

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592305

研究課題名(和文) 脊髄虚血後のASIC活性化制御による神経保護効果の検討

研究課題名(英文) The role of ASICs in neuroprotection after spinal ischemia

研究代表者

草間 宣好 (KUSAMA, NOBUYOSHI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60336691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸感受性イオンチャンネル(ASIC)は細胞外protonによって開口するナトリウムチャンネルである。ASIC1aチャンネルは細胞外ドメインにClイオン結合部位を有しており、これは各種ASICサブユニット間で高度に保存されている。陰イオンはClイオン結合部位を介して各種ASICチャンネルの機能を修飾する。この機能修飾はチャンネル組成し依存し、ASIC2aとASIC3を修飾するメカニズムはASIC1aチャンネルにおけるメカニズムとは異なることが明らかとなった。ClイオンによるASICチャンネル機能の修飾は、細胞外液の組成を感知するメカニズムとしての機能が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acid-sensing ion channels (ASICs) are sodium channels gated by extracellular protons. ASIC1a channels possess intersubunit Cl-binding sites in the extracellular domain, which are highly conserved between ASIC subunits. We found that anions modulate a variety of ASIC properties and are dependent on the subunit composition, and the mechanism of modulation for ASIC2a and ASIC3 is distinct from that of ASIC1a. We speculate that modulation of ASIC gating by Cl is a novel mechanism to sense shifts in extracellular fluid composition.

研究分野：医歯薬学

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：ASIC

1. 研究開始当初の背景

Acid-sensing ion channel (ASIC)は、細胞外 H⁺によって活性化される電位非依存性の陽イオンチャネルである。6種類のアイソフォーム (ASIC1a, -1b, -2a, -2b, -3, -4) が存在し、主に中枢神経や末梢知覚神経に発現している。近年の研究により、脳に発現した ASIC1a が虚血による神経細胞死に関与していることが明らかとなった。虚血に伴う代謝性アシドーシスにより ASIC1a が活性化され細胞外 Ca イオンが細胞内に流入し、その結果、過剰な Ca イオンの細胞内蓄積により神経細胞死を誘発される。中大脳動脈閉塞によるラット脳梗塞モデルの実験では、ASIC1a KO マウスは wild type と比較し梗塞巣サイズが小さく、wild type においても ASIC1a 阻害薬を脳室内に前投与した場合梗塞巣サイズが縮小化することが報告されている。また、脳虚血時には髄液中の pH 低下に加え、Cl⁻濃度が低下する。申請者らは細胞外 Cl⁻濃度の低下により ASIC1a のチャネル特性が変化すること、およびこのチャネル特性変化によって虚血性神経細胞死が増加することを明らかにした (Kusama Net al. J Biol Chem. 2010)。ASIC1a は脳だけでなく脊髄にも広く発現している。しかし、脊髄神経細胞に発現した ASIC1a と脊髄虚血による神経障害に関して検討を行った報告は無い。

2. 研究の目的

脳において、Acid-sensing ion channel (ASIC) が脳虚血時の神経細胞死に関与することが報告されている。申請者らは脳虚血に伴う細胞外 Cl⁻濃度の低下により ASIC のチャネル特性が変化し、神経細胞死が悪化することを明らかにした。本研究は、脊髄虚血時の神経障害における ASIC の関与を明らかにし、大動脈瘤手術の重篤な合併症である対麻痺の新たな予防法へ展開するための研究基盤を確立することが目的である

3. 研究の方法

(1) 脊髄神経細胞に発現する ASIC チャネルの解析: 脊髄培養神経細胞を用いて、細胞外液の pH を 7.4 から酸性 (5.0-7.0) に変化させた時に生じる ASIC 電流を電気生理学的手法 (Whole-cell patch-clamp 法) を用いて測定し、そのチャネル特性を解析する。また、免疫組織染色により、各アイソフォームの局在を明らかにする。一つの ASIC チャネルはアイソフォームの 3 量体 (homomultimer もしくは heteromultimer) として構成され、その組み合わせによりチャネル特性は変化する。上記の方法により脊髄神経細胞に発現する主要な ASIC チャネルの構成について明らかにする。

(2) 虚血性神経細胞死に対する ASIC 阻害薬の効果: 脊髄培養神経細胞を用いて、低酸素負荷を与えたときに生じる神経細胞死が

ASIC 阻害薬により抑制されるかどうかを検討する。Ethidium homodimer-1 で虚血により障害された神経細胞を標識することで、ASIC 阻害薬が虚血性神経細胞死を抑制することを確認する。

(3) 脊髄虚血モデルにおける ASIC 阻害薬の効果: ラット脊髄虚血モデルを用いて ASIC 阻害薬の脊髄保護作用を検討する。対象群 (生食投与群) および ASIC 阻害薬投与群に分け、各薬剤を投与した後、脊髄虚血モデルを作成する。両群で、神経学的評価および脊髄の組織学的評価を行い、ASIC 阻害薬の脊髄保護作用を検討する。

4. 研究成果

(1) ラット後根神経節細胞に発現した ASIC チャネルの細胞外陰イオンによる修飾. 細胞外液中の Cl⁻ イオンを MeSO₃ イオンに置換したとき pH5.0 による ASIC 電流の最大振幅や脱感作速度などには有意な変化を生じなかった。ただし、pH7.0 による電流は Cl⁻ イオンを MeSO₃ イオンに置換した場合、有意に増加した。Cl⁻ イオンをより疎水性の陰イオンである SCN⁻ イオンに置換したとき、ASIC 電流の脱感作速度は促進された。また、最大電流の減少を認めた。pH-電流反応曲線は Cl⁻ イオンを SCN⁻ イオンに置換しても変化を生じなかった。これらの結果は、以前に報告された ASIC1a や海馬神経細胞に発現した ASIC チャネルにおける陰イオン置換の効果と異なっており、ASIC サブユニットによって陰イオン置換による機能修飾が異なることが示唆された。

(2) 細胞外陰イオンによる ASIC3 チャネル機能の修飾. ラット脊髄後根神経節細胞は多くの場合 ASIC3 サブユニットを構成要素に含んでいる。CHO cell に発現させた ASIC3 チャネルにおいて細胞外陰イオン置換の効果を検討した。MeSO₃ イオンと比較して、Cl⁻ イオンは pH5.0 電流の脱感作速度をわずかに促進した。また SCN⁻ イオンや Br⁻ イオンは pH5.0 電流の脱感作速度を著明に促進した。ASIC3 チャネルは不完全な脱感作により持続電流を生じるが、陰イオンを置換してもこの持続電流には変化を認めなかった。これらの結果より、細胞外陰イオンは ASIC3 チャネルの酸依存性の開口を修飾するが、その様式は ASIC1a とは異なることが明らかになった。陰イオンの ASIC3 チャネルを修飾する能力は、SCN⁻ イオン > Br⁻ イオン > Cl⁻ イオン > MeSO₃ イオン > Gluconate イオンの順であった。

(3) ASIC3 チャネルの Cl⁻ イオン結合部位のアミノ酸変異による効果. ASIC1a チャネルにおいて Cl⁻ イオン結合部位のアミノ酸を変異させると陰イオンによるチャネル機能修飾作用は消失することが明らかになっている。今回、ASIC3 における Cl⁻

イオン結合部位のアミノ酸残基を変異させた場合の影響を CHO cell を使用して検討した。ASIC3(K204A)を除いたすべての変異、例えば ASIC3(E322A)や ASIC3(K204A/E322A)において、ASIC 電流は wild type と比較して減弱化していた。変異チャネルにおける脱感作速度は、wild type における MeSO₃ イオンや Gluconate イオンの効果に類似せず、むしろ脱感作速度を促進した。また変異チャネルにおいては、pH-電流反応曲線は多くの場合、左方偏位を示した。変異チャネルにおいて、細胞外液中の陰イオンを置換した場合、wild type の場合と同様に脱感作速度の変化は生じた。これは ASIC1a チャネルで Cl イオン結合部位のアミノ酸を変異させた場合、陰イオンによるチャネル機能修飾作用は消失するのとは異なっていた。これらの結果より、Cl イオン結合部位は ASIC1a 同様、ASIC3 のチャネル化開口を修飾する一方で、陰イオン置換による ASIC3 チャネル修飾には必須でないことが明らかとなった。ASIC3 では Cl イオン結合部位のアミノ酸変異は、脱感作速度に対し細胞外陰イオン置換の効果を消失させず、wild type における陰イオン置換とは逆の効果を生じた。

(4) 細胞外陰イオンによる ASIC2a チャネル機能の修飾

細胞外液中の陰イオン置換は ASIC2a チャネル電流を大きく変化させた。Gluconate イオンは ASIC2a チャネルの pH 感受性を低下させ、また pH3.5 による最大電流も減弱化させた。また Gluconate イオンは ASIC2a の脱感作速度を著明に低下させた。次いで ASIC2a チャネルにおける Cl イオン結合部位のアミノ酸を変異させ、その効果について検討した。ASIC2a(R308A)、ASIC2a(E312A)、ASIC2a(R308A/E312A)において脱感作速度は wild type と比較して促進していた。また ASIC2a(R308A/E312A)では pH 感受性が著明に増加していた。ASIC2a(K211A)は ASIC 電流を生じなかった。ASIC2a(E312A)では細胞外陰イオン置換による脱感作速度の減少効果は残存していたが、ASIC2a(R308A/E312A)ではその効果が消失していた。Wild type で認めた Gluconate イオンによる pH 感受性の低下は、ASIC2a(R308A)においては消失していた。この変化は ASIC2a(R308A/E312A)でより明らかであった。また ASIC2a(R308A/E312A)では脱感作速度への Gluconate イオン置換の効果もわずかであった。さらに ASIC2a(R308A/E312A)では陰イオン置換による pH 感受性の変化も wild type とは異なっていた。一方で、SCN イオンは ASIC2a チャネルの pH 感受性を増加させた。また SCN イオンは ASIC2a の脱感作速度を著明に促進した。また ASIC2a の最大電流は Cl イオンの場合と比較して減弱化していた。Cl イオン結合部位のアミノ酸変異させた場合でも、SCN イオンによるこれらの修飾効果は残存していた。これらのことから、細胞外陰

イオンによって ASIC2a の開口様式が修飾されること、この修飾作用の一部は Cl イオン結合部位を介して生じていること、しかし SCN イオンによるチャネル機能の修飾は Cl イオン結合部位とは独立した機序であると考えられた。

(5) ラット脊髄後根神経節細胞の ASIC チャネルと ASIC1a/3 ヘテロマルチマーチャネルに対する細胞外陰イオンの影響

ラット脊髄後根神経節細胞に発現した ASIC チャネルの電気生理学的性質 (pH-電流反応曲線、脱感作速度) は CHO cell に発現した ASIC1a/3 ヘテロマルチマーチャネルと類似した電気生理学的性質を示した。(1)に示した通り、ラット脊髄後根神経節細胞に発現した ASIC チャネルにおいて、MeSO₃ イオンは pH5.0 による最大電流や脱感作速度には変化を生じずに、pH7.0 による電流を有意に増加させる。また SCN イオンは脱感作速度を促進し、pH5.0 による最大電流は減少させる。CHO cell に発現した ASIC1a/3 ヘテロマルチマーチャネルに対する細胞外陰イオンの効果は、ASIC1a や ASIC3 などのホモマルチマーチャネルの場合とは一致せず、ラット脊髄後根神経節細胞に発現した ASIC チャネルに対する陰イオンの効果と同様の効果を示した。

(6) ASICs は筋肉、心筋、脳など代謝活性の高い組織に高率に発現している。ASICs は細胞外 proton によって開口するだけでなく、虚血などによって産生・放出される種々の化学物質によっても修飾される。細胞外陰イオンによるチャネル機能の修飾には、細胞外液の組成を感知するメカニズムとしての役割が考えられる。脳においては虚血により細胞内外で Na イオン、Cl イオンの移動が起こり細胞外 Cl イオンは 140mM から 50~90mM まで低下することが報告されている。脳と同様に脊髄や心筋、筋肉においても、虚血による細胞外陰イオンの変化を ASIC チャネル機能を変化により感知している可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計2件)

ASIC2 subunits facilitate expression at the cell surface and confer regulation by PSD-95. Harding AM, Kusama N, Hattori T, Gautam M, Benson CJ. PLoS One. 2014;9(4):e93797 査読有り
DOI: 10.1371/journal.pone.0093797.
Acid-sensing ion channels (ASICs) are differentially modulated by anions dependent on their subunit composition. Kusama N, Gautam M, Harding AM, Snyder PM. Am J Physiol Cell Physiol. 2013; 304(1):C89-101 査読有り

DOI: 10.1152/ajpcell.00216.2012.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

草間 宣好 (Kusama Nobuyoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 60336691

(2) 研究分担者

杉浦 健之 (Sugiura Takeshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 20295611

祖父江 和哉 (Sobue Kazuya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 90264738