

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09489

研究課題名(和文)メラトニン受容体を介したミトコンドリア膜電位制御のメカニズム

研究課題名(英文) Melatonin-Induced Postconditioning Suppresses NMDAR through Opening of the mPTP via Melatonin Receptor in Mouse Neurons

研究代表者

中川 一郎 (Nakagawa, Ichiro)

奈良県立医科大学・医学部・病院教授

研究者番号：20550825

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)：マウスを用いコントロール群、メラトニン誘導による薬剤性PostC(メラトニン群)、メラトニン受容体(MT)作動薬群、メラトニン+MT阻害薬群、MT作動薬+permeability transition pore(mPTP)阻害薬群と比較した。結果はメラトニン群はsEPSCの急増を抑制し、NMDA受容体電流はメラトニン群やMT作動薬群で減少したが、MT阻害薬併用群やmPTP阻害薬併用群では認められなかった。ミトコンドリア膜電位はメラトニン群やMT作動薬群における蛍光比の変化率が有意に高くメラトニンはMTを介した機序でNMDA受容体活性を低下させ、神経保護効果をもたらすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血耐性現象(PostC)は、致死的な虚血負荷の後に間欠的な虚血負荷を加え、再灌流後障害を抑制する現象である。メラトニンは概日リズムを調節するホルモンだが、その神経保護効果も近年注目されている。今回、マウスの海馬錐体細胞でメラトニン誘発性PostCの効果について検討した。本研究の結果メラトニンはsEPSCやNMDA誘導電流の増加、細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇等を抑制して神経保護をもたらすことが分かった。さらにその機序がMT受容体やmPTPを介したものであり、ミトコンドリア膜電位の変化も関与していることが分かった。よってメラトニンはMTを介して神経保護効果をもたらすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Melatonin is a hormone that regulates circadian rhythms, but its neuroprotective effects have also attracted attention in recent years.

In this study, we investigated the effects of melatonin-induced PostC in mouse hippocampal pyramidal cells. Mice were used to compare control, melatonin-induced drug-induced PostC (melatonin group), melatonin receptor (MT) agonist, melatonin + MT inhibitor, and MT agonist + permeability transition pore (mPTP) inhibitor groups.

Results showed that the melatonin group suppressed the rapid increase in sEPSC, and NMDA receptor currents were reduced in the melatonin and MT agonist groups, but not in the MT inhibitor combination group or the mPTP inhibitor combination group. Mitochondrial membrane potentials showed significantly higher rates of change in fluorescence ratios in the melatonin and MT agonist groups, indicating that melatonin reduces NMDA receptor activity through an MT-mediated mechanism, resulting in neuroprotective effects.

研究分野：神経虚血耐性

キーワード：Melatonin Postconditioning patchclamp method

研究テーマ名 メラトニン受容体を介したミトコンドリア膜電位制御のメカニズム

奈良県立医科大学 脳神経外科 中川一郎

### 1. 研究開始当初の背景

虚血性耐性現象 (Ischemic Post-conditioning; ischemic PostC) には、ミトコンドリア透過性遷移孔 (mPTP) を介したミトコンドリア膜電位調節が関与していると報告されている。メラトニンは、概日リズムを制御する内因性ホルモンであり、近年ミトコンドリアのメラトニン受容体 (MT) を介した神経保護作用が注目されているが、PostC に関連する神経保護メカニズムの詳細は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

申請者らは、C57BL マウスの海馬 CA1 錐体細胞を用いて、メラトニンによる ischemic PostC 類似メカニズムによる神経保護効果における MT および mPTP の関与について検討した。

### 3. 研究の方法

C57BL マウスの海馬 CA1 錐体細胞を用いた。ホールセルパッチクランプ法を用いて虚血負荷後の spontaneous EPSC (sEPSC) の変化を測定し、7.5 分間の虚血負荷後のメラトニンを投与したメラトニン投与群と、コントロール群の間で sEPSC の頻度を計測した。また同群間の虚血負荷後の死細胞数について組織学的に計測した。さらに細胞内カルシウム濃度、ミトコンドリア膜電位および NMDA 受容体電流の虚血負荷後の変化を測定した。これらをコントロール群、メラトニン投与群、MT 作動薬 (ラメルテオン) 群、メラトニン + MT 阻害薬 (ルジンドール) 群、メラトニン + mPTP 閉鎖薬 (シスプラチン A) 投与群の 5 群において群間比較を行った。

