

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10742

研究課題名(和文) 一過性虚血による内側前庭神経核ニューロンの膜特性変化に対するセロトニンの影響

研究課題名(英文) Serotonin induced response properties of medial vestibular neurons during transient ischemia

研究代表者

紫野 正人 (Shino, Masato)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20550015

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)：一過性虚血により内側前庭神経核ニューロンの86%は自発発火を停止する。この自発発火停止中のニューロンに中枢神経系の神経伝達物質であるセロトニンを投与したときのニューロンの自発発火の様子をスライスパッチクランプ法を用いて調べた。解析可能な16のニューロンのうち、セロトニン投与後速やかに自発発火が改善するもの(n=7)と、変化のないもの(n=9)がみられた。このことは、セロトニンが5分程度の一過性血流障害で機能低下している内側前庭神経核ニューロンの発火特性に修飾を与えることを示しており、セロトニンが新たなめまいの治療薬となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化と異常気象のため、脳梗塞に至らないまでも、脳幹への一過性血流障害のために生じるめまい(椎骨脳底動脈循環不全症)は日常診療で頻繁に遭遇する。めまい患者は増加している反面、めまいに対する新たな治療薬はない。治療薬となるための条件は、前庭動眼反射や眼振解発の中枢である内側前庭神経核のニューロン発火特性に影響を与える必要がある。

そこで本研究では抗うつ薬としてすでに使用されているセロトニン作動薬に着目した。一般的にセロトニンは慢性的なめまいに有効とされているが、虚血負荷をうけた内側前庭神経核ニューロンに対する即時的な作用を調べることで、めまいに対する適応追加の基礎データとなりうるかを検証する。

研究成果の概要(英文)：The medial vestibular nucleus is involved in horizontal eye movement and center for vestibulo ocular reflex (VOR). Transient ischemia induced interruption of spontaneous firing of 86% of the medial vestibular neurons. We investigated the effect of serotonin for the medial vestibular neurons during transient ischemia. Of 16 medial vestibular neurons, seven neurons showed rapid recovery of spontaneous firing by serotonin application. The remainder (n=9) was no remarkable change despite serotonin application. Serotonin affected the firing property of medial vestibular neurons during transient ischemia. This result indicates that serotonergic drugs which are represented by SSRIs have an additional probability for the therapeutic drug for vertigo.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：内側前庭神経核 セロトニン 一過性虚血 パッチクランプ法 発火特性 自発発火

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

めまいは耳鼻咽喉科で扱う代表的な疾患の一つである。近年の高齢化社会や異常気象による脱水により、めまいで救急搬送される患者は多い。内側前庭神経核は椎骨脳底動脈から血液供給を受けて栄養される脳神経核で、前庭動眼反射や前庭代償といった平衡機能中枢であり、舌下神経前位核とともに、頭部回転速度情報を眼球位置情報に変換する神経積分器としての役割も果たす。したがって、完全な脳梗塞には至らないまでも、一過性の血流障害により、内側前庭神経核を含む脳幹やそれをコントロールする小脳が機能障害を受けると、眼球位置の保持が不可能となった結果、眼振が誘発され、めまいとして自覚される。一方、セロトニンは脳幹縫線核で生成されるモノアミン系神経伝達物質で不安・睡眠・情動など脳機能の調節において重要な役割を果たし、関連する薬剤はうつ病や片頭痛に対して臨床応用され、メニエール病の増悪予防としても使用される。セロトニン受容体は前庭神経核にも存在しており一側迷路破壊後の前庭代償に関与し、高カリウムストレスでは内側前庭神経核のセロトニン濃度が上昇すると報告されている。学会では、めまい疾患と精神疾患の関連は注目されており、めまい発作に対して補助的にセロトニン作動薬を用いることも少なくない。従来セロトニンは慢性的なめまいや不安状態を改善することによるめまいの悪化予防の目的で使用されることが多い。しかし、椎骨脳底動脈循環不全のような急性期のめまいに対する治療効果もあるかを検証するため、本研究では一過性虚血によって障害を受けた内側前庭神経核ニューロンに対するセロトニンの作用を調べることに着目するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、メマイ発症・増悪因子としての不安・ストレスの背景にあるセロトニンと一過性虚血の関係性に着目し、一過性虚血状態の内側前庭神経核ニューロンに対するセロトニンの影響を電気生理学的側面からアプローチして観察・調査することを目的とする。これにより、ニューロンという最小単位で、一過性虚血とセロトニンの関連を解明することができるとともに近年、頻繁に使用されるセロトニン再取り込阻害薬の内側前庭神経核ニューロンに対する作用について新たな知見をえることができる。

