

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462547

研究課題名(和文) 前庭小脳興奮性回路における一過性虚血に対する脆弱性の解明

研究課題名(英文) Study of the susceptibility to temporary ischemic insults in the vestibulo-cerebellum

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット小脳虫部のスライス切片を作成し、低酸素低グルコース(ODG)細胞外液を還流させた。プルキンエ細胞の自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)は、短時間のODG刺激により顕著な増加を示し、細胞外液を生理的な外液に変更すると回復した。このことから、ODG刺激による反応は一過性で可逆的であることが分かった。このODG刺激による反応は、前庭小脳領域で有意に大きかった。sEPSCの変化は、前庭小脳領域においては頻度、振幅ともに有意な増加が確認されたが、対象領域においては有意な変化は認めなかった。従って、sEPSCの増加は、プルキンエ細胞の興奮性シナプス前細胞の発火頻度の上昇に起因すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the neural pathophysiology underlying central vertigo induced by transient ischemia, such as is observed in vertebrobasilar insufficiency, we focused on the excitatory circuits in the rat cerebellum. In our study, we investigated the effects of oxygen-glucose deprivation (ODG) on sEPSCs in Purkinje cells in vestibulo-cerebellar lobules IX and X. sEPSCs in Purkinje cells in lobules IX and X showed marked enhancement of frequency during the short term treatment of oxygen-glucose deprivation. On the other hand, ODG-induced enhancement of sEPSC was small in other control lobules IV-VI. Furthermore, the complete blockade of ODG-induced enhancement of sEPSCs by TTX indicates that this effect depend on spontaneous firings of presynaptic neurons. These results suggest that Purkinje cells in lobules IX and X are richer in the fundamental excitatory inputs than those in other vermal lobules, which results in high sensitivity to ischemic insults in vestibulo-cerebellum.

研究分野：神経耳科

キーワード：patch-clamp vestibulo-cerebellum Purkinje cell

1. 研究開始当初の背景

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。この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 (Clidna, Mahoney, Luxon, *Causes of balance disorders*. In: *Adult Audiology*. Scott-Brown's *Otolaryngology 6th edition*, edited by Stephens. 1997)。椎骨脳底動脈循環系は、末梢迷路、第 VIII 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 VIII 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、中枢性眼振のみが観察される症例が大多数である。このことから椎骨脳底動脈系における虚血性機能障害は前庭系で生じ易いとされ、原因として前庭神経核を含む前庭中枢系が他領域の神経系に比べ虚血に対する脆弱性を持つことが想定されている (Caplan, *Pathology of vascular brain stem diseases*. In: *Vascular Brain Stem Disease*, edited by Hofferberth, Brune, Sitzer, Weger. pp.25-36, 1990)。以上は、椎骨脳底動脈循環不全症におけるめまい発作の病態生理として広く受け入れられている。にもかかわらず、前庭に関する中枢神経系において虚血に対する脆弱性を証明した生理学的知見は、未だ示されていない。

2. 研究の目的

前庭小脳の各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する。前庭神経核—前庭小脳の興奮性回路に関して、前庭神経核からの入力の前庭小脳の顆粒細胞 (granule cell) に入力する。これに加え、前庭小脳領域の顆粒細胞層には UBC(Unipolar Brush Cell) と呼ばれる興奮性介在ニューロンが存在し、前庭入力を増強する特殊な局所回路が存在する。これらの顆粒細胞層において修飾をうけた前庭系情報は、平行線維を介して小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞 (Purkinje cell) へ集約、伝達され、さらに修飾を受けて再び前庭小脳に feed back される。

具体的な研究としては、まず、スライスパッチクランプ法にてプルキンエ細胞を膜電位固定し、低酸素低グルコース (OGD) 刺激を与え、これにより生じる興奮性膜電位変化を観察する。虚血性変化発生までの時間経過、生理的条件下に戻した際の膜電位や発火特性変化など、OGD 刺激による影響が、どのように、どの程度持続するのかを調べる。

次に、顆粒細胞および UBC を電流固定

し、OGD 刺激による自発発火の変化を確認する。顆粒細胞や UBC は膜電位固定に関して whole-cell 記録における電気的条件がよく、確認された発火特性の変化を膜電位依存性イオンチャネルのレベルで解析が可能である。従って、ここでは薬理学的手法に工夫を凝らし、同定したイオンチャネルの抑制または活性化の変化を OGD 刺激と同様に実験的に誘導し、OGD 刺激を薬理的に再現することを試みる。

最後に、前庭小脳領域に特異的に存在する UBC に関して、局所回路における存在意義を検討するため、前庭小脳以外の小脳皮質において同様の OGD 刺激実験を行い、得られた結果をこれまでの前庭小脳系におけるデータと比較する。プルキンエ細胞における前庭小脳特異的な反応と、前庭小脳特異的に存在する UBC の特性に何らかの関係性が見いだせれば、虚血に対する脆弱性が前庭小脳領域に特異的に現れるメカニズムについてさらに詳しく考察できる。

