

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791744

研究課題名(和文) 虚血に対する内側前庭神経核ニューロンの一過性過分極メカニズム

研究課題名(英文) Transient hyperpolarization mechanism of the medial vestibular nucleus neurons to ischemia

研究代表者

紫野 正人 (Shino, Masato)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20550015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：眼振発現の中心的役割を果たす内側前庭神経核ニューロンに一過性虚血を与えた時の自発発火の変化をパッチクランプ法により、電気生理学的側面から観察した。持続的に自発発火するニューロンは一過性虚血により一時的に膜電位が過分極して自発発火を停止したが、生理的条件に戻すと速やかに発火は再開した。この現象はシナプス伝達を遮断しても観察されることから、ニューロン自身の内因性膜特性によるものと考えられた。さらにこの一過性過分極は、ATP感受性カリウムチャネルによる外向きカリウム電流によるものであることを薬理的に確認した。また、ニューロンタイプ別にはタイプBニューロンの方がタイプAより虚血に鋭敏に反応した。

研究成果の概要(英文)：We investigated electrophysiological response of MVN (Medial Vestibular Nucleus) neurons for transient ischemia. Transient ischemia induced transient hyperpolarization and pause of spontaneous firing. Transient hyperpolarization was attributed to intrinsic membrane property of MVN neurons. ATP sensitive potassium channel blocker, glibenclamide inhibited ischemia-induced transient hyperpolarization.

研究分野：医歯薬学 耳鼻咽喉科

キーワード：内側前庭神経核 虚血 パッチクランプ 発火特性

### 1. 研究開始当初の背景

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により ADL(Active Dairy Life)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 や 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 8 脳神経、脳幹、小脳などに広く血液を供給しており、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、実際の日常診療では、メマイ単独の症状を呈すること少なくない。さらに出現する眼振は、定方向性で水平回旋混合性眼振が多い。そこで本研究では、椎骨脳底動脈灌流域に存在し、眼球運動に関与する脳幹神経核である前庭神経核、中でも内側前庭神経核 (Medial Vestibular nucleus; MVN) に着目した。なぜなら、内側前庭神経核は水平性前庭動眼反射の反射中枢であると同時に、水平半規管からの頭部回転速度情報をそれに対応した眼球位置情報へと変換して出力するという神経積分器 (neural integrator) として、近傍の舌下神経前位核 (Prepositus Hypoglossi Nucleus; PHN) とともに機能しており、当該部位の一過性虚血による機能低下が椎骨脳底動脈循環不全症 (VBI) における眼振解発の直接的なメカニズム理解となるからである。これまでの予備実験の結果から、内側前庭神経核ニューロンに一過性虚血負荷、すなわち、5 分間の無酸素無グルコース (Oxygen-Glucose Deprivation; OGD) 負荷を与えると、膜電位が過分極して自発発火を休止し、生理的条件下に戻すと速やかに脱分極して発火が再開することを我々は報告してきた。虚血に伴って生じる自発発火停止の原因である、内側前庭神経核ニューロンの過分極の機序を究明することが椎骨脳底動脈循環不全症 (VBI) におけるメマイ・眼振解発のメカニズム理解のために重要であると考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

内側前庭神経核ニューロンは椎骨脳底動脈循環不全症 (VBI) を模倣した一過性虚血負荷を受けると膜電位が過分極して自発発火を休止し、生理的条件下に戻すと速やかに回復する。このような発火様式の変化が生じるメカニズムについて、スライスパッチクランプ法を用いて経時的に解析し、その詳細を解明する。これにより、椎骨脳底動脈循環不全症 (VBI) における眼振発現のメカニズムがニューロンレベルで明らかになり、さらなる病態の理解と、新たな薬剤やメマイ治療法の開発に寄与できる。

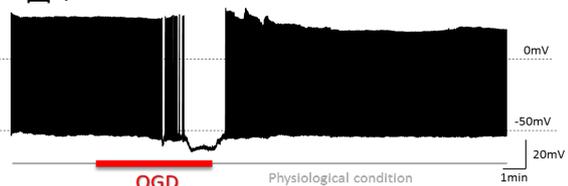
### 3. 研究の方法

内側前庭神経核ニューロンが虚血に対して過分極するメカニズム (= 自発発火停止の原因) についてスライスパッチクランプ法にて電気生理学的な側面から解析を行う。3 週齢のウイスターラットの脳幹から、内側前庭神経核を含む脳幹スライス標本を  $250\ \mu\text{m}$  の厚みで作成し、顕微鏡下にガラス管電極を用いてニューロンにアクセスする。一過性虚血として、スライスを灌流する乳酸リンゲル液中の酸素とグルコースを抜いた溶液を 5 分間 (無酸素無グルコース (Oxygen-Glucose Deprivation; OGD)) を用いた。まず生理的条件下で、ニューロンの発火パターンやスパイク幅、スパイク生成閾値などのパラメータに関しての測定を行う。記録しているニューロンの状態は細胞膜を rupture した時の静止膜電位が  $-50\text{mV}$  以下であること、スパイクの高さが  $0\text{mV}$  をこえ、十分にオーバーシュートしていることにより確認する。内側前庭神経核ニューロンは、type A ニューロン、type B ニューロンとこれまでの報告 (Sefarin et al. Exp. Brain Res., 1991a,b, Johnston et al. J Physiol., 1994) から二つに大別されることが多い。この分類方法は intracellular recording の報告であり、今回我々の採用した実験方法であるパッチクランプ法を用いたものではない。パッチクランプ法を用いた研究でも内側前庭神経核ニューロンの分類はなされているが、それらの報告では多様な膜特性を持つ多くのニューロン群から構成されているとされている (Sekirnjak et al. J Neurosci. 2002, Takazawa et al. J Neurophysiol., 2004)。しかしながら、内側前庭神経核のニューロンタイプについては、多くの研究者が前者を採用しているため、本研究でも、前者の分類に従うこととした。一定時間の自発発火記録の後、無酸素・無グルコース (OGD) の細胞外液を 5 分間、脳幹スライスに還流させ脳虚血状態として、生理的条件下での各種パラメータと比較を行った。

### 4. 研究成果

5 分間 OGD 刺激により、前庭神経核ニューロンは一時的に過分極し、自発発火を休止する。しかし、灌流するリンゲル液を生理的条件下に戻すことで膜電位は速やかに回復し、自発発火を再開した。(図 1)

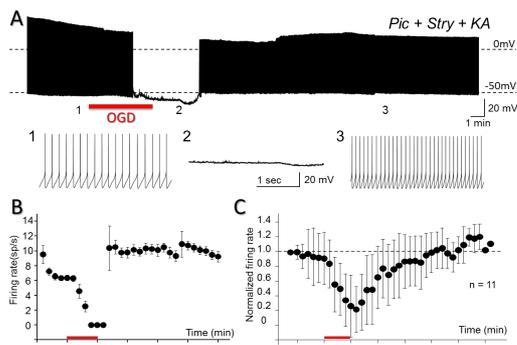
図 1



次に、この一過性過分極とそれに引き続いて生じる自発発火の停止が内側前庭神経核ニューロンへの外的な要因で生じるのか、あるいはニューロンの内因性膜特性変化によ

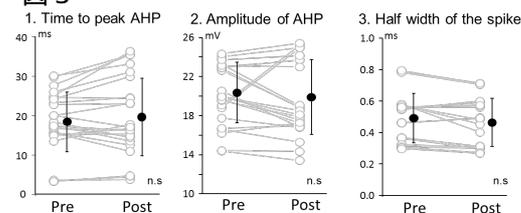
って生じるのかを確かめるため、ニューロンに入力する興奮性あるいは抑制性神経伝達を薬理的に阻害した状態で、同様の実験を行った。具体的には、興奮性（グルタミン酸作動性）入力遮断のためにキヌレン酸あるいは NBQX と APV を、抑制性（GABA・グリシン作動性）入力遮断のためにピクロトキシンとストリキニンを灌流液に投与した。この条件下においても、一過性虚血に対して内側前庭神経核ニューロンは過分極とそれに引き続いた自発発火の停止、生理的条件下に戻すことで自発発火の再開が観察された（図 2 A, B）

図 2



この自発発火の変化は、他の内側前庭神経核ニューロンにおいても認められた（図 2 C）。このことから、内側前庭神経核ニューロンに 5 分間の一過性虚血を与えた時の変化は外的要因に依存しない、ニューロンの内因性膜特性変化により生じることが示唆された。また、このときの活動電位形状についても検討した。後過分極までの時間（図 3-1）、後過分極の振幅（図 3-2）、スパイク幅（図 3-3）は虚血前後で有意な変化がなかった。

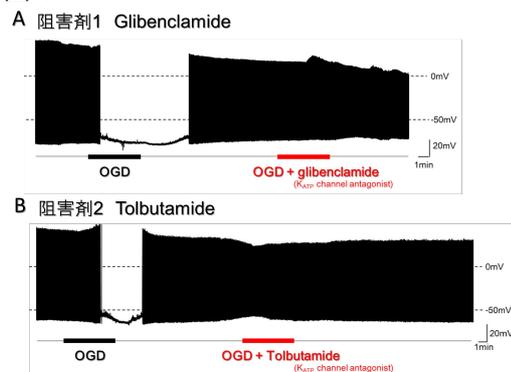
図 3



次の段階として、一過性虚血に対するニューロンの膜電位の一過性過分極が何に起因するかについて実験を行った。一過性虚血はニューロンにとってはエネルギー不足であり、ニューロン内 ATP の枯渇に他ならない。一方、ニューロンの静止膜電位は内側前庭神経核に限らず、ひろく、カリウムイオンにより規定されていることが多い。ATP とカリウムに関連したチャンネルとして、第一候補に挙がるものが、ATP 感受性カリウムチャンネル（ $K_{ATP}$  チャンネル）である。ATP 枯渇により  $K_{ATP}$  チャンネルが開いてニューロン外へカリウムイオンが流出することで膜電位の過分極が生じている可能性を推測した。このことを確認するために、 $K_{ATP}$  チャンネルの阻害剤である glibenclamide と tolbutamide 存在下で、一過性虚血負荷を与えた時の前庭神経核二

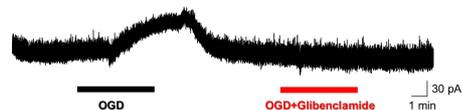
ューロンの膜電位変化を記録した。どちらの阻害剤を用いても、 $K_{ATP}$  チャンネルをブロックした状態では、一過性虚血に対しても、内側前庭神経核ニューロンは過分極することなく、自発発火を継続した（図 4）

図 4



$K_{ATP}$  チャンネルを介した外向きカリウム電流を直接確認するために、パッチクランプの電圧固定法で電流を測定したところ、45pA 程度の外向きカリウム電流が測定された。この虚血による外向きカリウム電流は、 $K_{ATP}$  チャンネル阻害剤である glibenclamide 存在下ではブロックされた（図 5）ことから、 $K_{ATP}$  チャンネルを介する電流であることが解明された。（図 5）

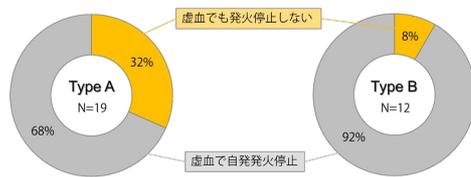
図 5



以上の実験より、「内側前庭神経核ニューロンは一過性虚血に対して、自身の内因性膜特性により、膜電位を一時的に過分極させて自発発火を停止する。さらに、この過分極は ATP 感受性カリウムチャンネル（ $K_{ATP}$  チャンネル）を介しての外向きカリウム電流によるものである。」という結果がえられた。

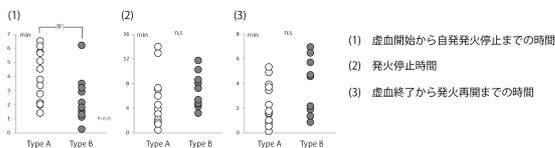
次に、内側前庭神経核ニューロンの発火特性による虚血への反応性の差異について実験を行った。前述のごとく、内側前庭神経核ニューロンは細胞内記録法による発火特性で Type A と Type B に大別される。我々の今回の実験方法はスライスパッチクランプ法であり、本法で発火パターンを調べると Type A, B 以外の発火特性を持つニューロンが同定され、多様な分類となる。しかし、これまでの報告とのすり合わせを行い、Type A と Type B と判断されたニューロンを対象として虚血反応性を調査した。記録した MVN ニューロンは  $n=31$  で、Type A が  $n=19$ 、Type B が  $n=12$  であった（図 6）。それぞれのニューロンで虚血にしても自発発火が変化しない、つまり虚血に抵抗性のニューロンがみられた。その割合は Type A で 32%、Type B で 8%であり、Type B ニューロンの 9 割以上が、一過性虚血に対して自発発火を停止した。すなわち、Type B ニューロンの方が、虚血に対して鋭敏に反応することがわかった。

図 6



最後に、Type A ( )、B ( ) 別に、(1)虚血開始から自発発火停止までの時間、(2)発火停止時間、(3)虚血終了から自発発火再開までの時間の違いについて定量化した(図7)。虚血開始から自発発火停止までの時間(1)は Type B で有意に短かったが、その他のパラメータについては差異がなかった。

図 7



## 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. Neurosci Res. 2012 May;73(1):32-41.  
Characterization of ionic channels underlying the specific firing pattern of a novel neuronal subtype in the rat prepositus hypoglossi nucleus.  
Saito Y, Shino M, Yanagawa Y.  
doi: 10.1016/j.neures. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 第 42 回 北米神経科学会(ニューオリンズ) 2012 年 10 月 13~17 日  
Electrophysiological responses of the medial vestibular neurons to transient ischemia  
Masato Shino, Yukihiro Takayasu, Kazuaki Chikamatsu
2. 第 71 回 日本メマイ平衡医学会(東京) 2012 年 11 月 28~30 日  
内側前庭神経核ニューロンのタイプによる虚血に対する反応の差異  
紫野正人, 高安幸弘, 高橋克昌, 近松一朗
3. 第 73 回 日本メマイ平衡医学会(横浜) 2014 年 11 月 5~7 日  
セロトニン投与に対する内側前庭神経核ニューロンの膜電位変化  
紫野正人 高安幸弘 近松一朗

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
紫野 正人 (SHINO, Masato)  
群馬大学・医学部附属病院・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：