

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791874

研究課題名(和文) 循環不全モデルにおける脳幹前庭神経細胞の発火特性変化の解明

研究課題名(英文) Changing of the firing properties of vestibular neurons induced by temporal circulation ischemia

研究代表者

高安 幸弘 (Takayasu, Yukihiro)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70375533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：前庭系中枢の神経細胞において、一過性虚血性がどのような変化を生じるのかを解明するため、本研究ではラット脳幹スライス切片において無酸素無グルコース細胞外液を還流し、モデル条件とした。神経細胞の膜特性の変化はパッチクランプ方を用いて観察した。まず、前庭神経核神経細胞をホールセル記録し、膜電流固定下に自発発火を記録した。無酸素無グルコース細胞外液還流により、前庭神経核神経細胞の自発発火は消失あるいは低下した。このことから、一過性虚血刺激により、細胞膜に対する過分極刺激が生じたことが示唆された。機序として、シナプス前細胞からの抑制性刺激が増加するや細胞膜のイオン透過性の変化が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is clarifying the changing of the firing properties of central vestibular neurons induced by temporal circulation ischemia. We use perfusion system of Oxygen-Glucose Deprived external solution for acute brain slices of the rat to mimic the ischemic insult. At beginning, we tested spontaneous firings in neurons in the vestibular nucleus in rat acute slices of brainstem using whole-cell patch-clamp recording. Vestibular neurons were current-clamped. Next, we applied Oxygen-Glucose Deprived external solution. The firings of vestibular neurons were decreased during ischemic stimulation. This result indicated that vestibular neurons were hyperpolarized by Oxygen-Glucose Deprivation (ODG). The mechanisms underlying the hyperpolarization of vestibular neurons are thought to be ODG-induced changing of the membrane properties of cation permeability and increase in inhibitory inputs from presynaptic neurons.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：前庭神経核 虚血 パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳障害の約 20%は椎骨脳底動脈領域で発生すると考えられている。臨床的には、高齢者において頻発するめまい発作のうち、中枢性めまい所見を呈するが MRI 画像上脳梗塞像が確認できない症例に対し、しばしば椎骨脳底動脈循環不全症と診断される。椎骨脳底動脈循環不全症は、一過性脳血流減少による梗塞を伴わない脳神経の代謝障害と定義されている。椎骨脳底動脈循環系は、末梢迷路、第 8 脳神経、脳幹（小脳、後頭葉を含む）などに血流を供給しているため、椎骨脳底動脈系循環不全では、第 8 脳神経や末梢器（迷路）に起因するさまざまな機能障害が理論上生じうるが、実際には、中枢性めまいのみが観察される症例が大多数である。これは、椎骨脳底動脈系における虚血性機能障害が前庭神経核で生じ易い事を示唆しており、原因として、前庭神経核領域が脳幹において広範囲であること、および前庭神経核神経細胞が他領域の神経細胞に比べ虚血に対する脆弱性を持つことが考えられている。以上の病態生理は、椎骨脳底動脈循環不全症におけるめまい発作のメカニズムとして広く受け入れられている。しかしながら、一方で、前庭神経細胞の虚血に対する脆弱性を示す生理学的根拠は、未だ明確には示されていないのが現状である。実際、虚血による脆弱性は海馬や大脳皮質、あるいは小脳皮質で、主にアポトーシスといわれる遅発性神経細胞死に関連した研究としてさまざまな関連要素が論文として証明されているが、脳幹細胞に関して明確に証明した論文は今だ認めない。従って、本研究では、一過性虚血を動物モデルにおいて実験的に再現し、それに伴う前庭神経細胞の興奮性変化を電気生理学的に解析することで、前庭神経細胞の虚血に対する脆弱性を直接的に証明し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究では、脳梗塞に至らない中枢性平衡障害の神経学的メカニズムの解明を目的とするため、これまでの虚血性神経障害に関する研究との大きな違いとして、虚血刺激の結果遅発性に生じる神経細胞死を対象とせず、一過性刺激による可逆的な反応としての虚血性機能障害を見出すことに主眼を置いている点が挙げられる。具体的には、前庭神経核神経細胞において、虚血時の膜電位変化に伴う発火特性の変化を検出する。これにより、前庭系神経回路において、具体的に機能障害を生じる部位が同定できる可能性がある。また、虚血性神経機能障害の細胞レベルでのメカニズムの解明は、予防を含めた新たなめまい治療法の確立にも有効であると考えられる。

2. 研究の目的

前庭神経核神経細胞において一過性脳虚血により生じる機能障害を電気生理学的手法を用いて検出し、その脆弱性を証明する。具体的目的として、スライスパッチクランプ法

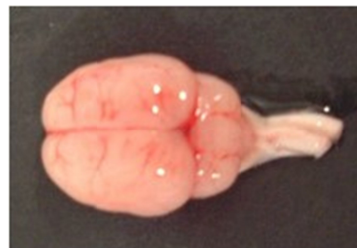
にて前庭神経核神経細胞を電流固定し、その時に記録される自発発火(spontaneous firing)を観察する。次に、低酸素低グルコース(Oxygen-Glucose Deprivation; OGD)刺激を与え、これにより生じる発火頻度の変化および発火パターンの変化を観察する。発火特性における変化発生までの時間経過を検討し、低酸素低グルコース刺激時間として至適条件を決定する。

本研究では可逆的变化を検出することを主目的にしているため、生理的条件下に戻した後の機能回復がポイントになる。刺激が強すぎると、遅発性神経細胞死の過程へ移行するため、この至適条件の決定は大切である。ここで求められた至適条件と、他の神経領域においてこれまで示されてきた虚血に対する反応と比較することで、前庭神経核神経細胞における一過性脳虚血に対する脆弱性を改めて検討する。次に、虚血性に誘導された発火特性の変化が、前庭神経核神経細胞の膜電位に与える影響を調べ、そのメカニズムを解明する。膜電位依存型イオンチャンネルにおける変化やシナプス前細胞からの入力の変化などが検討項目として挙げられる。膜電位依存型イオンチャンネルには、ナトリウムチャンネルを代表として、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネルなどがある。興奮性変化は主に、ナトリウムやカルシウムなどのカチオンチャンネルの開閉に起因することが多い。一方、抑制性変化はカリウムチャンネルやクロライドチャンネルが寄与することが多い。虚血性変化が膜電位に脱分極性に生じるのか、それとも脱分極性に生じるのかによって、注目すべきイオンチャンネルは上記の如く異なると予想される。

このように、中枢系の前庭神経細胞において、細胞膜レベルで虚血時の変化を明らかにすることで、局所的な神経細胞に対する反応が前庭系回路をどのような影響を与えるかを考察し、一過性循環不全におけるめまい発作の病態生理と結びつけることを最終目的とする。

3. 研究の方法

生後 14~21 日齢ラットを使用する。スライスパッチクランプにおいて適正な記録条件を得るには日齢 30 日未満が望ましく、ほぼ成体と同等のシナプス連絡の完成する生後 2~3 週齢がスライスパッチクランプによる電気生理実験には望ましいとされる。すばやく脳を取り出し(図 1) 4 のスークロース細胞外液に 5 分間浸す。4 の細胞外液に酸素 95%、二酸化炭素 5%の混合ガスをバブリングし、その外液に浸した状態でスライサー台へマウント固定する。(図 1)



スライス切片は250マイクロメートル程の厚さで切り出す。この厚さは水平断において、前庭神経核における交連線維はある程度温存される厚さである。作成されたスライス切片はラット1固体に対して6枚程度あり、これを常温(22度)の酸素にてバブリングを行っている細胞外液内で保存する。4~8時間は電気記録可能である。

電気記録は、スライス切片からの記録法としてホールセルパッチクランプ法(Edwards et al., 1989)を用いた。記録条件下ではインラインヒーターにより細胞外液は36℃に維持された。細胞内液を注入した状態で5MG程度の抵抗をもつガラス電極を作成する。細胞内液は、膜電位固定記録の場合はセシウム基調の内液を使用し、膜電流固定記録の場合はカリウム基調の内液を使用した。セシウム基調にする主目的はナトリウムチャネルを介する脱分極を抑制し、より安定した膜電位固定を再現するためであり、また膜電流固定記録では細胞の発火を観察する都合上、生理条件下に近いカリウム基調の内液を必要とする。

顕微鏡下 IR-DIC の視野にてスライス上の前庭神経核神経細胞を同定する(図2)。

図2



ホールセル状態が完成した後、まず、静止膜電位を記録する。グリア細胞の場合、この静止電位は-80mV程度と非常に低く、自発発火も観察されない。また、入力抵抗も極めて低いことから、ホールセル状態にした時点で、記録細胞が神経細胞か否かは判定可能である。

膜電位固定あるいは膜電流固定下に10分程度記録し、細胞の状態が安定しているかを確認する。安定していれば、次に、細胞外液を無酸素無グルコース外液と交換することで虚血状態を再現する。無酸素無グルコース外液は、通常使用する生理的細胞外液のグルコースをシュークロースに同等の浸透圧で変更し、酸素95%、二酸化炭素5%の混合ガスの代わりに窒素95%、二酸化炭素5%の混合ガスでバブリングを行う。この無酸素無グルコース外液をペリスターポンプにて記録バス内へ還流させる。本実験のシステムでは、無酸素無グルコース外液の還流開始から完全に置き換わるまでの時間は1分程度であった。

自発発火を観察する電気記録条件下では、prototoxin 100 μMを含む細胞外液を常時使

用し、GABA_A受容体を介した電流を抑制した。前庭神経核神経細胞は外部からの入力がか断された状態でも自発発火を観察できる。この自発発火における発火頻度の基準として、細胞外液を無酸素無グルコース外液に変更した際の変化を解析する。変化が生じた後は、細胞外液を生理的外液へ戻し、変化が回復するかを確認する。虚血刺激が生じるまでの時間のほか、回復までの時間経過を調べる。

次に、これらの変化が生じた細胞において虚血刺激条件の至適条件を決定する。従来からの研究では10分以上の虚血刺激はアポトーシスを誘導する細胞内シグナル伝達が活性化する可能性が示唆される。本研究では一過性可逆性の虚血による神経細胞機能障害を観察することが目的であるため、過度の虚血刺激は避けなくてはならない。この過程により、無酸素無グルコース外液による刺激時間の実験条件を固定し、以下の細胞膜レベルでの機能障害発生のメカニズムへ実験を進める。

虚血刺激に対する発火頻度や発火特性の変化は、神経細胞の細胞膜への影響による。その詳細を検討するために、次に膜電位固定化に記録し、虚血刺激による膜電位変化を調べる。具体的には-70mVにホールセル電位固定し、無酸素無グルコース外液刺激を行う。薬理的に目的のイオンチャネルを同定し、その活性化や不活性化の状態を検討する。