3. 研究の方法

ラット小脳脳幹急性スライスを作成し、パッチクランプ法を用いて前庭小脳領域の神経細胞から電気記録を行う。最初は興奮性神経回路に注目し、GABA blocker 存在下に実験する。一過性虚血刺激として無酸素無グルコース (Oxygen-Glucose Deprivation; OGD) の細胞外液を還流させる。まず、小脳皮質顆粒細胞から入力が集まるプルキンエ細胞において、興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録し、その変化を記録する。OGD による sEPSC の変化では、一過性障害の起こる実験条件を決定する。sEPSC はシナプス前細胞の顆粒細胞の自発発火に依存するため、次に顆粒細胞層の顆粒細胞および UBC(Unipolar Brush cell) を対象に電気記録を行う。先に実験的に確立した OGD 刺激条件で、それらの神経細胞の発火特性の変化を見出し、局所回路における障害機序を明らかにする。さらにそれぞれの神経細胞においてイオンチャネルレベルでそのメカニズムを解明する。

4. 研究成果

スライスパッチクランプ法を用いて小脳プルキンエ細胞を -70mV に膜電位固定し、自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic current: sEPSC) を記録した。プルキンエ細胞における抑制性入力を抑制するため GABA チャネルブロッカーを常時使用した。sEPSC は短時間の OGD 刺激により顕著な増加を示し、細胞外液を生理的な外液に変更すると、ほぼベースラインの状態に回復した (Fig1 A,B)。このことから、OGD 外液還流により sEPSC は顕著に増加するが、これは一過性で可逆性の変化であることが

分かった。また、この sEPSC の増強は、発火頻度と振幅の有意な増加が観察された (Fig1 C)。

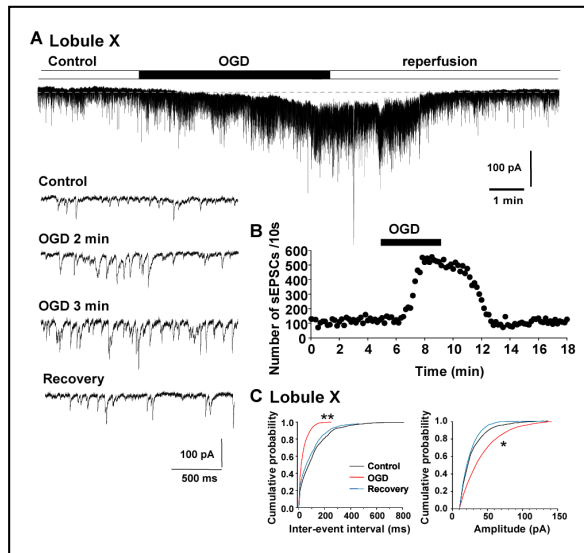


Fig 1 無酸素無グルコース外液還流による前庭小脳プルキンエ細胞の興奮性電流の増加

この OGD による sEPSC の増加は、AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗薬である NBQX で抑制され、NMDA 型グルタミン酸拮抗薬では抑制されなかった。また、ナトリウムチャネル拮抗薬の TTX にて完全に抑制されることから、活動電位に依存したシナプス前の興奮性神経細胞の発火による現象であることが分かった (Fig2)。

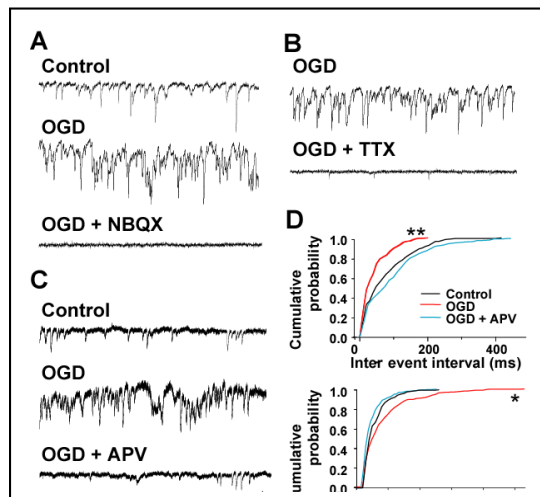


Fig2 sEPSC の薬理学的特徴

次に、この OGD 刺激による反応が、前庭小脳特異的であるのか、あるいは小脳全体の共通した現象であるのかを調べるため、前庭小脳以外の小脳領域で同様の実験を行った。前庭小脳以外のプルキンエ細胞における sEPSC は、OGD 刺激で若干の頻度の上昇を認めしたが、前庭小脳領域の反応に比べ有意に小さかった (Fig3)。

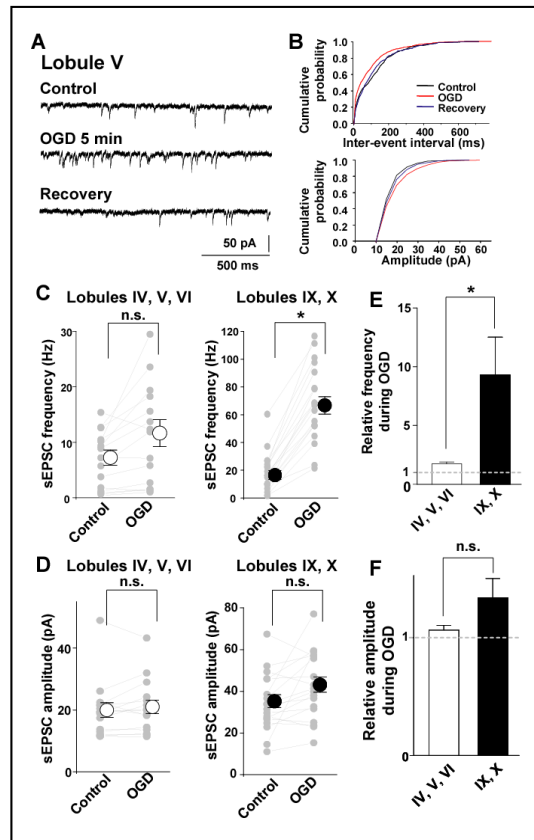


Fig3 前庭小脳以外の小脳領域との比較

最後に、前庭小脳と、その他の小脳領域において、生理条件下での興奮性に違いがあるかを調べた。

結果、前庭小脳領域の sEPSC は振幅、頻度共に、他の小脳領域より大きく、ベースとなる興奮性が高いことが分かった (Fig4)

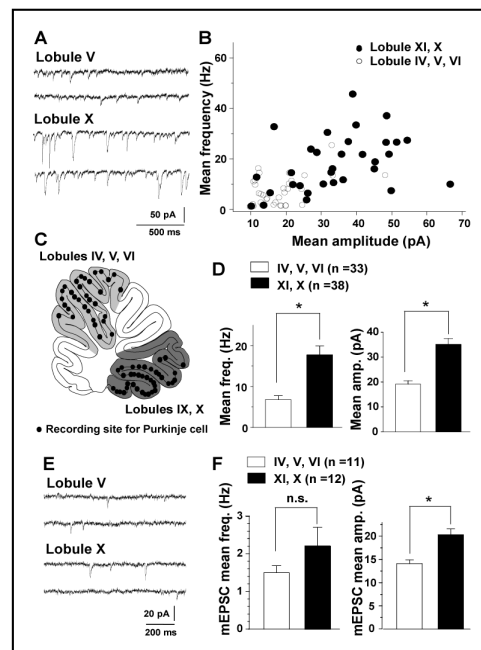


Fig4 生理的条件下の sEPSC の比較

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 9 件)

1. Shirai K, Saitoh JI, Musha A, Abe T, Kobayashi D, Takahashi T, Tamaki T, Kawamura H, Takayasu Y, Shino M, Toyoda M, Takahashi K, Hirato J, Yokoo S, Chikamatsu K, Ohno T, Nakano T; Working Group on Head and Neck Tumors. Prospective observational study of carbon-ion radiotherapy for non-squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci*. 108(10):2039-2044, 2017
DOI: 10.1111/cas.13325 査読あり
2. Takahashi K, Nakajima K, Murata T, Shino M, Nikkuni O, Toyoda M, Takayasu Y, Chikamatsu K.
[Sequential Chemoradiotherapy for Advanced Head and Neck Cancer: A Clinical Study with 33 Cases]. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 119:734-740. 2016
DOI: なし 査読あり
3. Saitoh JI, Shirai K, Imaeda M, Musha A, Abe T, Shino M, Takayasu Y, Takahashi K, Chikamatsu K, Nakano T.
Concurrent chemoradiotherapy with conventional fractionated radiotherapy and low-dose daily cisplatin plus weekly docetaxel for T2N0 glottic cancer. *Radiat Oncol*. 2:39, 2017
DOI: 10.1186/s13014-016-0741-4. 査読あり
4. Takayasu Y, Shino M, Nikkuni O, Yoshida Y, Furuya N, Chikamatsu K.
Oxygen-glucose deprivation increases firing of unipolar brush cells and enhances spontaneous EPSCs in Purkinje cells in the vestibulo-cerebellum. *Neurosci Res*. 106:1-11, 2016
DOI: 10.1016/j.neures.2015.10.009. 査読あり
5. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Asao T, Chikamatsu K.
Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in adenoid cystic carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 136:1-7, 2016
DOI: 10.3109/00016489.2015.1083120. 査読あり