### 3. 研究の方法

3週齢の young Wistar rat の脳幹から内側前庭神経核を含む 250-300  $\mu\text{m}$  のスライス切片を作製し、Whole cell Patch Clamp 法を用いて、ニューロンの電気生理学的活動を記録した。スライス標本による電気生理学的解析では、ニューロンのネットワークを保持したまま虚血状態を作り出し薬剤を投与することができ、生体に近い実験状況といえる。まず生理的条件下で内側前庭神経核ニューロンにセロトニンを投与した時の自発発火の変化を記録し、本研究の実験系でのコントロールとした。次に一過性虚血により自発発火停止中の内側前庭神経核ニューロンにセロトニンを投与したときの電気生理学的変化を記録・検証した。一過性虚血としては、スライス切片を栄養する細胞外液中のグルコースをスクロースに、酸素を窒素に置換してバブリングする無酸素無グルコース(Oxygen-Glucose deprivation ; OGD)溶液を5分間灌流するものとした。セロトニンの濃度は中枢神経系を対象とした過去の報告に基づいて 40  $\mu\text{M}$  とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 生理的条件下での内側前庭神経核ニューロンのセロトニン負荷による変化の確認

自発発火する内側前庭神経核ニューロンに 40  $\mu\text{M}$  のセロトニン (5-hydroxytryptamine; 5HT) を投与した時の発火特性の変化を記録した。脳幹は複雑なニューロンネットワークが構築されており、小脳からの抑制性入力も強く受けている。これらの外因性の影響を排除するために、細胞外液には興奮性入力遮断のためアンタゴニストである NBQX と APV を、抑制性入力を遮断するためにピクロトキシンとストリキニンを負荷して内因性の自発発火変化に着目した。内因性膜特性により継続的に自発発火をおこなうニューロンにセロトニン投与を投与すると、自発発火頻度が減少するもの(図 1A)、増加するもの(図 1B)、変化がないもの(図 1C)の3つのパターンに分類された。さらに詳細にこの変化を調べるために、スパイク特性をスパイク幅(Half width of the Spike)、後過分極の振幅(Amplitude of the AHP)、後過分極のピークまでの時間(Time to peak AHP)の3つのパラメータについて検証した(図 2)。自発発火が増加したものはスパイク幅が狭くなり、後過分極の振幅は浅く、後過分極ピークまでの時間が短縮する変化が生じていた。一方、自発発火が低下したものはその逆の変化が、自発発火が変わらないものについてはスパイク特性にも変化がなかった。

