

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591699

研究課題名（和文） 虚血・てんかんにおけるカルシウム代謝異常の細胞生理学的研究

研究課題名（英文）

Cyto-physiological study of abnormal Ca^{2+} metabolism in ischemic and epileptic neuronal death

研究代表者 小黒 恵司 (OGURO KEIJI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90231232

研究成果の概要：IP₃3キナーゼノックアウトマウス=IP₄欠損マウス、幼若砂ネズミ、ELマウスを用い、細胞内Ca²⁺動態と虚血・てんかんとの関係を検討した。

IP₄欠損マウスを使用し、学習・記憶障害とCa²⁺動態の変化を組織学的・生理学的に観察した結果、IP₄が虚血時の細胞内Ca²⁺の増加経路の1つとなっており、学習・記憶の獲得にも関与していることを明らかにした。また、生後2週以内の砂ネズミを使い、AMPA型グルタミン酸受容体のGluR2が幼弱期における神経細胞死の制御を、細胞内Ca²⁺の調節を介して行なっている可能性を見いだした。さらにてんかん自然発生ELマウスでは、細胞骨格蛋白の異常、海馬CA3における過剰興奮性がAMPA&NMDA両グルタミン酸受容体経由の細胞内Ca²⁺の増加を介して、てんかん原性・発作原性に関与している可能性を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学・機能脳神経外科

キーワード：①脳虚血②てんかん③細胞死④細胞内カルシウム⑤ELマウス

1. 研究開始当初の背景

我々はげっ歯類海馬CA1領域に起こる遅発性神経細胞死(Delayed Neuronal Death=DND)につき、細胞内Ca²⁺代謝異常の面から、組織化学的・生理学的検討を重ねてきた。てんかんと関連においては、遺伝的てんかん発動物であるELマウスにおいて、特に海馬CA3における細胞骨格蛋白の異常や細胞内Ca²⁺代謝異常が脳内の異常興奮伝達に関与するの

みならず、てんかん原性・発作原性の獲得にも関与している可能性を明らかにした。本研究は従来の研究成果を背景に、細胞生物学的手法および電気生理学的手法を組み合わせ、虚血・てんかんにおける細胞死およびてんかん原性・発作原性獲得の主因としての細胞内外Ca²⁺代謝異常の成因を分子レベルで追及する。

2. 研究の目的

(1) IP_3 3 (A)キナーゼノックアウトマウスにおける機能的変化 (IP_4 の細胞死における役割)

近年、 IP_3 に加え、 IP_4 の細胞内カルシウム増加作用を示唆する実験結果が報告されている。我々は、虚血後の砂ネズミ海馬スライスにおいて、細胞内の Ca^{2+} 増加には従来より言われている IP_3 による細胞内貯蔵部からの Ca^{2+} 放出の他に、 IP_4 による細胞外からの Ca^{2+} 流入が関与しており、虚血細胞においてはむしろ後者が重要な役割を果たしていることを明らかにした。(J Physiol. (London) 497:1996; 67-78.)。

そこで、虚血後の遅発性神経細胞死における IP_4 の役割をより明確にする為、 IP_3 3 (A) kinase ノックアウトマウスを使用することにした。本マウスでは IP_4 が野生種に比し 90%以上減弱している。

(2) 幼若砂ネズミの虚血・てんかん抵抗性

一般的に幼若動物の脳は虚血に強いと言われているが、実験的検討例は少ない。幼弱動物の虚血抵抗性の機序を実験的に明らかにし、治療の可能性についても検討する。

(3) ELマウスにおけるてんかん原性・発作原性の機序獲得に関する研究

遺伝的てんかん動物として知られる EL マウスは、離乳期の生後 3, 4 週より放り上げや尻尾を持って回転を与えるなどの発作誘発刺激を与えることにより、生後 10 週前後よりわずかな刺激 (ケージの移動など) で 2 次性全般化を伴うてんかん発作を起こすようになる。この様に EL マウスは優性多遺伝子素因に加え、発作誘発と発作履歴という後天的素因が加わることによりてんかん原性 (脳がてんかん発作を起こす性質を有すること) と発作原性 (同じく発作を頻繁に起こす性質を有すること) を獲得する。本マウスにおいては細胞死など形態学的二次的变化が明らかでない点で、より純粹にてんかん原性獲得機序の視点からの研究を可能とする。また、てんかん・発作原性の獲得には発作履歴を必要とし、長期間を要する点で、ヒトてんかんにより類似している。以上より、本マウスにおける未だ未知のてんかん原性・発作原性の獲得機序を明らかにすることはヒトてんかんの機序獲得ひいては治療にも結びつくものであり、非常に有益である。

3. 研究の方法

(1) IP_3 3 (A) kinase ノックアウトマウスと野生種における、behavior や虚血・てんかんに対する脆弱性および電気生理学的な反応を比較することにより、 IP_4 の虚血性細胞死における役割を探索し、生理的機能も明らかにしてゆく。

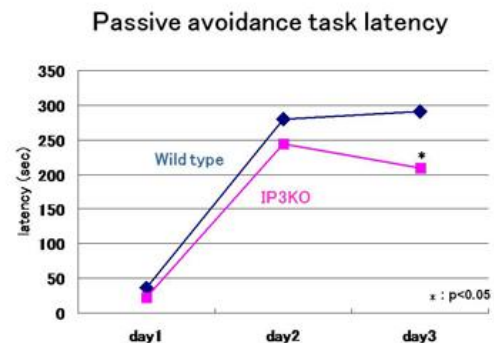
(2) 生後 2 週間以内の砂ネズミを使い、実際に前脳虚血に対し抵抗性があるを組織学的に検討し、虚血性神経細胞死に深く関わる細胞内増加 Ca^{2+} の虚血後の変化を成動物と比較した。さらにアポトーシス抵抗蛋白 & Ca^{2+} 関連蛋白として細胞膜 Ca^{2+} の-ATPase、GluR1-4 蛋白の生後からの経時的変化を Western blot にて検討した。

(3) 12 週齢以降の EL 及び同週齢コントロール DDY マウス海馬を用いた。まず、細胞骨格蛋白の免疫組織化学的検討を行い、スライス灌流液中の酸素・グルコース除去による虚血性の細胞興奮刺激を与え、Rhod2 AM を用いた Ca^{2+} イメージング法により細胞内 Ca^{2+} の変化を観察した。さらに幼若動物の経時的変化を観察し、虚血時細胞内増加 Ca^{2+} の由来を検討した。

4. 研究成果

(1)

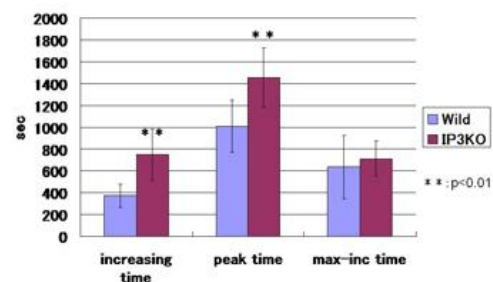
① passive avoidance task



電気ショックを用いた passive avoidance task で、ノックアウトマウスは野生種に比し、学習・記憶能力に劣っていた。

② 虚血後の細胞内の Ca^{2+} 増加

[Ca^{2+}]i上昇開始時間とピークまでの時間



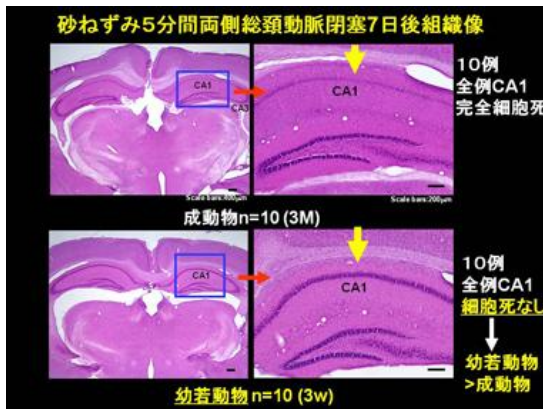
rhod2-AMを用いた海馬スライスの Ca^{2+} イメージングで、ノックアウトマウスは Glucose-Oxygen deprivation 虚血後、CA1 における細胞内 Ca^{2+} の増加開始までの時間が長く、最大に達するまでの増加率も緩やかであ

った。

以上より IP₄ は細胞内 Ca²⁺ の流入経路の 1 つとなっており、学習・記憶の獲得に関与していることが推測された。

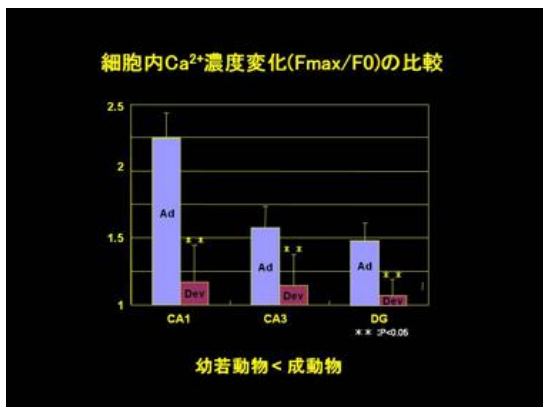
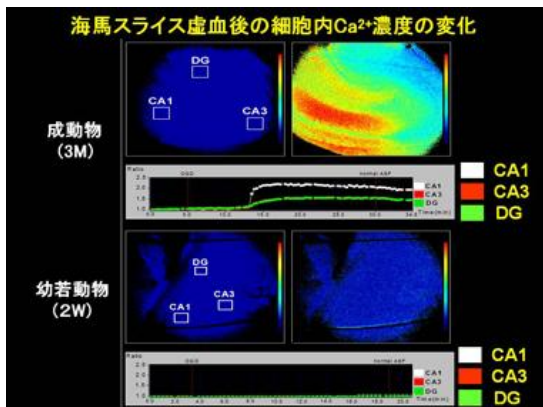
(2)

①前脳虚血後の組織学的比較



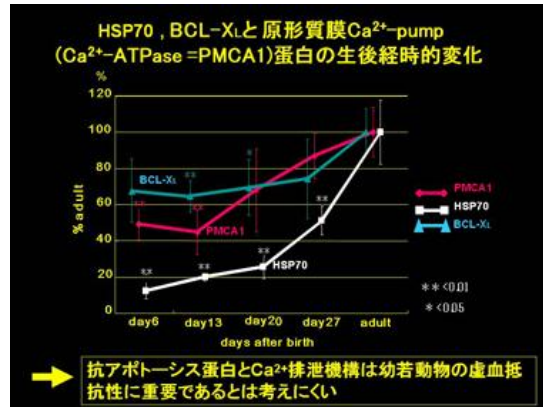
成&幼若砂ねずみに 5 分間の前脳虚血負荷を加え、組織学的に検討したところ、成砂ネズミでは全例 CA1 の完全な細胞死が得られたが、幼若個体では全く細胞死が得られず、虚血抵抗性が明らかとなった。

②虚血後の細胞内 Ca²⁺ の変化



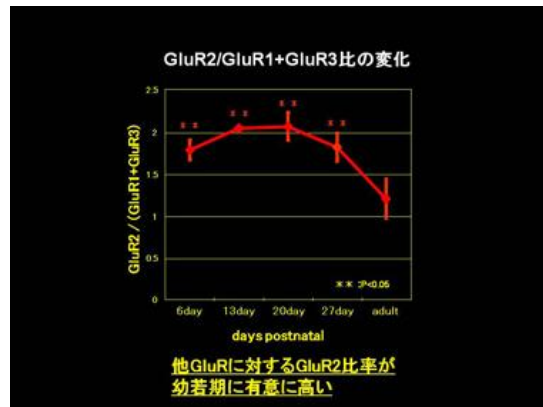
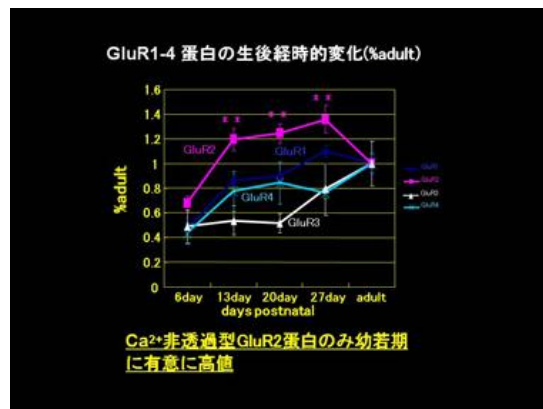
海馬スライスの細胞内 Ca²⁺ イメージング法では、虚血後の幼若砂ネズミの細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が成体に比し、著明に低いことが明らかになった。

③抗アポトーシス蛋白の検討



抗アポトーシス蛋白は成動物の方が多く存在し、幼若動物の虚血抵抗性を説明出来るものではなかった。

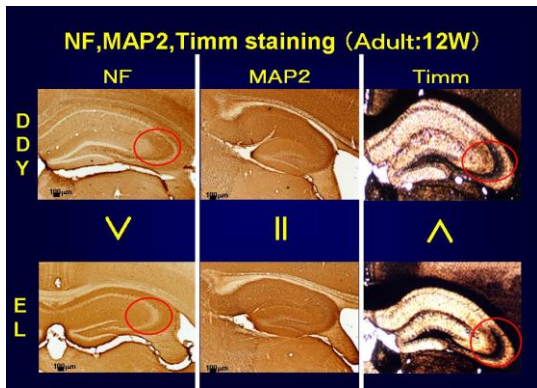
④AMPA 型グルタミン酸受容体の検討



幼弱動物において GluR2 のみが成動物に比し、相対的に多く存在することがわかり、虚血時の細胞内 Ca²⁺ が増加しにくい一つの原因である可能性が示唆された。

(3)

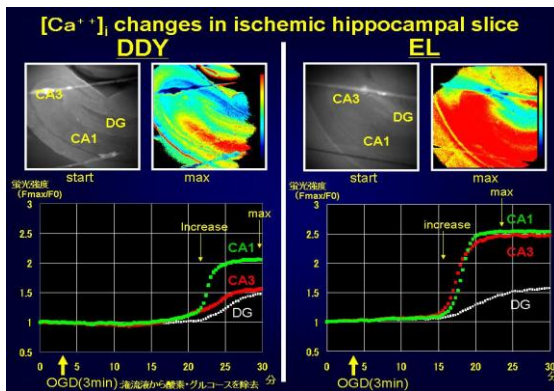
①神経細胞骨格



Neurofilament (NF), MAP2 の免疫組織染色と Mossy fiber を示す Timm 染色である。上段がコントロールの DDY マウス。下段が EL マウス。NF では DDY において DG から CA3 にかけての St radiatum に豊富な発達が認められるが、EL ではほとんど未発達である。MAP2 染色ではほとんど差は認められなかった。Timm 染色では、EL において mossy fiber に一致した部位で、より強い発現が認められた。

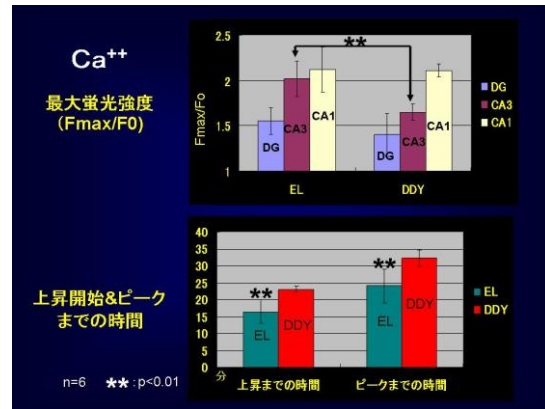
②EL 海馬における過剰興奮性

<虚血時の海馬スライスにおける虚血時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化>



左が DDY マウス。右が EL マウス。上段は虚血負荷前の海馬スライス。DG, CA3, CA1 が図示されている。下のグラフは横軸に時間軸をとり、縦軸に時間毎の蛍光強度を開始時の蛍光強度に対する比率で表したものである。開始 3 分後に灌流液中の酸素とグルコースを除去し、虚血刺激を開始した。開始約 20 分後に各領域の Ca^{2+} が上昇し始め、特に CA1 においては約 2 倍の著明な上昇を認めた。CA3 と DG は 1.5 倍程度に留まった。EL マウスではより早い約 15 分 CA1 とともに CA3 の著明な上昇が認められた。

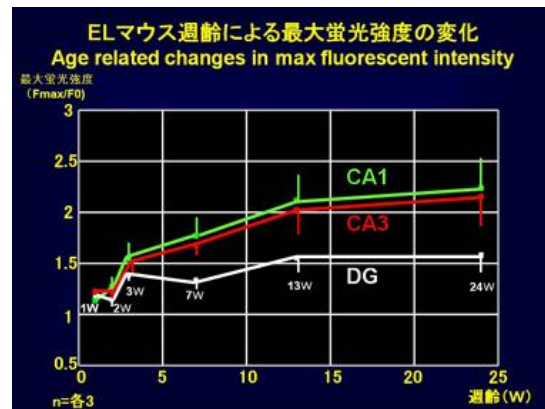
上段右側が蛍光が max に達したときの画像である。DDY では CA1 のみが著明に上昇しているが、EL では CA3 を含め、広い範囲で上昇している。



結果のまとめである。上段は各領域における最大蛍光強度をグラフ化したもの。DDY, EL とも CA1 が 2 倍以上の著明な上昇を示している。これに対し、CA3 については DDY で CA1 の 75% 程度の上昇と差があるのに対し、EL では CA1 と同程度の著明な上昇が認められる。CA3 が虚血に対して過剰興奮性を有することが分かる。

下段は上昇開始時間と蛍光強度がピークに達するまでの時間をグラフ化したもの。DDY に比し EL では虚血開始後、有意に短時間で細胞内 Ca^{2+} が上昇し、最大値に達することが分かる。

<週齢による EL 虚血時の細胞内 Ca^{2+} 最大蛍光強度の変化>

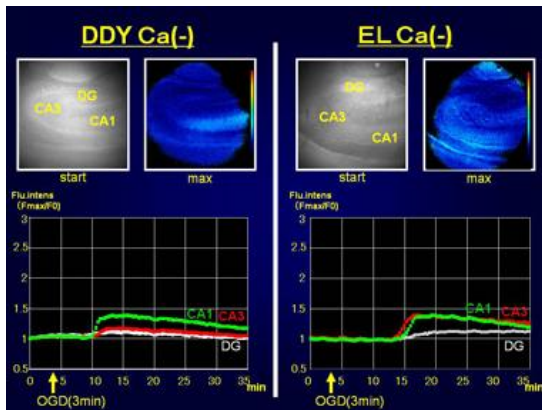


CA1 と CA3 において 3 週までに急速に増加し、ついで緩やかに増加し、13 週以降は著明な上昇を認めません。CA3 における、虚血に対する、CA1 に匹敵するような強い反応性は、成長してから急に起こってくるようなものではなく、CA1 と平行に週齢に応じて序々に増加してゆく。そして、てんかん発作が出現しはじめる、生後約 10 週前後でピークに近い値に至ることが分かる。

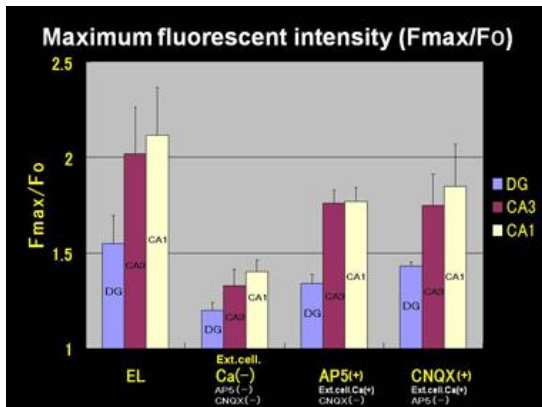
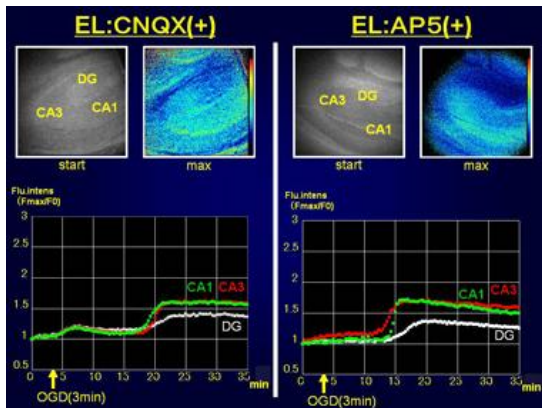
③細胞内増加 Ca^{2+} の由来

<細胞外 Ca^{2+} 除去>

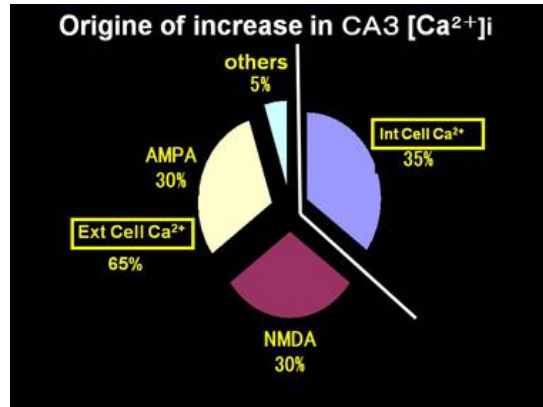
小黒恵司, 横田英典, 渡辺英寿: 光トポグラフィーによる非侵襲的言語機能の計測. 臨床脳波 50:110-117.



細胞外 Ca^{2+} を除去すると、CA1、CA3 ともに虚血時の細胞外 Ca^{2+} の増加は約 75%減少する。
 <NMDA&A 受容体拮抗薬の投与>



NMDA 受容体拮抗薬 AP5 と AMPA 型受容体拮抗薬 CNQX 投与時のいずれも虚血時細胞内 Ca^{2+} の上昇は 30%程度抑制された



以上より、虚血後の細胞内増加 Ca^{2+} の由来は細胞外 65%、細胞内 35%。細胞外のうち、NMDA 型と AMPA 型がおおよそ半分ずつを占めることが明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 小黒恵司, 横田英典, 渡辺英寿: 近赤外線光イメージングによる非侵襲的脳機能モニタリングの臨床応用. CI 研究 10:173-182. 2008 査読有
- ② 小黒恵司, 横田英典, 渡辺英寿: 光トポグラフィーによるてんかん焦点診断. Clinical Neuroscience 26: 63-66. 2008 査読無
- ③ 小黒恵司, 横田英典, 渡辺英寿: 光トポグラフィーによる高次脳機能計測. 神経内科 68: 70-81. 2008 査読無
- ④ 小黒恵司, 横田英典, 渡辺英寿: 近赤外線光トポグラフィーによる脳機能計測. 脳 21 10; 376-381. 2007 査読無
- ⑤ 横田英典, 小黒恵司, 渡辺英寿: てんかん外科と光トポグラフィ. 臨床脳波 49:784-791. 2007 査読無
- ⑥ 横田英典, 小黒恵司, 渡辺英寿: 画像的診断法の進歩. てんかん 2:105-109. 2007 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ① Oguro K, Yokota H, Miyawaki T, Shimazaki K, Murashima Y, Watanabe E: Enhanced excitability on hippocampal CA3 in EL mice. 62th Annual meeting of American Epilepsy Society, 2008 年 12 月 5-9 日, シアトル, 米国
- ② Yokota H, Miyawaki T, Oguro K, Shimazaki K, Murashima Y, Watanabe E: Structural features in hippocampus and cortex in EL mouse. 62th Annual meeting of American Epilepsy

Society, 2008年12月5-9日, シアトル, 米国

- ③ 小黒恵司、横田英典、島崎久仁子、村島善也、渡辺英寿：EL マウス海馬における過剰興奮性とグルタミン酸受容体. 第67日本脳神経外科学会総会, 2008年10月1-3日
- ④ 宮脇貴裕、益子敏弘、横田英典、小黒恵司、Jones EA、Zukin RS：短時間虚血における虚血耐性に PI3/Akt pathway とミトコンドリア膜の安定化の維持が関与する. 第67回日本脳神経外科学会総会, 2008年10月1-3日
- ⑤ 須田智、島崎久仁子、上田雅之、加藤健吾、稲葉俊東、横田英典、小黒恵司、渡辺英寿、片山泰明：ラット局所脳虚血モデルにおける骨髄間葉系幹細胞の投与方法による脳保護効果. 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9-11日, 東京
- ⑥ Shimazaki K, Suda S, Oguro K, Yokota H, Watanabe E, Okada T. Transduction characters of adeno-associate virus (AAV) vectors serotypes 2, 8 and 9 in the hippocampus. 第58回日本生理学会大会, 2008年3月25-27 東京
- ⑦ Oguro K, Yokota H, Miyawaki T, Kato K, Shimazaki K, Murashima Y, Watanabe E：Enhanced excitability on hippocampal CA3 in EL mice. 37th annual meeting of Society for Neuroscience, SanDiego, USA. 2007. 11. 3-7.
- ⑧ Yokota H, Oguro K, Miyawaki T, Fujii H, Kato K, Shimazaki K, MURASHIMA Y, Watanabe E：Structural and functional features in hippocampus in EL mouse. 37th annual meeting of Society for Neuroscience, SanDiego, USA. 2007. 11. 3-7.
- ⑨ 小黒恵司、横田英典、宮脇貴裕、島崎久仁子、村島善也、渡辺英寿：EL マウスにおける過剰興奮性の獲得と新たな抗てんかん薬レベチラセタムの効果. 第41回日本てんかん学会, 2007年11月1, 2日
- ⑩ 小黒恵司、横田英典、紺野武彦、島崎久仁子、村島善也、渡辺英寿：てんかん自然発生 EL マウスにおける神経回路網の異常と過剰興奮性. 第66回脳神経外科学会総会, 2007年10月3-5日, 東京

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小黒 恵司 (OGURO KEIJI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：90231232

(2) 研究分担者

横田 英典 (YOKOTA HIDENORI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：90294929

渡辺 英寿 (WATANABE EIJU)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：50150272

(3) 連携研究者

()

研究者番号：