIPSC) を記録した。阻害剤として、グルタミン酸性シナプス伝達は 2mM キヌレン酸を用いた。生理的条件下での sIPSC が一過性に増大するものもあった(Fig. 3A)が、全体としては OGD により sIPSC の頻度 (Fig. 3B) 振幅(Fig. 3C)ともに有意な変化は認めなかった。この結果から外因性要素による一過性過分極は説明がつかないという結論に達した。

Fig. 3 抑制性シナプス後電流の測定



次に第二の仮説として、ニューロンの内因性膜特性変化による過分極の可能性を検討した。(Fig. 4)

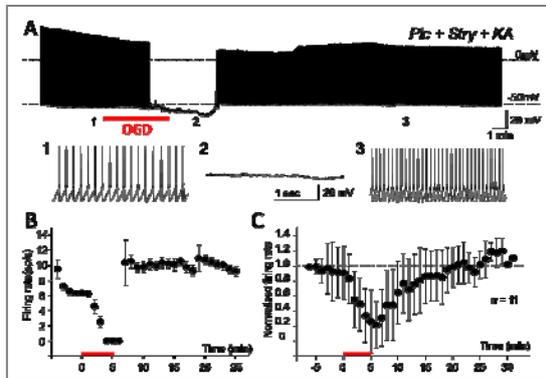
Fig. 4 内因性要素の仮説シエーマ



興奮性入力に加え、GABA とグリシンによる抑制性入力を遮断し、ニューロンをアイソレートしておく。阻害剤として、GABA 作動性シナプス伝達には 100 μM ピクトキシンを、グリシン作動性シナプス伝達は 10 μM ストリキニンを使用した。この条件下で前述と同様に OGD 負荷による自発発火の変化を記録した。その結果、Fig. 1 と同様に OGD による一過性過分極と、これに引き続いて起こる自発発火の停止がみられた。虚血を解除した場合も同様にニューロンの膜電位はすみやかに脱分極して自発発火を再開した(Fig. 5A 1-3)。次に、OGD 負荷前後での自発発火頻度に注目して経時的にその頻度を記録した。Fig. 5B は Fig. 5A で示されたニューロンの発火頻度記

録を示している。このニューロンでは OGD 負荷後の発火頻度が上昇した。しかし、調査した 11 のニューロンでは、OGD 負荷前後で有意な発火頻度の変化はみられなかった。以上より、OGD 負荷による膜電位の一過性過分極は、ニューロン自身の内因性膜特性が可逆的に変化することに起因すると結論できた。

Fig. 5 阻害剤存在下での OGD 負荷と発火頻度



さらに、OGD 負荷前後での活動電位のスパイク特性についても検討を行った。今回は、スパイク特性の比較パラメータとして、①活動電位のピークから後過分極のピークまでの時間、②後過分極の振幅、③活動電位の幅を測定した (Fig. 6)。

Fig. 6 OGD 負荷前後でのスパイク特性比較

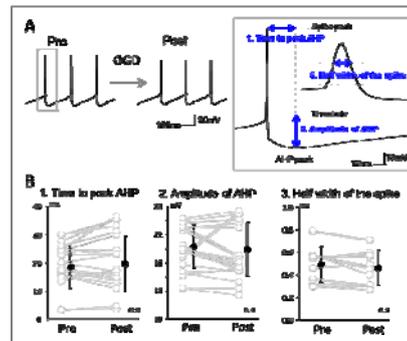
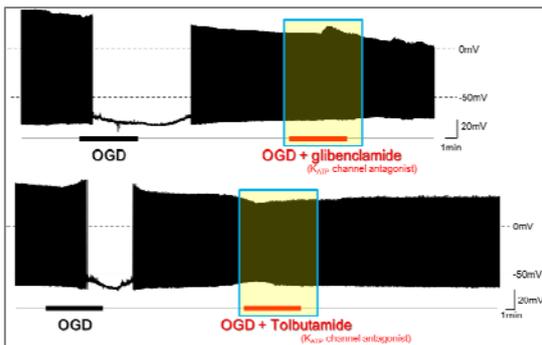


Fig. 6A は活動電位のどの部分をパラメータとして使用したのかを示している。Fig. 6B は各パラメータの比較であり、結果として、どのパラメータにおいても、OGD 負荷前後で有意な変化を示すものはなかった。以上の結果より、内側前庭神経核や舌下神経前位核ニューロンは、OGD 負荷を受けることで、一過性に過分極して自発発火を停止し、生理的条件下に戻すことによって、すみやかに膜電位が脱分極して自発発火を再開する。そして現象は、外因性要因によらず、ニューロン自身が持つ内因性膜特性の変化によって生じていることが実証された。