図 1

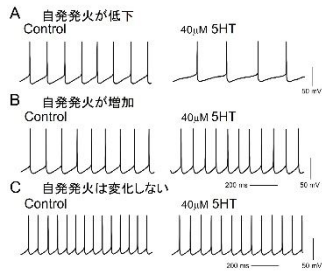
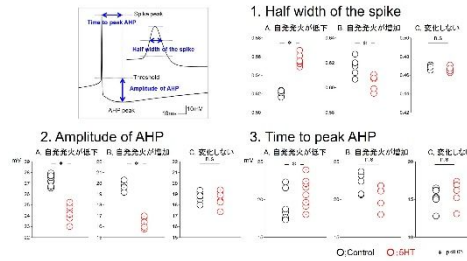
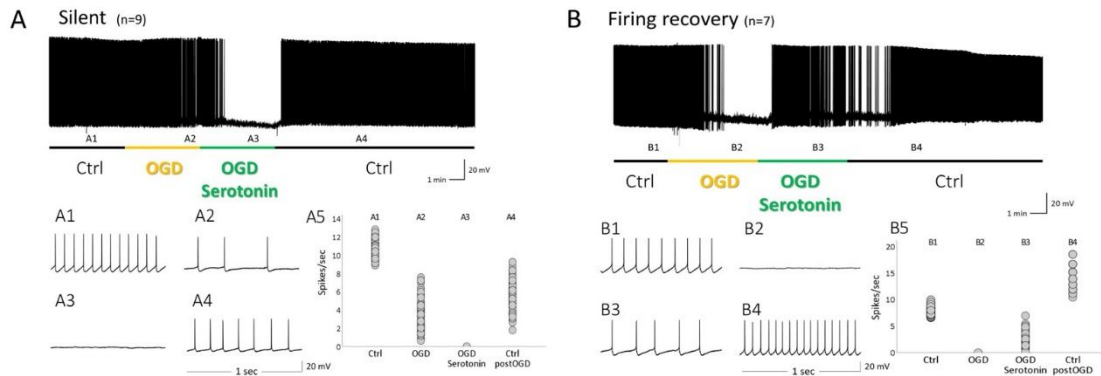


図 2



(2) 一過性虚血条件下でのセロトニン投与

これまでの申請者の研究結果から、内側前庭神経核ニューロンに5分間の一過性虚血(OGD)を与えると持続的な自発発火を一旦休止するが、再び生理的な条件に戻ると自発発火を再開するという現象が86%のニューロンで認められている。一過性虚血で自発発火頻度の落ちた状態のニューロンに虚血と同様の5分間セロトニンを投与してニューロンの自発発火がどのように変化するかを調べた。約30分間の長時間記録で解析可能なニューロンはn=16であったが、そのうち、9つのニューロンでは、セロトニンを投与しても自発発火に変化がみられなかった(図3A)。一方、7つのニューロンでは、セロトニン投与後1分程度で速やかに自発発火が回復した(図3B)。生理的条件下(A1、B1)、虚血中(A2、B2)、セロトニン投与中(A3、A4)と生理的条件下に戻ったとき(A4、B5)の各Phaseのスパイクを拡大し、発火頻度を定量化した(A5、B5)。



自発発火停止状態からセロトニン投与に対して反応のないニューロン群を「Silent」、一方、自発発火を再開させるものを「Firing recovery」とすると、Silent群では虚血やセロトニン投与後の自発発火頻度はその前に比べて低下しており、Firing recovery群では、逆に上昇していた。これらの実験結果はセロトニンが一過性虚血で自発発火停止中の内側前庭神経核ニューロンの内因性膜特性にニューロンレベルで影響を与えることを示している。この結果のみでは、めまい発作の治療や予防としてセロトニン作動薬が有効に作用しているというには不十分であるが、少なくとも何らかの修飾を与えることができる。

今後の方向性としては、多種類存在するセロトニン受容体のうち、どのサブタイプが内側前庭神経核ニューロンの自発発火に影響を与えるのかを、各種アゴニスト・アンタゴニストを使用して調べることで、より詳細なセロトニン関与の機序を知ることができると推測する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Takayasu Y, Shino M, Nikkuni O, Yoshida Y, Furuya N, Chikamatsu K.   | 4. 巻<br>106        |
| 2. 論文標題<br>Oxygen-glucose deprivation increases firing of unipolar brush cells and enhances spontaneous EPSCs in Purkinje cells in the vestibulo-cerebellum. | 5. 発行年<br>2016年    |
| 3. 雑誌名<br>Neurosci Res.  | 6. 最初と最後の頁<br>1-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neures.2015.10.009.   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-          |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Masato Shino, Osamu Nikkuni, Yukihiko Takayasu, Kazuaki Chikamatsu                        |
| 2. 発表標題<br>Electrophysiological responses of the medial vestibular neurons to serotonin application. |
| 3. 学会等名<br>Society for Neuroscience annual meeting (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |