

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462230

研究課題名(和文) Ischemic Postconditioning に関する電気生理学的検討

研究課題名(英文) Ischemic postconditioning prevents presynaptic glutamate release by activating mitoKATP channels.

研究代表者

中川 一郎 (Nakagawa, Ichiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20550825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：致死的な虚血負荷の後に虚血負荷を加えることによっても神経保護効果をもたらす虚血耐性現象(PoC)の存在が近年知られている。今回我々は7.5分間の虚血負荷を与えることにより生じる伝達物質の逆説的増加がPoCにより抑制され、mito-KATP channel 開口薬及び阻害薬を投与することによってPoCと同様の抑制効果およびPoC効果がキャンセルされることを確認した。PoCにより神経保護効果が確認され、その機序としてischemic preconditioningと同様に神経シナプス前終末のmito-KATP channel が活性化が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Ischemic postconditioning is a series of brief nonfatal ischemia and reperfusion cycles applied in the early phase of reperfusion of an ischemic organ, which induces tolerance of organ against long-term ischemic injury. We demonstrate the suppression of paradoxical increase of EPSCs after ischemic insult under ischemic postconditioning. Furthermore, Diazoxide, mitoKATP channel opener, produced same preventive effects and 5-HD, mitoKATP channel blocker, abolished these preventive effects on sEPSC frequencies. These results suggested that ischemic postconditioning acted on presynaptic terminals to prevent the paradoxical increase in glutamate release during ischemia through the activation of mito KATP channels.

研究分野：脳血管障害

キーワード：Postconditioning mitoKATP channel diazoxide 5-HD cerebral ischemia

1. 研究開始当初の背景

致死的な虚血負荷の前に虚血負荷を加えることによって神経保護効果をもたらす虚血耐性現象 Ischemic preconditioning が知られている。神経細胞における虚血耐性現象は 1990 年北川らによって初めて報告され、その後高体温負荷、Spreading depression、薬剤などによっても同様の耐性現象が確認された。その機序に関しては heat shock protein(桐野ら 1991) や Na^+/K^+ ATPase(Benzeら 1993), K_{ATP} channel (Heurteauxら 1995, Riepeら 1996)、フリーラジカル(Wiegandら 1999)などの関与が示唆されているがその詳細は不明である。近年心筋細胞においてミトコンドリアに局在する K_{ATP} ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) channel が虚血耐性現象において重要な役割を果たしている可能性 (Fryerら 2000)が示唆されている。その後、脳神経細胞においても $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channel を介した虚血耐性現象が我々を含め国内外から報告されるようになった。さらに近年では ischemic preconditioning の機序に加えて虚血負荷が加わったのちのストレスが神経保護効果をもたらすという ischemic postconditioning の機序についての報告 (JCBFM 2009 Zhao et.al.)もされつつある。

2. 研究の目的

神経細胞の虚血耐性現象に関する報告は数多くされているが、電気生理学的側面からの報告は比較的少ない。パッチクランプ法は細胞膜におけるイオンチャンネルの機能をリアルタイムに計測できる手法であり、本現象の機序を解明するうえでは極めて有用なツールであると考えられる。今回我々はホールセルパッチクランプ法を用い、シナプス前終末における興奮性神経伝達物質放出頻度の計測を行うことで、マウス海馬スライスモデルにおいて神経細胞に致死的な虚血負荷を与えたのちに間欠的な虚血負荷 (ischemic

postconditioning) を与えることで、この ischemic postconditioning の機序について検討し、さらには $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channel 開口薬/阻害薬を投与することでシナプス伝達に同様の影響が及ぼされるのかについて検討を行う。

3. 研究の方法

1) C57BL マウス(3~4 週齢)を用い、全身麻酔下に断頭し素早く脳を摘出し、冷却しかつ 95%O₂ にて飽和した人工髄液に移す。(125mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.25mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 10 glucose)

2) 寒天を用いて脳を固定しスライサーを用いて 350 μm 幅に冠状断を施行する。スライスを 95%O₂ で飽和した 30~32 のチャンパーに移し 60 分間 incubation する

3) 灌流チャンパーに移し、人工髄液を還流させる。

4) 電極内液 (141mM K glucose, 4mM KCl, 2mM MgCl₂, 2mM Mg-ATP, 0.3mM Na-GTP, 10 Hepes, 0.2mM EGTA) を満たしたガラス電極 (4-6 M) を用いて CA1 錐体細胞からホールセル記録を行なう (EPC-9:HEKA, Germany)。

5) 誘発 EPSC は双極白金電極を用いてシャーファー側枝を電気刺激して記録する。

$\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ チャンネル活性との関係性を評価するためにミトコンドリア K_{ATP} 開口薬 (500 $\mu\text{ml/l}$)、同阻害薬 (200 $\mu\text{ml/l}$) を用いる。

6) 虚血負荷時間を 7 分、7.5 分、8 分間で変化させ、spontaneous EPSC (sEPSC)、evoked EPSC の変化を測定し、最適な虚血負荷時間を検討する。

7) 以下の 4 グループにおいてそれぞれの変化を計測する。

Control 群: 虚血負荷を 7.5 分間人工髄液を 95%N₂, 5%CO₂, sucrose に置換することで行う。

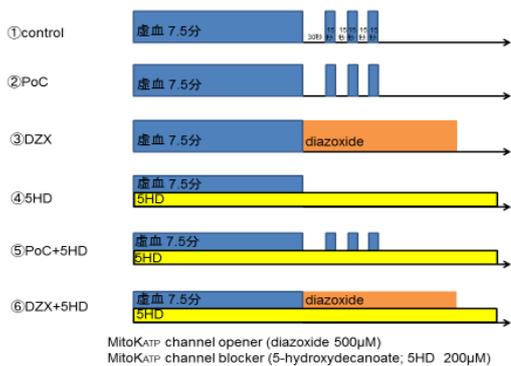
Ischemic postconditioning 群(PoC 群): 虚血負荷 7.5 分間の後に 30 秒の酸素投与後に 15 秒毎の虚血と酸素投与を 3 回繰り返して postconditioning を行う。

薬剤誘導 postconditioning 群(DZX 群): 虚血負荷 7.5 分間の後に mitoKATP チャンネル開口薬である Diazoxide (500 μM) を還流する。

薬剤 mitoKATP チャンネル阻害群 (5HD 群): mitoKATP チャンネル阻害薬である 5-hydroxydecanoate (5-HD; 200 μM) を還流しながら、虚血負荷を 7.5 分間を行う

Ischemic postconditioning + 薬剤 mitoKATP チャンネル阻害群 (PoC+5HD 群): 5-HD を還流しながら、虚血負荷 7.5 分間の後に postconditioning を行う。

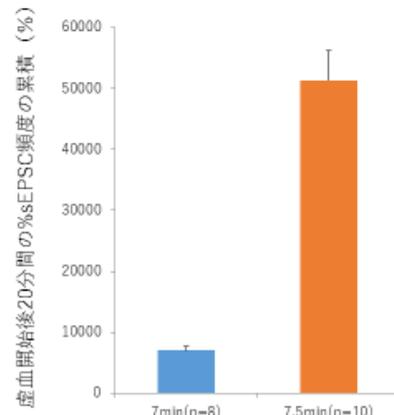
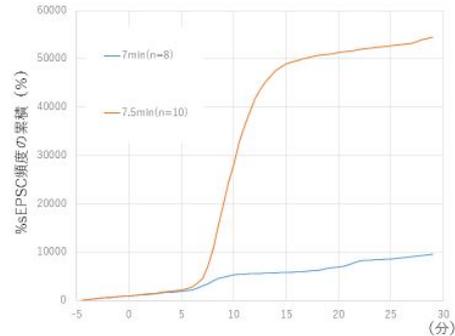
薬剤誘導 postconditioning + 薬剤 mitoKATP チャンネル阻害群 (DZX+5HD 群): 5-HD を還流しながら、虚血負荷 7.5 分間の後に Diazoxide を還流する。



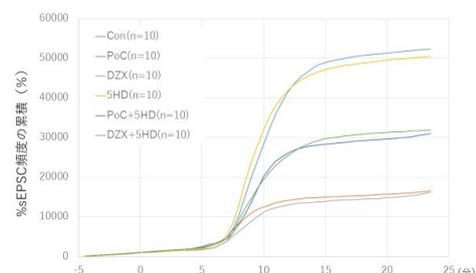
4. 研究成果

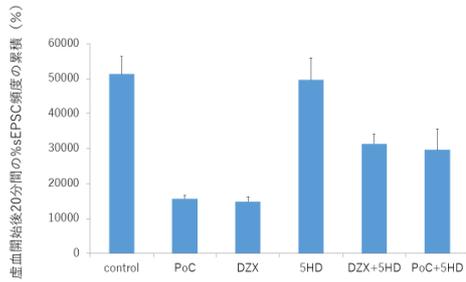
1) 虚血負荷により evoked EPSC は低下するのに対して sEPSC は逆説的に増加し、PoC により、sEPSC の増加は抑制された。虚血時間を 7 分、7.5 分、8 分間で変化させたところ、8 分間では酸素再灌流を行っても不可逆的な変化となり虚血負荷が強すぎる結果となった。7 分間と 7.5 分間での比較では 7 分間の方が 7.5 分間よりも sEPSC 頻度は優位に低下し (虚血負荷開始後 20 分間の sEPSC 頻度の変化率の累積 7 分間群 6994.9 ± 703.0、7.5

分間群 51346 ± 4966 ; p < 0.01) 7 分間では虚血負荷が弱い結果となった。虚血時間は 7.5 分間が PoC を電気生理学的に検討するのに最も良い結果が得られた。



2) sEPSC の頻度は虚血により増加し、Ischemic postconditioning により、sEPSC の頻度の増加が抑制された。ミトコンドリア KATP 開口薬 (diazoxide) により sEPSC の頻度の増加が抑制された。ミトコンドリア KATP 開口阻害薬 (5-HD) により postconditioning 現象 (sEPSC の増加の抑制) が阻害された。(虚血負荷開始後 20 分間の sEPSC 頻度の変化率の累積 Control 群 51346 ± 4965、PoC 群 15735 ± 913.2、DZX 群 14850 ± 1404、5HD 群 49695 ± 6336、PoC+5HD 群 29680 ± 5934、DZX+5HD 群 31389 ± 2785 ; p < 0.01)





Ischemic postconditioning により神経保護効果をもたらされることを、パッチクランプ法を用いて証明した。本現象の機序として Ischemic Preconditioning の機序と同様に、神経シナプス前終末の mito-KATP channel が活性化することで神経保護効果をもたらされることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 5 件)

横山昇平、中川一郎、神経細胞における Ischemic postconditioning の電気生理学的検討。第 40 回日本脳卒中学会総会、2015.03.27、広島

横山昇平、中川一郎、神経細胞における Ischemic postconditioning の電気生理学的検討。第 2 回日本心血管脳卒中学会、2015.06.12、徳島

横山昇平、中川一郎、神経細胞における Ischemic postconditioning の電気生理学的検討。第 74 回日本脳神経外科学会学術総会、2015.10.15、札幌

横山昇平、中川一郎、神経細胞における Ischemic postconditioning の電気生理学的検討。第 27 回日本循環代謝学会総会、2015.10.30、富山

横山昇平、中川一郎、神経細胞における Ischemic postconditioning はミトコンドリア局在 KATP チャンネルを介して神経保護効果をもたらす。第 41 回日本脳卒中学会総会、2016.4.16、札幌

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中川 一郎 (NAKAGAWA Ichiro)

奈良県立医科大学 脳神経外科

学内講師

研究者番号 : 20550825