6. Takeuchi K, Yang Y, Takayasu Y, Gertner M, Hwang JY, Aromolaran K, Bennett MV, Zukin RS.
Estradiol pretreatment ameliorates impaired synaptic plasticity at synapses of insulted CA1 neurons after transient global ischemia. *Brain Res*. 1621:222-230, 2015
DOI: 10.1016/j.brainres.2014.11.016. 査読あり
 7. Toyoda M, Kaira K, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Takayasu Y, Tominaga H, Oriuchi N, Nikkuni O, Suzuki M, Iijima M, Tsukamoto N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K.
CD98 as a novel prognostic indicator for patients with stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 37: 1569-74, 2015
DOI: 10.1002/hed.23797. 査読あり
 8. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Asao T, Chikamatsu K. Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in adenoid cystic carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 14:1-7, 2015
DOI: 10.3109/00016489.2015.1083120. 査読あり
 9. Toyoda M, Kaira K, Ohshima Y, Ishioka NS, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K.
Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. *British Journal of Cancer* 110: 2506-2513, 2014
DOI: 10.1038/bjc.2014.178. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 12 件)
1. Takayasu Y, Shino M, Chikamatsu K, The effects of oxygen-glucose deprivation on excitatory circuits in the vestibulo-cerebellum of the rat *ENT world congress Paris* 2017, 24th to 28th June 2017
 2. Sakurai M, Takayasu Y, Shino M, Sakakura K, Shirai K, Saitoh J, Ohno T, Nakano T, Chikamatsu K, Comparison of curative surgery and carbon ion radiotherapy as an initial treatment for patients with carcinoma of the parotid gland *ENT world congress Paris* 2017, 24th to 28th June 2017

3. **高安幸弘**, 紫野正人, 高橋克昌, 古屋信彦, 近松一郎
前庭小脳の興奮性局所神経回路における無酸素無グルコース刺激に対する易感受性
第 75 回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会(大阪) 2016 年 10 月 27、28 日

4. 高橋克昌, 新國撰, 岡宮智史, **高安幸弘**, 近松一郎
視運動性眼振に対する重力情報の影響
第 74 回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会(岐阜) 2015 年、11 月

5. **Takayasu Y.**, Shino M, Toyoda M, Takahashi K, Chikamatsu K, Saitoh J, Shirai K, Ohno T, Nakano T,
Results of carbon ion radiotherapy for mucosal malignant melanoma of the head and neck.
AHNS 2014 Annual Meeting July 26-30, 2014 Marriott Marquis Hotel in Times Square, New York, NY

6. **高安幸弘**, (群馬大)
唾液腺悪性腫瘍の分子病理から見た治療法の展望 - 予後向上を目的とした新たな展開を中心に - 耳下腺悪性腫瘍に対する重粒子線治療
第 25 回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会 (松江テルサ/島根) 2016.09.08-09

7 **高安幸弘**, 紫野正人, 新國撰, 豊田実, 高橋克昌, 近松一郎 (群馬大)
当科における頭頸部癌再建手術の最近 8 年間の症例検討
第 116 回 耳鼻咽喉科学会群馬県地方部会学術講演会、2017 年、6 月

8 **高安幸弘**, 紫野正人, 豊田実, 近松一郎 (群馬大)
重粒子線治療行った耳下腺悪性腫瘍のまとめ
第 114 回 耳鼻咽喉科学会群馬県地方部会学術講演会、2016 年、12 月

9 町田純帆, **高安幸弘**, 紫野正人, 豊田実, 近松一郎 (群馬大)
頸部外切開法により摘出した喉頭神経鞘腫の一例
第 112 回 耳鼻咽喉科学会群馬県地方部会学術講演会、2016 年、3 月

10 寺内祐理, 新國撰, **高安幸弘**, 豊田実, 近松一郎 (群馬大)
放射線治療後に発症した喉頭肉腫の一例
第 111 回 耳鼻咽喉科学会群馬県地方部

会学術講演会、2015 年、11 月

11 **高安幸弘**, 紫野正人, 豊田実, 高橋克昌, 近松一郎 (群馬大)
当院にて重粒子線治療行った頭頸部悪性腫瘍全 104 症例のまとめ
第 110 回 耳鼻咽喉科学会群馬県地方部会学術講演会、2015 年、6 月

12 **高安幸弘**, 紫野正人, 豊田実, 高橋克昌, 近松一郎 (群馬大) 齊藤淳一, 白井克幸, 大野達也, 中野隆史 (同放射線科)
群馬大学における頭頸部悪性黒色腫に対する重粒子線治療の短期成績
第 107 回 耳鼻咽喉科学会群馬県地方部会学術講演会、2014 年、6 月

〔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 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 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4)研究協力者 なし
()