次に、上記のような現象が、ニューロンのどのようなイオンコンダクタンスに起因して

いるのか検討した。虚血によってニューロン（細胞内）に生じるのは、エネルギー(=ATP)の枯渇である。ニューロンはグルコースのみをエネルギー源として使用し、他の糖類やタンパク・脂質を変換して使用することができない。また、虚血による酸素不足では、エネルギー効率の良い好気的なATP産生が不可能である。一方、膜電位を過分極させるイオン電流の候補としては外向きカリウム電流を考えた。すでに中脳黒質線状体のドーパミン産生ニューロンでは、虚血に反応してATP感受性カリウムイオンチャンネルを介した外向きカリウム電流により膜電位が過分極することで、異常発火を防ぐ自己防衛機構が報告されている。これと同様のメカニズムが内側前庭神経核や舌下神経前位核にも存在することを想定し、ATP感受性カリウムイオンチャンネル(K_{ATP})を候補とした。そこで、ATP感受性カリウムイオンチャンネルの阻害剤(glibenclamide, tolbutamide)存在下でOGD負荷を与えた時の自発客家の様子を観察した。コントロールとして、これまでの条件下でOGD負荷を行い、一過性過分極による自発発火の停止が起こることを確認後、ATP感受性カリウムイオンチャンネルの阻害剤である100 μ M glibenclamideを添加したOGD負荷を与えた。その結果、これまでに記録されたような一過性過分極とこれに付随した自発発火の停止はみられず、ニューロンは自発発火を継続した。この現象は、もう一つの阻害剤である500 μ M tolbutamideを添加したときも同様であった (Fig. 7)。

Fig. 7 ATP感受性カリウムイオンチャンネル阻害剤存在下でのOGD負荷

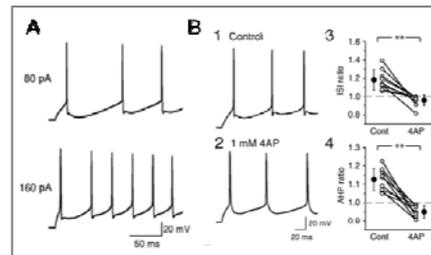


以上より、OGD負荷による一過性過分極は、ATP感受性カリウムイオンチャンネルを介した一過性外向きカリウム電流に起因することが証明された。

また、舌下神経前位核ニューロンには特徴的な発火特性を示すニューロンが存在したため、その原因となるイオンコンダクタンスについても調査を行った。このニューロンの特徴は、電流注入に対するスパイク生成におい

て、1発目と2発目の間隔のみが、ほかのスパイク間隔 (interspike interval; ISI) と比較して有意に長いというものである。申請者はこのニューロンを First Interspike interval is Long; FILニューロンと定義した (Fig. 8A)。さらにこのFILニューロンはスパイク間隔だけでなく、スパイク生成後の後過分極 (afterhyperpolarization: AHP) 振幅も、初めのAHP振幅が、2番目以降の振幅よりも有意に深いという特徴も併せ持っていた。このような特性をもつ原因となるイオンコンダクタンスを薬理的に検証した。その結果、4-Aminopyridine (4-AP) によって阻害される一過性外向きカリウムチャンネル電流がこのニューロンを特徴づけていることが明らかとなった (Fig. 8B)。FILニューロンに4-AP存在下で電流注入を行っても、その特徴である長い初めのISIと、深いAHPはみられなかった。

Fig. 8 FILニューロンを特徴づける4-AP sensitive potassium current



これらすべての結果より、これらすべての結果より、内側前庭神経核や舌下神経前位核ニューロンは一過性虚血 (5分間OGD負荷) に対して、その膜電位を過分極させて自発発火を停止し、生理的条件下に戻すことで脱分極して自発発火を回復した。このことは、ニューロン自身の内因性膜特性の変化によって生じる。さらにその責任となるイオンコンダクタンスはATP感受性カリウムチャンネルを介した外向きカリウム電流であることが薬理学的実験から明らかとなった。虚血に対して一過性過分極から自発発火の停止を導く内因性膜特性変化は、虚血に対する過剰な自発発火による異常興奮とこれにともなって生じる細胞死から自身を守るためのニューロンの自己防衛機序ととらえることができる。

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4件)

1) Saito Y, Shino M, Yanagawa Y.

Characterization of ionic channels underlying the specific firing pattern of a novel neuronal subtype in the rat prepositus hypoglossi nucleus. 査読あり、Neurosci Res. 2012 May;73(1):32-41. Epub 2012 Mar 1.

2) Shino M, Kaneko R, Yanagawa Y, Kawaguchi Y, Saito Y.

Electrophysiological characteristics of inhibitory neurons of the prepositus hypoglossi nucleus as analyzed in Venus-expressing transgenic rats. 査読あり、Neuroscience. 2011, Dec 1;197:89-98

3) Shino M, Takahashi K, Murata T, Iida H, Yasuoka Y, Furuya N.

Angiotensin II receptor blocker-induced angioedema in the oral floor and epiglottis. 査読あり
Am J Otolaryngol. 2011 Nov-Dec;32(6):624-6

[学会発表] (計3件)

1) 紫野正人、高安幸弘、高橋克昌

虚血による内側前庭神経核ニューロンの一過性過分極を説明するATP感受性Kチャンネル由来の外向きカリウム電流
第70回日本メマイ平衡医学会総会・学術講演会 幕張メッセ(千葉) 2011.11.17

2) Masato Shino, Yukihiro Takayasu, Nobuhiko Furuya Ischemic change of spontaneous firing in medial vestibular neurons. 34th Association for Research in Otolaryngology (ARO) Midwinter meeting, Baltimore Marriott Waterfront hotel (Baltimore, US) 2011.3.19

3) 紫野正人、高安幸弘、高橋克昌、宮下元明、岡宮智史、古屋信彦 内側前庭神経核ニューロンの虚血耐性

第69回日本メマイ平衡医学会総会・学術講演会 2010.11.17 京都国際会議場(京都)

[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]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紫野 正人 (SHINO MASATO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：20550015

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：