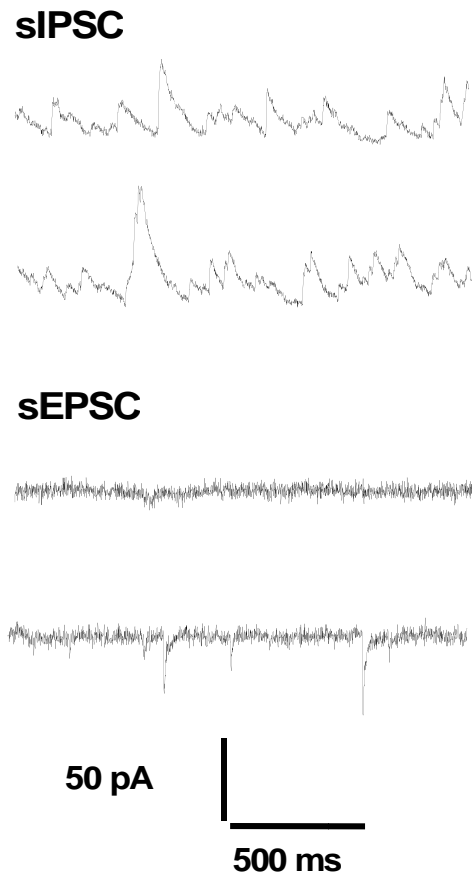
4. 研究成果

(1) 本研究では、まず前庭神経核神経細胞をホールセルパッチクランプ記録を行った。生理的実験状態がこれまでの報告と同等であることを確認するために、当施設でこれまで記録経験のある前庭神経細胞自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)および自発性抑制性シナプス後電流(sIPSC)を記録した。+40mVおよび-70mVの膜電位固定化に、自発性抑制性シナプス後電流(sIPSC)は外向き電流として、一方、自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)は内向き電流として記録される。脳幹水平断によるスライス切片では、自発性抑制性シナプス後電流(sIPSC)は比較的大きな振幅で高頻度に観察された(図3上段トレース)。これに対して、自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)は非常に小さな振幅で低頻度に観察された(図3下段トレース)。

過去の研究では、前庭神経核神経細胞におけるsEPSCとsIPSCのamplitudeとfrequencyに関して、-60mVの膜電位固定でそれぞれ、 13.9 ± 1.9 pA, 1.5 ± 0.4 Hz, 18.1 ± 2.0 pA, 4.3 ± 0.9 Hzとした報告がある(Chun SW et al., 2003)。本実験で得られた値は、sEPSCとsIPSCのamplitudeとfrequencyのそれぞれは、 15.9 ± 0.6 pA, 3.1 ± 0.4 Hz, 39.2 ± 0.6 pA, 15.0 ± 2.3 Hzであった。スライス切片における前庭神経核の神経細胞では、抑制性入力に優位であり、これまでの前庭神経核に関する研究でも、対側の前

庭神経核から興奮性入力を受ける interneuron が前庭神経核の神経細胞近傍に存在し、その intrinsic な興奮性に関して高度に抑制性制御されているが示されている (Shimazu H, Precht W, 1966)。これらの結果は、これまでの生理的実験条件下の記録結果と合致し、本実験条件が生理的なコントロール条件を持つことと判断した。

図 3



(2) 次に、本題となる虚血条件下の発火頻度の変化を記録する。まず、前庭神経核神経細胞をホールセルパッチクランプ行う。前庭神経核神経細胞は外部入力なしに自発発火する性質を持ち、実際に規則的な自発発火が観察された (図 4 上段)。規則性は、発火頻度はスパイク間のインターバル時間を測定し、変動係数 CV (coefficient of variation) 値を算出して検討した。記録した前庭神経細胞の発火頻度は regular spike neuron に相当し、前庭神経核からの projector neuron であると考えられた。平均発火頻度は 6.9 ± 1.9 Hz であった。

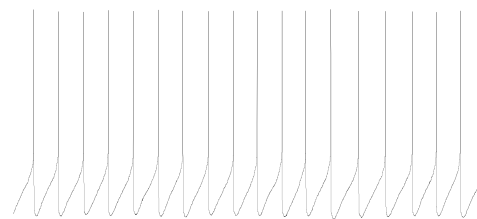
生理的条件下に 10 分間程度連続的に記録し、記録した神経細胞が示す発火頻度が安定していることを確認後、無酸素無グルコース細胞外液の還流を行った。すると、数分間の投与で自発発火が停止した (図 4 中段)。その後、生理的細胞外液に戻し還流を継続したところ、再び自発発火が出現し、最終的に元

の発火頻度を示す状態まで回復した (図 4 下段)。

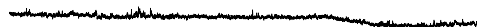
次に、このような一過性虚血刺激により、前庭神経核神経細胞の発火頻度低下を示す条件を検討した。複数の神経細胞における実験結果から、平均 5 分程度の無酸素無グルコース細胞外液の還流で同様の現象が観察された。また、その条件下では、虚血刺激後に生理的細胞外液の再灌流を行い、10 分程度の時間経過の後、個々の神経細胞の持つ発火頻度の回復が確認された。15 分以上の虚血刺激の際は、その後の発火頻度の回復が確認できない細胞も出現し、不可逆的な神経障害が生じたことが示唆された。

図 4

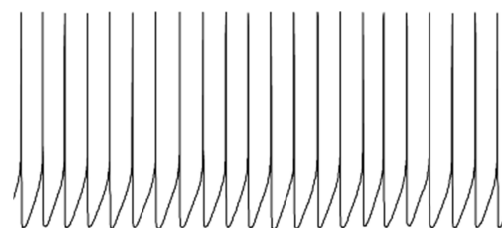
Control



OGD



Washout



20 mV

1 sec

本研究は一過性虚血刺激による可逆的な神経障害のメカニズムの解明を目的としているため、5 分間の無酸素無グルコース細胞外液の還流が実験条件として適していると判断した。

次に、この刺激条件を用いて、前庭神経核神経細胞をパッチクランプ法で膜電位固定し変化を観察した。結果、一過性虚血刺激中に細胞膜の過分極が観察された。このことより、細胞内メカニズムとして、シナプス前細胞からの抑制性刺激が増加することや細胞膜自身のイオン透過性が変化することが示唆された。前者においては、本研究の実験条件として、作成された脳幹スライス切片にお

いては、対側からの抑制性交連線維の入力がかなり保存されており、抑制性介在ニューロンの興奮性の変化が生じている可能性が考えられた。後者に関しては、ATP 依存性のカリウムチャネルなどの関与が示唆され、それぞれ今後の実験テーマと考えられた。

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 1 件)

1. Shino Masato, Yasuoka Yoshihito, Murata Takaaki, Ninomiya Hiroshi, Takayasu Yukihiro, Takahashi Kastumasa, Chikamatsu Kazuaki. Improvement of tracheal flap method for laryngotracheal separation. **Laryngoscope** 123:440-445, 2013
査読有

[学会発表](計 6 件)

1. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、高橋克昌、近松一朗 群馬大学における頭頸部非扁平上皮癌に対する重粒子線治療成績
第 114 回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(札幌) 2013 年、5 月 18 日
2. 高安幸弘、紫野正人、斎藤彩子、岡宮智史、高橋克昌、宮下元明、古屋信彦 無酸素無グルコース刺激による NMDA 受容体を介した前庭小脳 unipolar brush cell の自発発火の増強
第 71 回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会(東京) 2012 年、11 月 29 日
3. Takayasu Yukihiro, Shino Masato, Chikamatsu Kazuaki
Ischemia-induced transient enhancement of spontaneous excitatory synaptic events in Purkinje cells in the uvula-nodulus depend on regional distinction of excitability in granule cells and unipolar brush cells.
Neuroscience 2012, New Orleans, USA, October 13, 2012
4. 高安幸弘、高橋克昌、岡宮智史、宮下元明、近松一朗 診断に苦慮している難治性頭位めまいの 1 症例
第 101 回 日本耳鼻咽喉科学会群馬県地方部会学術講演会(前橋) 2012 年 7 月 29 日
5. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、高橋克昌、近松一朗、白井克幸、齋藤淳一、大野達也、中野隆史
群馬大学耳鼻咽喉科における重粒子線治療の経過報告～悪性黒色腫症例以外を中心に～
第 100 回 日本耳鼻咽喉科学会群馬県地

方部会学術講演会(前橋) 2012 年 4 月 8 日

6. 高安幸弘、紫野正人、古屋信彦
前庭小脳 unipolar brush cell における発火特徴と無酸素無グルコース刺激に対する感受性
第 70 回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会(千葉) 2011 年、11 月 17 日

[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]

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高安 幸弘 (TAKAYASU YUKIHIRO)
群馬大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70375533

(2) 研究分担者 該当なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 該当なし
()

研究者番号：

