

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10735

研究課題名(和文) ミトコンドリアKATPチャンネルを介した虚血耐性現象のメカニズム

研究課題名(英文) Ischemic postconditioning induced by opening of mK⁺ ATP channels and NMDAR silencing by mPTP opening

研究代表者

中川 一郎 (Ichiro, Nakagawa)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20550825

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)： Ischemic postconditioning (PoC) の機序を解明するためにパッチクランプ法を用いた電気生理学的な検討を行った。結果としてPoC、mKATP channel 開口薬投与によりNMDA受容体活性の上昇が抑制され細胞内Ca²⁺の上昇も抑制されたが、mPTP閉鎖薬を加えることでキャンセルされた。またミトコンドリア膜電位はPoCにより再灌流後一過性に脱分極した。以上の結果からPoC現象は、mKATP channelの活性化を介したmPTPのmildな開口とNMDA受容体活性を低下させ、細胞内Ca²⁺濃度の著明な上昇を抑制して神経保護効果をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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少ない。本研究の結果としてミトコンドリア局在KATPチャンネルの開口によってミトコンドリア内膜の脱分極が生じ、ミトコンドリアPTPから特異的にCa²⁺が細胞内に放出され、これが細胞膜NMDA受容体をdown-regulationさせ、このことがEPSCの低下をもたらす結果が得られた。本機序の解明が進み、今後トランスレーショナルリサーチに発展することにより、将来的には本チャンネル開口薬が脳梗塞急性期の“治療薬”として臨床応用されれば今後の脳血管障害の治療に貢献するところは大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)： In the present study, we examine the precise mechanisms of IPoC using electrophysiological approach. NMDARs and anoxia mediated increase in Ca²⁺ were silenced during IPoC and mK⁺ ATP channel opener diazoxide prevented the anoxia-mediated increase in Ca²⁺ and reduction in NMDAR currents, however, the mPTP blocker cyclosporine A prevented the IPoC effect that NMDAR currents reduced. Furthermore, m depolarization was induced by the activation of mK⁺ ATP channels during IPoC. The present study indicates that mitochondria plays a pivotal role for neuroprotection of IPoC induced by opening of mK⁺ ATP channels through NMDAR silencing by mild mPTP opening.

研究分野：脳神経外科

キーワード：虚血耐性現象 ミトコンドリア ATP依存性カリウムチャンネル 虚血再灌流障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞に非致死性の虚血負荷を与えることによって次に続く致死性の虚血負荷に対する耐性が誘導される虚血耐性現象 (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、その機序に関しては heat shock protein, sarcomere KATP チャンネル、フリーラジカルなどの関与が報告されている。近年ではミトコンドリア内膜に局在する KATP (mitoKATP) チャンネルの活性化が注目されているがその詳細は十分解明されていない。我々はこれまでに本現象が薬剤によっても誘導されることを薬剤性虚血耐性現象として報告し (Nakagawa et al. Neuroscience Letters 2002)、本現象の機序としてシナプス終末部における KATP チャンネルの開口が耐性誘導に寄与することをホールセルパッチクランプ法を用いて証明した (Nakagawa et al. Experimental Neurology 2003)。近年では虚血負荷が加わった後のストレスが神経保護効果をもたらすという ischemic postconditioning 現象に関する報告が散見され、我々も ischemic postconditioning によるミトコンドリア KATP チャンネルを介した神経保護効果をパッチクランプ法を用いて証明し報告した (Yokoyama, Nakagawa et al, PLOS One 2019)。しかし本現象においてミトコンドリア KATP チャンネルの活性化がどのように耐性獲得に寄与するかのその詳細なメカニズムに関しては未解明であり、特に電気生理学的な側面からの研究は少ない。

2. 研究の目的

今回我々はミトコンドリア局在 K_{ATP} チャンネルの活性化がミトコンドリアからの Ca^{2+} 放出をもたらす、NMDA 受容体反応を低減させることで虚血耐性を獲得するとする仮説をパッチクランプ法を用いて電気生理学的に証明を試みる。

3. 研究の方法

材料と方法

(1) マウス海馬スライスの調製

C57BL/6J マウス (全 8 1 匹) を使用した。4 ~ 8 週齢のマウスをイソフルラン (吸入により投与) で麻酔し断頭した。脳を素早く取り出し、海馬スライスを 350 μ m の厚さに切断し作成した。次いで、スライスを、305 . 15 で同じ混合ガスでバブリングした標準人工脳脊髄液 (aCSF, mmol/L での組成: NaCl 125, KCl 2.5, $NaHCO_3$ 25, NaH_2PO_4 1.25, $CaCl_2$ 2.0, $MgCl_2$ 1.0, D-glucose 10) でインキュベートした。

(2) パッチクランプ記録

各スライスを酸素飽和 aCSF を灌流した 800 μ l の記録チャンバーに入れ、温度を 30.4 . 15 ~ 30.6 . 15 K に維持した。記録チャンバーを、赤外微分干渉コントラスト (IR - DIC) および落射蛍光画像形成装置を備えた BX50WI 直立顕微鏡に取り付けた。EPC-9 パッチクランプ増幅器を用いて視覚的に同定された CA1 錐体細胞の体細胞から全細胞電位固定記録を行った。保持電位は -70 mV に設定した。パッチピペットを電極内液 (Cs-グルコン酸: 141, CsCl: 4.0, $MgCl_2$: 2.0, HEPES 10.0, Mg-ATP: 2.0) で満たし、グルタミン酸作動性自発興奮性シナプス後電流 (sEPSC) を単離するために、すべての記録を GABA-A/-B アンタゴニスト ピクロトキシン (50 μ mol/L) を補充した aCSF 中で行った。

(3) 脳スライスにおける虚血再灌流サイクル

グルコースと酸素をスクロースと窒素で置き換えた溶液にスライスをさらすことで脳虚血をシミュレートしました。7.5 分の虚血後、20 分間の再灌流を行った。虚血および PostC 試験では、7.5 分の虚血、30 秒の再灌流および 15 秒の虚血、ならびに 15 秒の再灌流および 15 秒の虚血の後、さらに 1 サイクルの 15 秒の再灌流および 15 秒の虚血後、再灌流/虚血のサイクルの後、20 分間の再灌流を行った。

(4) 実験計画

NMDAR 電流、 Ca^{2+} 濃度またはミトコンドリア膜電位を測定することにより、DZX (500 μ mol/L) および 5-HD (200 μ mol/L) を用いた化学的 PostC の効果を調べた。マウス海馬スライスを 5 群に分類した (Figure 1)。(1) コントロールグループ: スライスを 7.5 分の虚血にさらし、20 分間 aCSF で再灌流した。(2) PostC 群: 7.5 分の虚血および 30 秒の再灌流後、スライスを PostC 手順に曝露し、次いで aCSF で再灌流した。(3) DZ

X群：7.5分の虚血後、スライスをACSFで10分間DZXで処理し、次いで正常ACSFで10分間灌流した。(4)PostCおよび5-HD群：記録期間にわたって5-HDで処置した正常および無グルコースACSFの両方。虚血および再灌流スケジュールはPostCグループと同じであった。(5)PostCおよびCsA群：5分の正常灌流後、正常および無グルコースACSFの両方を、虚血、30秒の再灌流および3サイクルの虚血-再灌流スケジュールにわたってCsAで処置した。再灌流後、我々は通常のACSFで20分間灌流した。

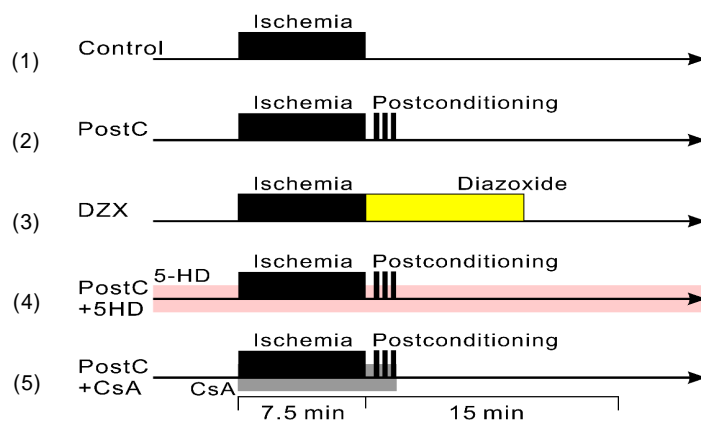


図 1

(5) NMDA アプリケーションに対する全細胞電流応答

NMDAR の感受性を評価するために、NMDA puff application に対する反応を whole cell recording で記録した。Puff application はマイクロピペットを用いて、NMDA (5 $\mu\text{mol/L}$) を 80~160ms の間細胞体に吹き付けた。NMDAR チャンネルの Mg^{2+} 遮断を減少させるために、ニューロンを刺激前 (1 秒) および刺激後期間 (6 秒) の間、-55mV の保持電位に電圧固定した。実験は 30~35 分かけて行い、NMDAR による電流記録は 30 秒ごとに行いました。

(6) 細胞質内 Ca^{2+} 変化の蛍光分析

細胞質内 Ca^{2+} 変化を評価するために、15 $\mu\text{mol/L}$ の fura-2 をピペット溶液に添加することによって、whole cell 電位固定錐体細胞の fura-2 蛍光シグナルを測定した。多波長照明システムを使用して、Fura-2 を 340 nm および 380 nm で 10 秒ごとに励起した。蛍光発光を 510 nm でフィルター処理した。画像は、40 倍水浸対物レンズおよび CCD カメラを使用して取得した。照明および画像取得は、MetaMorph ソフトウェア (Molecular Devices, USA) を用いて制御した。体細胞の中心に通常位置する最大蛍光強度を有する円形領域 (直径 5 μm) を関心領域として設定した。340 nm 励起の領域における平均蛍光強度と 380 nm 励起の領域における平均蛍光強度の比を計算した。

(7) ミトコンドリア膜電位の蛍光分析

ミトコンドリア膜電位を評価するために、発光波長の電位依存シフトを示す蛍光色素、JC1 (Cayman Chemical, USA) をパッチピペットを通してサイトゾルにロードした。パッチピペットを無色素内部溶液で先端充填し、次いで使用直前に色素含有内部溶液 (2.0 $\mu\text{mol/L}$) で再充填した。J凝集状態 (赤色蛍光) については、JC1 を 580 nm ダイクロイックミラーを用いて 548 nm で励起し、そして蛍光発光を 590 nm でロングパスフィルター処理した。単量体状態 (緑色蛍光) については、JC1 を 500 nm ダイクロイックミラーを用いて 477 nm で励起し、そして発光を 515~565 nm の間でバンドパスフィルター処理した。蛍光測定は、fura-2 と同じ装置を用いて 30 秒間隔で行った。

(8) 統計分析

群間の NMDA 誘導電流振幅および蛍光比の比較のために、各実験値を、各錐体細胞についての虚血前 5 分期間中の平均値に対する百分率として表した。百分率データは、一元配置分散分析を用いて統計的に分析した。有意な効果を事後多重比較検定でさらに検定した。有意差としてデータ $p < 0.05$ を決定した。

4. 研究成果

コントロール（虚血再灌流負荷）と比較して、PostC は再灌流後の NMDAR 電流を有意に抑制した（図 2 A、B）。 DZX, mitoKATP チャンネル開口薬 DZX 投与群においても再灌流後に NMDAR 電流を有意に抑制した（図 2 B）。 さらに mPTP 阻害剤である CsA 投与により PostC による NMDAR 電流抑制効果がキャンセルされた（図 2B）。

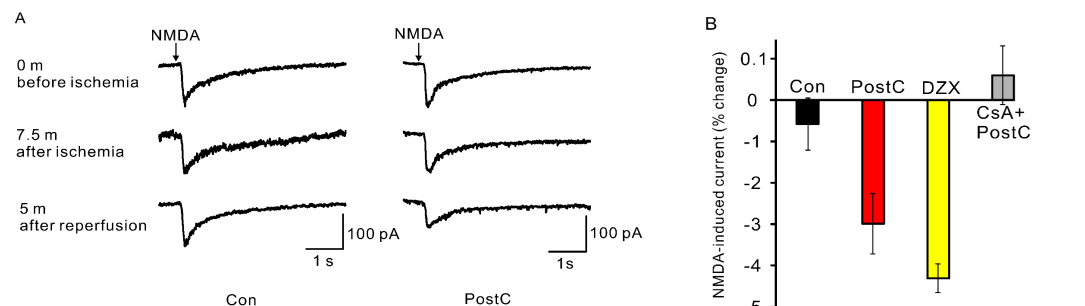


図 2

コントロール、PostC、DZX および 5-HD、PostC 群で細胞内カルシウム濃度を測定した（図 3A）。 PostC および DZX 群において Fura-2 比の % 変化は、コントロール群と比較して有意に低下した（図 3 B、C）。 5-HD+PostC においては PostC に比して Fura-2 変化比は有意に増加した（図 3B、C）。

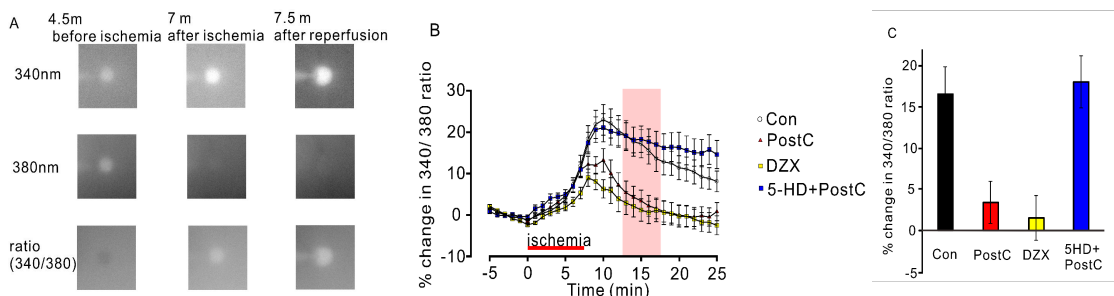


図 3

Ca²⁺ を Mg で置き換えて細胞外 Ca²⁺ をゼロにして細胞内カルシウム濃度を測定すると、コントロール群に比して細胞外 Ca²⁺ を含まないコントロール（Ca⁰）、PostC（Ca⁰）では有意に低下を認めた（Fig. 4A、B）。 Con（Ca⁰）の波形および Fura-2 の経時変化比は PostC（Ca⁰）とほぼ同じ挙動を示した。（図 4 B）。

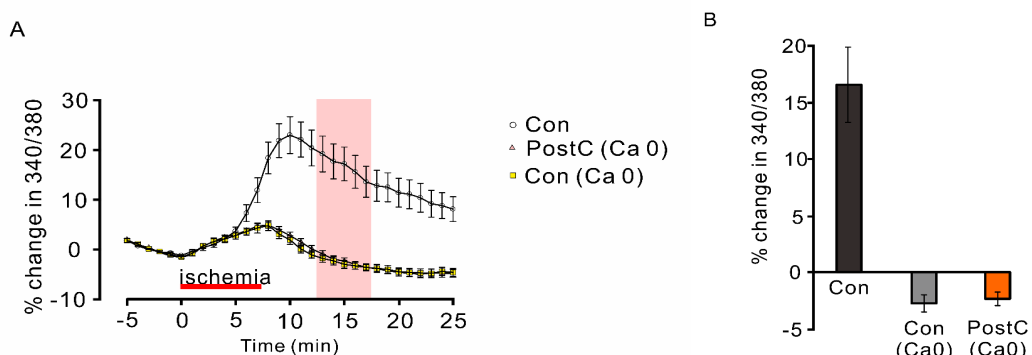


図 4

NMDA 競合阻害剤 DL-AP5 5 μmol/L を用いて、NMDA を遮断した状態で細胞内カルシウム濃度を測定した。 ACSF に DL-AP5 を投与した場合、コントロール群の Fura-2 の変化比は、DL-AP5 なしのコントロール群と比較して顕著に抑制された（図 5A、B）。

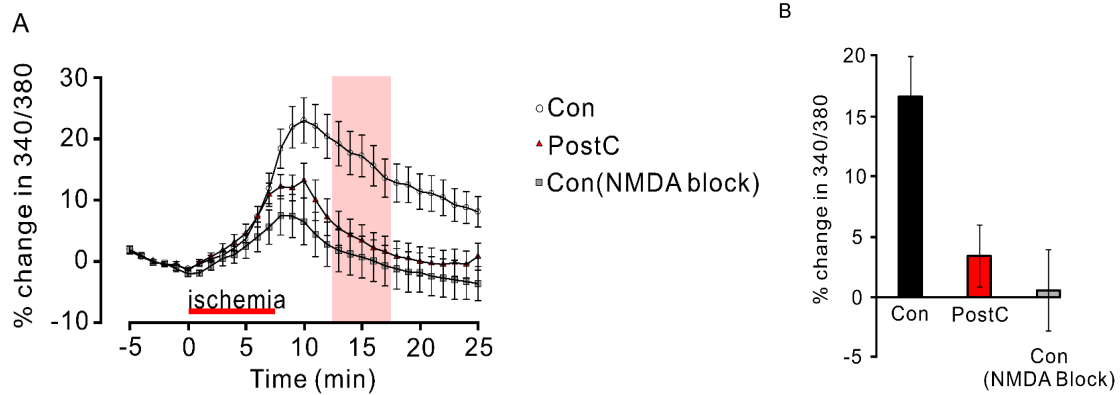


図5

次にミトコンドリア膜電位変化を調べた。JC-1 偏光ミトコンドリアは赤色蛍光を示す。ミトコンドリアの酸化的リン酸化の脱共役剤である FCCP を投与することによって JC-1 の蛍光変化を確認した。(図 6A,B)。さらに PostC 群のミトコンドリア膜電位がコントロール群と比較して早期再灌流後に一時的に有意に脱分極を示した(図 6C、D)。また、DZX 群のミトコンドリア膜電位は、コントロール群と比較して再灌流後に持続的に脱分極することを示した(図 6C、D)。

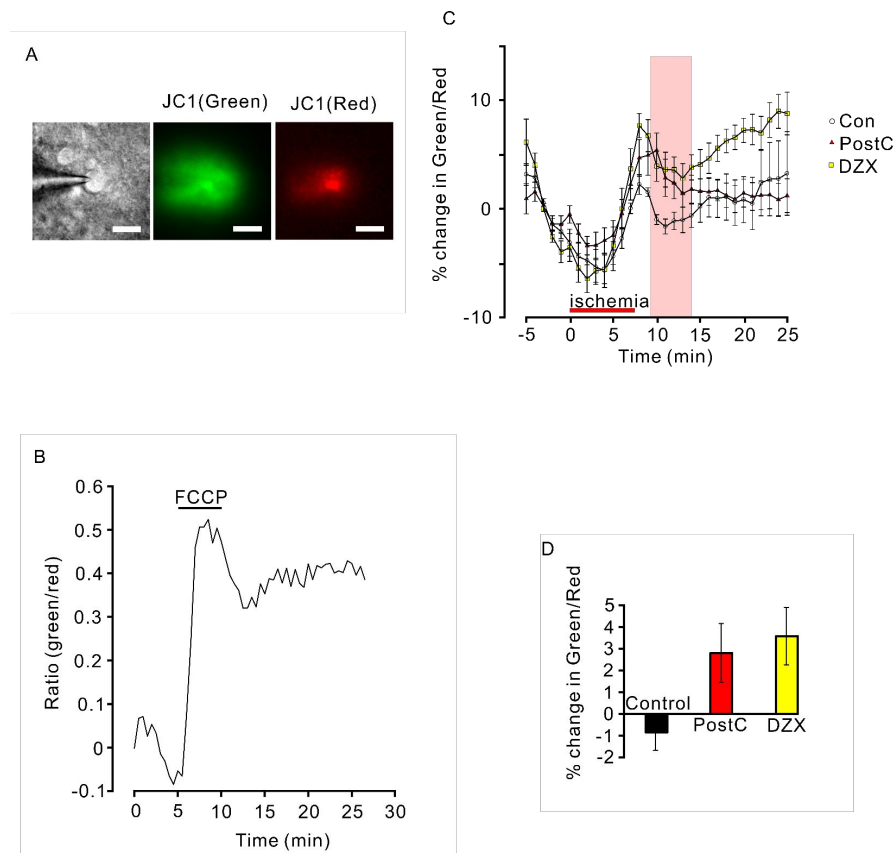


図6

Ischemic PostC は、ミトコンドリア KATP チャンネルの開口が関与し、一時的にミトコンドリアを脱分極させることを示した。さらに ischemic PostC の発動には mPTP の少なくとも一時的な開口が必要であることを示し、それにより NMDA 受容体を down regulation させることで細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を抑制することを示した。本研究は、ミトコンドリアが過性の mPTP 開口による NMDAR silencing を介したミトコンドリア KATP チャンネルの開口によって誘導される PostC の神経保護効果に中心的な役割を果たすことが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yokoyama S, Nakagawa I, Ogawa Y, Morisaki Y, Motoyama Y, Park YS, Saito Y, Nakase H. Ischemic postconditioning prevents surge of presynaptic glutamate release by activating mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the mouse hippocampus. PLoS One. 2019 Apr 12;14(4)

〔学会発表〕(計8件)

神経細胞における Ischemic postconditioning の電気生理学的検討 NMDA 受容体感受性の関与を含めた検討 森崎雄大、中川一郎、横山昇平、西村文彦、山田修一、横田浩、本山靖、朴永銖、小川陽一、齋藤康彦、中瀬裕之 日本脳卒中学会学術集会 2018.03.15 福岡

神経細胞における Ischemic postconditioning の電気生理学的検討 細胞内 Ca^{2+} 濃度と NMDA 受容体感受性変化 森崎雄大、中川一郎、横山昇平、西村文彦、山田修一、横田浩、本山靖、朴永銖、小川陽一、齋藤康彦、中瀬裕之 第4回日本心血管脳卒中学会学術集会 2018.06.15 東京

Ischemic Postconditioning 現象はミトコンドリア PTP 開口を介して NMDA 受容体発現を抑制する 森崎雄大、中川一郎、横山昇平、輪島大介、西村文彦、山田修一、本山靖、朴永銖、小川陽一、齋藤康彦、中瀬裕之 第33回奈良脳神経ネットワーク研究会 2018.09.28 橿原

神経細胞における虚血耐性現象の解明 Ischemic postconditioning の電気生理学的検討 森崎雄大、中川一郎、横山昇平、西村文彦、山田修一、横田浩、本山靖、朴永銖、小川陽一、齋藤康彦、中瀬裕之 日本脳神経外科学会学術総会 2018.10.11 仙台

Ischemic postconditioning induced by opening of mK^+ ATP channels and NMDAR silencing by mPTP opening Morisaki Y, Nakagawa I, Yokoyama S, Ogawa Y, Saito Y, Nakase H. AANS/CNS annual meeting 2019.02.04 Honolulu.

神経細胞における虚血耐性現象の解明 Ischemic postconditioning の電気生理学的検討 森崎雄大、中川一郎、横山昇平、小川陽一、齋藤康彦、中瀬裕之 日本脳卒中学会学術集会 2019.03.21 横浜

Mechanism of ischemic postconditioning with electrophysiological approach Morisaki Y, Nakagawa I, Yokoyama S, Ogawa Y, Saito Y, Nakase H. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) 2019.03.29 Kobe

Ischemic postconditioning silences NMDA receptor currents through the mitochondrial permeability transition pore opening in the mice hippocampal neurons. Furuta T, Nakagawa I, Morisaki Y, Yokoyama S, Nishimura F, Yamada S, Ogawa Y, Saito Y, Nakase H. Brain & Brain PET 2019 2019.07.04 Yokohama

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：古田隆徳、小川陽一、齋藤康彦

ローマ字氏名：Takanori Furuta, Yoichi Ogawa, Yasuhiko Saito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。