

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700307

研究課題名(和文) 脳保護に関わる黒質網様部神経細胞のグルコース濃度及び温度依存的自発発火活動の解析

研究課題名(英文) Metabolism dependent regulation of spontaneous firing in SNr GABAergic neurons for cerebroprotection

研究代表者

長友 克広 (NAGATOMO, KATSUHIRO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30542568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳の異常興奮を抑制する機能を有する黒質網様部GABAニューロンについて、温度低下と自発発火の関係を詳細に解析すると共に、温度感知に関与する分子の同定を目指した。電気生理実験に際して細胞障害と推定される事象を解決できなかったため本研究の核心に迫ることができなかった。しかしながら、組織レベルではあるがSNrにおける温度感受性TRPチャンネルのmRNA発現強度について、また標的細胞に関するサブポピュレーションの存在について、示唆レベルではあるが新知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia, hypoglycemia and hypothermia induce many aversive effects to the brain. Under hypoxia condition, GABAergic neurons in substantia nigra pars reticulata (SNr) stop their firing for protecting the brain from the abnormal hyperactivity. Recently, we found that decrease of extracellular glucose concentration and temperature also affects to the spontaneous firing of SNr GABAergic neurons. The present study focused on a mechanism underlying the cessation of spontaneous firing of SNr GABAergic neurons under hypothermia condition with various extracellular glucose concentrations. Under temperature-controlled electrophysiological recordings, shrinkage of the cells could not be avoided. Some damages including enzymatic treatment, phototoxicity, thermal damage, etc. were assumed for the shrinkage. However, some suggestive results for SNr GABAergic neurons were obtained. Further, mRNA expression of temperature-dependent TRP channels in SNr tissue levels was analyzed.

研究分野：神経生理

キーワード：自発発火 グルコース 温度 黒質網様部

本研究は「中脳黒質網様部 GABA 作動性ニューロンの代謝依存的自発発火制御機構の解明(代表:長友、課題番号:21890007、若手研究(スタートアップ))」で得られた知見をもとに着想した。

## 1. 研究開始当初の背景

中脳黒質網様部(SNr)の GABA 作動性ニューロンは運動制御に関わる大脳基底核の情報処理シグナルを上丘、視床、脳幹に送る最終出力の役割を担っている (Graybiel, A.M. et al., *Science*, 1994; Hikosaka, O. et al., *Physiol Rev*, 2000; Middleton, F.A. & Strick P.L., *Brain Res Rev*, 2000)。また、SNr はてんかんの一種である全般発作(異常興奮)の成立に深く関係している部位で、薬理的に、GABA 作動性ニューロンの活動停止により、発作が抑制されることが知られている (Iadarola, M.J. & Gale, K., *Science*, 1982)。さらに SNr は酸素センサーとして働いており、低酸素状態では、この SNrGABA 作動性ニューロンに発現する ATP 感受性カリウムチャネル( $K_{ATP}$  チャネル)が開いて膜電位が深くなり、発火活動の低下をもたらすことで全般発作が抑制され、脳保護の役割を果たす (Yamada, K. et al., *Science*, 2001)。

一方、H21・22 年度科研費研究活動スタート支援「中脳黒質網様部 GABA 作動性ニューロンの代謝依存的自発発火制御機構の解明」(代表:長友、課題番号:21890007)の研究過程で、マウスの SNr から急性単離した GABA 作動性ニューロンが 20 台前半という低温状態で、膜電位の低下に伴い、自発発火が停止し、復温により発火が回復することを見出した。しかし SNrGABA 作動性ニューロンが、非生理的な低温下で発火停止して脳を保護するとは考えにくく、何か理由があると推定した。

興味深いことに、中脳黒質網様部(SNr)GABA 作動性ニューロンの発火頻度は、細胞外グルコース濃度の変化によって影響される (Yuan, H. & Yamada, K., *Neurosci Lett*, 2004; Velisek, L. et al., *J Neurosci*, 2008)。実際、室温(25 )下の *in vitro* 実験において、細胞外グルコース濃度を通常用いられる 10 mM から種々に低下させると、急性単離 SNrGABA 作動性ニューロンの膜電位は記録した全例で浅く(脱分極)なった(菅と山田 2009)。また、脳スライスを用いた SNr からの単一細胞記録(33 )では、細胞外グルコース濃度の

低下に伴い、GABA 作動性ニューロンの自発発火頻度は増加する。しかし細胞外グルコース濃度が極端に低下した 1 mM 条件下では、高頻度発火の後、発火が停止する (Yuan, H. & Yamada, K., *Neurosci Lett*, 2004)。ここで脳の細胞外グルコース濃度は、*in vivo* では 2 mM もしくはそれ以下との報告もある (During, M.J. et al., *J Clin Invest*, 1995; Silver, I.A. et al., *J Neurophysiol*, 1998)。従って SNrGABA 作動性ニューロンは、生理的状态では膜電位がより浅く、自発発火が停止する温度域も *in vitro* 実験の結果とは異なっている可能性がある。

さらに、脳にとってグルコースは唯一のエネルギー源であり、生体内のグルコースが極端に低下する状態では、体温低下と昏睡を引き起こすことが知られており、また実際、哺乳類(ヒト、ラットなど)や両生類(カエル)において、血糖低下作用のあるインスリンや、生体内では代謝されないグルコース類縁体の 2-deoxy-D-glucose の投与によって、体温低下が認められる (Mayer-Gross, W. & Berliner, F., *Br J Psychiatry*, 1942; Fiorentini, A. & Muller, E.E., *J physiol*, 1974; Rocha, P.L. & Branco, L.G.S., *Comp Biochem Physiol*, 1998)。このように生体内でグルコース濃度と体温が相互に関係していることや、実際に SNrGABA 作動性ニューロンの自発発火がグルコース濃度の低下や温度低下によって停止することからも、酸素だけでなく、グルコース濃度や温度も、SNrGABA 作動性ニューロンの脳保護機能を発動する重要な因子であると考えられる。

しかし、これまでにニューロンの細胞外グルコース濃度と温度の両者を変化させて自発発火活動の変化を解析した報告はなく、詳細に解析することで有益な知見が得られるのではないかと予想された。

## 2. 研究の目的

急性単離した SNrGABA 作動性ニューロンの自発発火頻度および膜電位を細胞内環境に影響を与えないグラミシジン穿孔パッチクランプ法によりモニターしながら、種々の細胞外グルコース濃度にて、灌流液の温度を 37 から低下させ、自発発火が停止する温度を解析する。また温度を生体シグナルに変換する分子である温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャネルを標的分子として、候補分子となる mRNA の発現

解析をリアルタイム RT-PCR 法により、組織レベルおよび単一ニューロンレベルで行い、低温下で脳保護機能を発動する分子を同定することを当初の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 実験系の確立

記録用チャンバー形状を最適化し、温度コントローラーのキャリブレーションを行う。

急性単離した SNrGABA ニューロンを同定するために Venus で蛍光標識した TG マウスを使用する。

種々の細胞外グルコース濃度環境下で、灌流液温度を 37 から徐々に下げていき自発発火が呈する温度を検討する。また細胞内環境に影響を与えないグラミシジン穿孔パッチクランプ法で電気生理記録を行う。

SNr 組織レベルで温度依存性 TRP チャンネルの mRNA 発現をリアルタイム PCR により検討する。

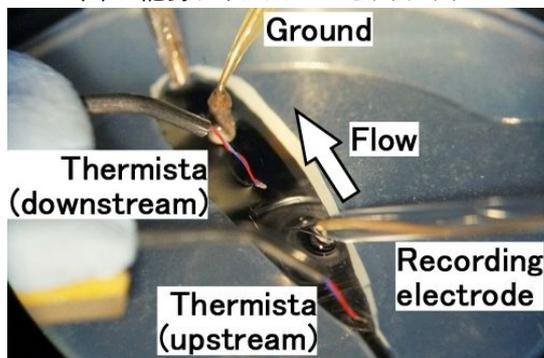
上記 で検出された mRNA につき、急性単離ニューロンから Single-cell リアルタイム RT-PCR 法により、mRNA の発現解析を行う。

### 4. 研究成果

#### 実験系の確立

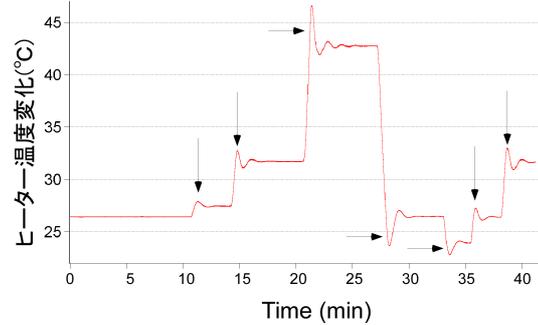
図1にあるような形状の流路を作成し、記録領域の上流と下流に高感度極細サーミスタを配置し、リアルタイムに正確な温度変化を記録できるようにした。流路の水深は 1mm 程度である。また、この流路に収まるように小さく切断したカバーガラス上に細胞を急性単離し、電気生理を行っている。

図 1: 記録チャンバーのセットアップ



急速な温度変化を行うと図 2 矢印部分のように、意図せず設定温度よりも高温もしくは低温にドリフトしてしまうため、温度変化速度の最適化を行った。初期は手動で行っていた操作を、コマンドにより一定速度でドリフトが発生せずに行えるようにした。

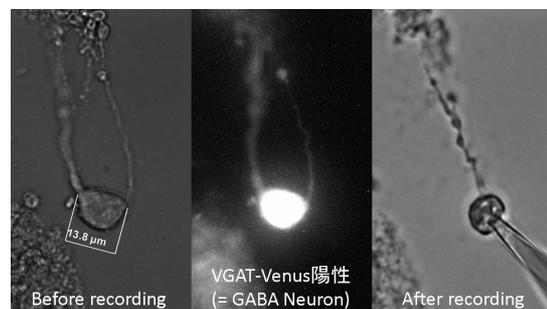
図 2: 温度のドリフト



#### 蛍光による細胞同定とグラミシジン穿孔パッチクランプ法

図3に示すように SNrGABA ニューロンを蛍光タンパクにより同定を行った。温度実験前後、特にパッチ電極をニューロンに接触させてから、グラミシジン穿孔を確立させるまでにしばらく時間を要する(室温化)。その後、37 にて発火が安定するまで待ち、徐々に温度を下げていく。しかしながら、37 に維持すると、膜電位が浅くなり、発火しなくなる。この状態から室温に戻しても自発発火が回復することはない。おそらく機械的な刺激と、高頻度自発発火による代謝亢進、酵素処理の影響などによるものと考えられる。

図 3: 温度実験前後の細胞形態変化



#### 温度依存性 TRP チャンネル mRNA 発現解析 (SNr 組織レベル)

SNrGABA ニューロンの温度感知に關与する分子を既知の温度感受性 TRP チャンネルに限定して、発現解析を行った。TRPV1(活性化温度域: 42 以上)以外の、TRPV2(52 以上)、TRPV3(33 以上)、TRPV4(27 ~ 42 付近)、

TRPM8(25 以下)、TRPA1(17 以下)が発現していることが分かった。記録ニューロンからの mRNA 採取に関して、細胞が Shrink している状態の良い mRNA が採取できないため、単一細胞における mRNA 発現解析は行うことが出来なかった。本来であれば、温度実験の後、mRNA 解析を行い、温度閾値と発現している分子の関係を解析する予定であった。

#### 黒質網様部 GABA ニューロンのサブポピュレーション

論文投稿前なので、指標にした分子は Molecular X として表記する。免疫染色および Single-cell real time RT-PCR 法により、2 割程度でサブポピュレーションが存在する可能性が示唆された。機能的な意義については今後の課題としたい。

#### 5. 今後の展望

本研究期間内では温度実験の記録前後で細胞が縮んでしまう現象を回避・改善することができなかった。高頻度自発発火する SNrGABA ニューロンが温度に対して脆弱であるのか、それとも蛍光標識による細胞同定を行っているせいで意図しない光毒性によるものなのか、はたまた単離作業の酵素処理によって脆弱性が增大しているだけなのか、様々な要因が考えられる。グラミジンをを用いないホールセルパッチクランプ法では、しばしば Shrink を散見するが、通常の室温下で WT マウスのニューロンを用いた実験では、特に Shrink するような事例を記憶していない。

単一細胞レベルになると、組織レベルで観察された現象とは異なる挙動を示し、性質も変化することが考えられる。

脳スライスパッチクランプ電気生理記録でも、SNrGABA ニューロンは長く持たないということも聞くので、何かしら別法により実験を進める必要があると考えられる。

いずれにせよ、「脳保護」という重要な機能を有する SNrGABA ニューロンの温度依存性と活動性を代謝という観点から、今後も研究を続けていく。

#### 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)

Kurogi M, Kawai Y, Nagatomo K, Tateyama M, Kubo Y, Saitoh O. Auto-oxidation products of epigallocatechin gallate activate TRPA1 and TRPV1 in sensory neurons.

Chem Senses, 40: 27-46, 2015.

DOI: 10.1093/chemse/bju057.

Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, Aosaki T, Abe T, Kiyonari H, Kino Y, Kurosawa M, Shimizu J, Ogiwara I, Yamakawa K, Koshimizu Y, Fujiyama F, Kaneko T, Shimizu H, Nagatomo K, Yamada K, Shimogori T, Hattori N, Miura M, Nukina N. Singular localization of sodium channel  $\alpha$ 4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum.

Nat Commun, 5: 5525, 2014.

DOI: 10.1038/ncomms6525.

#### (学会発表) (計 6 件)

山田 勝也、長友 克広

大脳基底核におけるアストロサイトの領域特異的ドーパミン受容体発現

第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

長友 克広、菅 世知子、山本 欣郎、山田 勝也

成熟マウス脳アストロサイトの領域特異的ドーパミン受容体発現

第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

長友 克広、菅 世知子、山本 欣郎、山田 勝也

成熟マウス脳アストロサイトの領域特異的 D1 ドーパミン受容体発現

第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

長友 克広、菅 世知子、山本 欣郎、山田 勝也

中脳黒質網様部細胞のドーパミン D1 受容体発現解析

第 45 回東北生理談話会、2013 年 10 月 5

日、東北大学片平キャンパス生命科学プロジェクト総合研究棟(宮城県・仙台市)

長友 克広、菅 世知子、山田 勝也  
成熟マウス黒質網様部単一細胞における  
D1ドーパミン受容体の発現解析  
第 36 回日本神経科学学会、2013 年 6 月  
22 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

長友 克広、菅 世知子、山田 勝也  
成熟マウス黒質網様部に発現するドーパミン受容体遺伝子の Single cell リアルタイム RT-PCR 法による解析  
第 35 回日本神経科学学会、2012 年 9 月  
21 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

[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]

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/physio1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長友 克広 (NAGATOMO KATSUHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30542568

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし