

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860193

研究課題名(和文)脳虚血の低体温療法におけるATP・アデノシンの役割

研究課題名(英文)The involvement of ATP/adenosine in the therapeutic hypothermia for brain ischemia

## 研究代表者

川村 将仁(Kawamura, Masahito)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10408388

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)：脳卒中において、氷などで頭部を冷やすことは脳保護のために重要な役割を持つと考えられているが、その機序は明らかになっていない。我々は低体温療法における神経保護作用にはATP・アデノシンの関与があるのではないかと仮説を立て、それを証明するためにマウス脳スライス標本を用いて、温度変化が実験的脳虚血に及ぼす影響について検討した。その結果、低体温条件における神経保護作用はアデノシン受容体の活性化を介していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The therapeutic hypothermia for acute stroke might play an important role in neuroprotection, however, the key mechanism of this therapy is still undetermined. We hypothesize that hypothermia enhances ATP/adenosine-mediated neuroprotection against ischemia. To elucidate this hypothesis, we recorded field EPSPs from stratum radiatum of area CA1 in the acute hippocampal slices of adult mice and oxygen-glucose deprivation (the model of ischemia in vitro) was exposed while changing temperatures. The results suggest that hypothermia has protective effect on ischemia-induced loss of synaptic activity through activation of adenosine receptors.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：アデノシン 脳虚血 ATP 低体温療法 海馬

## 1. 研究開始当初の背景

近年、我々は脳内代謝変化による細胞内 ATP 濃度変化が神経細胞からの ATP 放出およびアデノシン受容体の活性化を介したオートクリン機構により神経細胞の活動を修飾・調節することを解明・報告してきた。つまり、ATP およびアデノシンが脳内代謝変化と神経活動修飾を橋渡しする役割を担っていると論じてきた。その主眼は ketogenic diet を代表とする食事療法による抗てんかん作用における ATP・アデノシンの関与であり、脳内 ATP 産生亢進状態におけるアデノシンを介した中枢神経抑制機構であった。しかし、病態生理学的に同等に重要である ATP 産生減少状態におけるアデノシンの役割については詳細な検討を行っていない。脳内代謝抑制状態としては心肺停止もしくは血栓による虚血が代表例として挙げられる。虚血とは、血流が途絶えた領域の細胞に酸素欠乏と栄養障害をもたらす、ATP 産生の途絶を介して変性、壊死、萎縮をきたす状態をいう。つまり虚血とはまさに ATP 産生が減少する状態であると言える。前述のとおり、我々は ATP 産生亢進状態では、神経細胞がその豊富な ATP を用いてオートクリン調整を引き起こすことを報告してきた。では、ATP 産生が途絶した虚血状態では ATP・アデノシンを利用した調整が行われぬかということ、事はそう単純ではない。後述のように虚血の初期段階では、神経細胞は細胞外アデノシンを増加しアデノシン受容体を活性化することにより、その興奮性を抑制しようとするのである。虚血によるエネルギーおよび酸素供給が途絶していく過程で、神経細胞がその貴重な ATP をいかにして利用し、またその機構がどのように破綻して壊死に至るのかを知ることは、脳内代謝変化に対する ATP・アデノシンの役割を知る上で重要な因子である。

一方、心肺停止および血栓による虚血の治療に目を向けた場合、それは心臓マッサージおよび血栓溶解剤やカテーテル手術による血流再開しかない。当然、長時間の虚血により梗塞になった部分は血流再開にても回復することはなく、血流再開までの時間には不可逆的变化をきたすまでの時間制限つまりゴールデンタイムが存在する。脳梗塞患者における血栓溶解療法の適応時間はガイドラインでは、発症 3 時間以内とされている。この脳梗塞および脳血流低下時のゴールデンタイムを考える時にまず思いつく治療法は実は「氷」である。脳虚血において体温を低値に保ちことは、脳卒中の治療ガイドラインにも必ず載せられる事項である。脳温を 32 ~ 33 まで下げる本格的な低体温療法は専門施設を必要とするが、軽度の低体温療法でも脳卒中時の予後が改善されることが示されており、まず頭を冷やすことは簡便ではあるが重要な治療効果を持つ。冷やすことが脳機能保護につながることは、実験動物を用い

て急性脳スライス標本を作成する際に脳ブロックを速やかに氷上の人工脳脊髄液にて冷却することから我々も経験上体感していることである(ただし、5 の人工脳脊髄液にて急速冷却することによる代謝抑制と、頭外部冷却による最大 34 程度までの軽度冷却ではその脳保護機序に違いがあると考えられる)。

現在までに報告されている知見を以下に挙げる。

(1) in vitro 条件下による虚血はその初期段階において海馬における興奮性シナプス伝達をアデノシン受容体の活性化を介して抑制する。

(2) 長時間(10 分以上)の虚血は興奮性シナプス伝達に不可逆的なシナプス伝達障害 (irreversible loss of neurotransmission) を引き起こす。

(3) 低体温では不可逆的シナプス伝達障害が同時間の虚血においても引き起こされないことが報告されている。

(4) 細胞外アデノシン濃度は温度依存的に調整されることが知られている。

(5) また、アデノシン受容体とは反対に不可逆的シナプス伝達障害は ATP 受容体の antagonist 投与により回避することができることも報告されている。

脳虚血に対する低体温療法には脳内代謝に必須の要素である酸素、グルコース、温度の全てが含まれており、その最終的到達点は ATP 合成である。しかしながら、現在までに脳虚血に対する低体温療法における、細胞内 ATP および細胞外 ATP・アデノシン受容体の関与は検討されていない。我々は低体温療法による脳保護効果には ATP・アデノシンの関与があると仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、脳虚血に対する低体温療法における ATP・アデノシンの関与を証明し、その機序を明らかにすることを目的とする。そのために以下のことを行う。

我々は preliminary data として既に、海馬急性スライス標本を用いた細胞外記録において、10 分以上の実験的虚血状態が興奮性シナプス伝達を不可逆的に障害することを見出している。この知見は温度 32 条件下に行った実験であり、本研究計画では温度 36 および 28 条件下の結果と比較することにより、温度変化による虚血応答を観察し、その違いに対するアデノシンおよび ATP 受容体の役割を薬理的・遺伝学手法を用いて解明する。

厚生労働省発表の「平成 20 年 患者調査の概況」によると、脳血管疾患の総患者数は 133 万 9,000 人と報告されている。しかしながら脳梗塞患者の内、血栓溶解療法を受けた患者数はその内の 1% も満たしていない。それは 3 時間というゴールデンタイム内に脳梗塞の

診断を受け、専門施設にて血栓療法を受けることがいかに困難であることを示す。本研究計画における低体温療法の機序解明は、ゴールデンタイムの延長を期待でき、それによる血栓溶解療法適応患者の拡大を可能とし得る。血栓溶解療法による脳梗塞の予後への有効性は実証されており、治療患者の拡大は脳梗塞治療において臨床的に極めて重要な意義を持つ。

しかしながら、本研究計画の本質的な目的は虚血という代謝が途絶した状態で神経細胞が(1)貴重なエネルギー源である ATP およびアデノシンをなぜ細胞外に放出し、(2)放出したプリンをいかにして自らを保護するための因子として有効活用しているのか、(3)そして梗塞の完成にあたりその機構はどのようにして破綻していくのか、という病態生理学的に純然たる疑問を解消することにある。

### 3. 研究の方法

#### 急性海馬スライス標本の作製

5 - 9 週齢のマウスを isoflurane 麻酔下にて断頭し大脳を摘出、氷冷下にて厚さ 300  $\mu\text{m}$  の海馬を含む冠状断脳切片を作成し、60 分以上室温下で incubation 後、記録を行った。記録時はスライスを記録チャンパー中に移し、ナイロンメッシュで固定し、重炭酸緩衝人工脳脊髄液 (NaCl 126 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucose 11 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM; osmolarity 320 mOsm, pH 7.4 when saturated with 5% CO<sub>2</sub>) を 2 ml/min にて還流した。重炭酸緩衝人工脳脊髄液は 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> により飽和したが、実験的虚血条件では、重炭酸緩衝人工脳脊髄液内の glucose を sucrose に置換し、95% N<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> にて飽和し、酸素供給および glucose 供給を途絶させた (oxygen glucose deprivation, OGD)。作成したスライス標本を用いて以下の研究を施行した。

虚血による fEPSP 応答の不可逆的变化に対する温度の影響、および、それに対する ATP・アデノシン関与の解明。

海馬急性スライス標本を用いて、3 M NaCl にて満たしたガラス電極を記録電極として CA1 方線状層に刺入、さらにタングステン双極電極を刺激電極として Schaffer collateral に刺入して CA1 領域より Schaffer collateral 刺激誘発の興奮性シナプス伝達 (fEPSP) を記録した。30 秒間隔で電気刺激を与え記録が安定したことを確認後、15 分間 OGD が fEPSP の振幅に与える影響を 36 $\pm$ 0.5、32 $\pm$ 0.5 および 28 $\pm$ 0.5 の異なる温度条件下で、特に(1) OGD 初期の fEPSP 振幅抑制、(2) 長時間 OGD による不可逆的振幅抑制の回復度に着目し比較・検討した。また、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体特異的な antagonist を用いて、温度変化による差異に

対するアデノシン A<sub>1</sub> 受容体の関与を検討した。28 の条件は低体温療法としては不可能な低温であるが、温度による変化を段階的に観察するために実験的に取って行った。

### 4. 研究成果

36 では 15 分間の OGD により OGD 初期の fEPSP 振幅抑制、およびそれに続く不可逆的なシナプス伝達障害が引き起こされた (図 1A)。一方、32 では、初期の fEPSP 振幅抑制後 fEPSP 振幅の回復が引き起こされた (図 1B)。28 でも fEPSP 振幅の回復が引き起こされ、その程度は 32 よりも強かった (図 1C)。アデノシン A<sub>1</sub> 受容体の選択的抑制薬 (DPCPX) は 32 における fEPSP 振幅回復を阻害した (図 2A)。一方、28 における fEPSP 振幅回復はアデノシン A<sub>1</sub> 受容体の選択的抑制薬前投与群においても観察された (図 2C)。以上の結果により、32 の mild な低体温条件下における不可逆的シナプス伝達障害の発生抑制 (神経保護作用) はアデノシン A<sub>1</sub> 受容体の活性化を介しているが、現状の低体温療法では再現不能な、より低温条件 (28) での神経保護作用はアデノシン A<sub>1</sub> 受容体以外の機構を介しており、低温条件により異なる神経保護作用が働いていると考えられた。

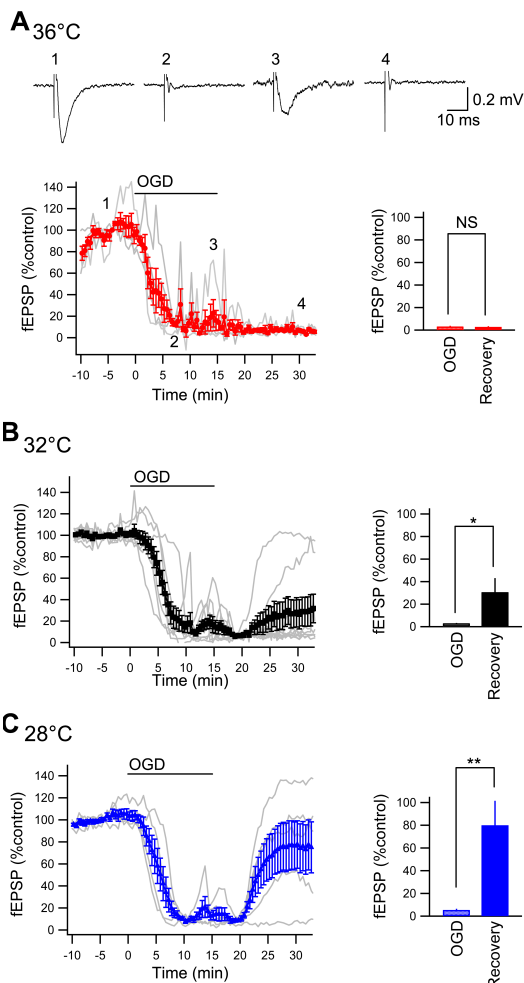


図 1. 低体温は OGD による不可逆的なシナプス伝達障害 (irreversible loss of neurotransmission) の発生を抑制した。(A) OGD15 分間による fEPSP の振幅変化を、個々のスライス標本における反応を灰色の線、全 5 例の mean  $\pm$  SEM を赤丸で示した。36 では OGD 刺激により全てのスライス標本で不可逆的なシナプス伝達障害が引き起こされた。(B) 全 8 例の平均値を黒四角で示した。32 では fEPSP の振幅は有意に回復した。(C) 全 5 例の平均値を青三角で示した。28 では fEPSP の振幅は著明に回復した。36 では全例において不可逆的なシナプス伝達障害が引き起こされたが、低体温では同時間の虚血においても fEPSP の振幅の回復が観察された。NS, not significantly different; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ 。

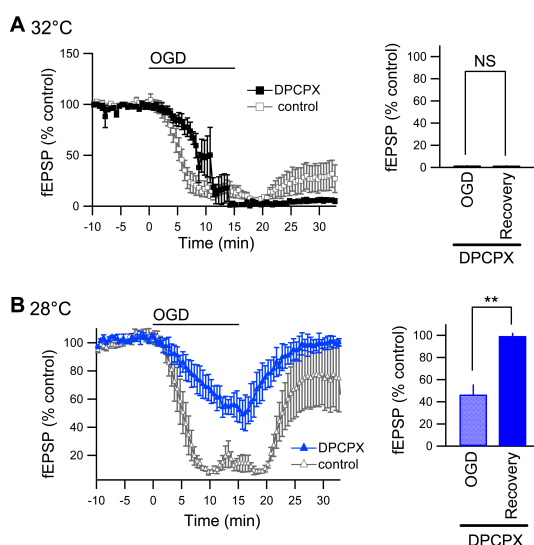


図 2. アデノシン A<sub>1</sub> 受容体特異的な antagonist (DPCPX) 存在下では 32 においても不可逆的なシナプス伝達障害が引き起こされた (A), 28 では、DPCPX 存在下においても fEPSP の振幅の回復が観察された (B). NS, not significantly different; \*\*,  $P < 0.01$ ; 32,  $n = 4$ ; 28,  $n = 3$ .

## 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 4 件)

1) Kawamura M, Jr., Ruskin DN, Geiger JD, Boison D, Masino SA (2014) Ketogenic Diet Sensitizes Glucose Control of Hippocampal Excitability. *J Lipid Res* 55:2254-60. (査読あり)  
doi: 10.1194/jlr.M046755

2) Masino SA, Kawamura M, Jr., Ruskin DN

(2014) Adenosine receptors and epilepsy: current evidence and future potential. *Int Rev Neurobiol* 119:233-255. (査読なし)  
doi: 10.1016/B978-0-12-801022-8.00011-8

3) Boison D, Sandau US, Ruskin DN, Kawamura M, Jr., Masino SA (2013) Homeostatic control of brain function - new approaches to understand epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* 7:109. (査読あり)  
doi: 10.3389/fncel.2013.00109

4) Ruskin DN, Svedova J, Cote JL, Sandau U, Rho JM, Kawamura M, Jr., Boison D, Masino SA (2013) Ketogenic Diet Improves Core Symptoms of Autism in BTBR Mice. *PLoS One* 8:e65021. (査読あり)  
doi: 10.1371/journal.pone.0065021

[学会発表](計 2 件)

1) Kawamura M. Adenosine-based mechanisms underlying anticonvulsant effects of ketogenic diet. 第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 03 月 18 日、名古屋

2) Kawamura M, Jr., Ruskin DN, Masino SA. Adenosine-based anticonvulsant mechanisms underlying ketogenic diet. Society of Neuroscience 44th Annual Meeting、2014 年 11 月 18 日、Washington, DC

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川村 将仁 (KAWAMURA MASAHIITO)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10408388