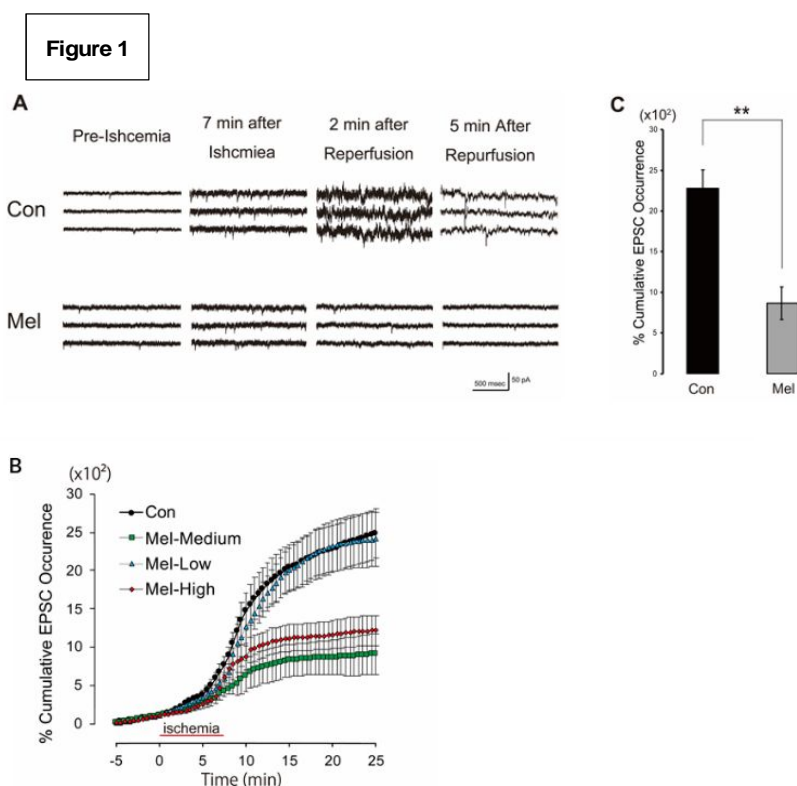
### 4. 研究成果

#### メラトニン誘導 PostC による sEPSC 抑制効果

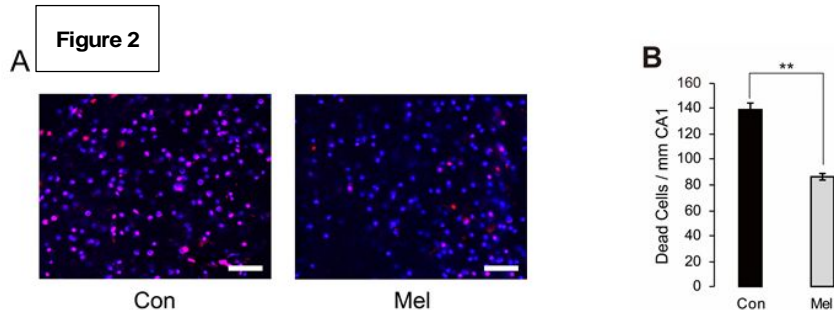
メラトニンによる PostC は sEPSC 頻度の急激な増加を抑制し (Figure 1 A, B)、メラトニンの最大効果は中濃度群 (100  $\mu$ M) で観察された (Figure 1A, B)。虚血再灌流後 20 分のメラトニン誘導 PostC 群の累積 sEPSCs は、対照群より有意に低かった ( $p < 0.01$ ) (Figure 1C)。

#### メラトニン誘導 PostC による死細胞減少効果

メラトニン誘導 PostC が海馬 CA1 神経細胞の死細胞数を減少させること



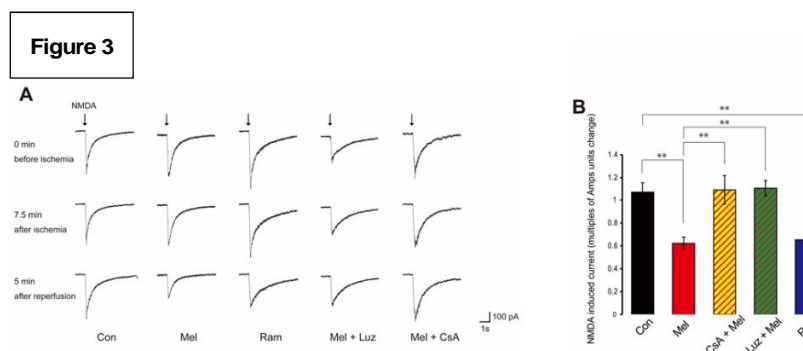
を検証するために2種類の色素を用いて死細胞数をカウントした (Figure 2A)。メラトニン誘導 PostC 群では、対照群に比べて虚血後の死細胞が有意に少ないことがわかった ( $p < 0.01$ ) (Figure 2B)。



この所見は PostC を介したメラトニンによる神経保護が虚血再灌流障害後 20 分以内に作用することを示した。

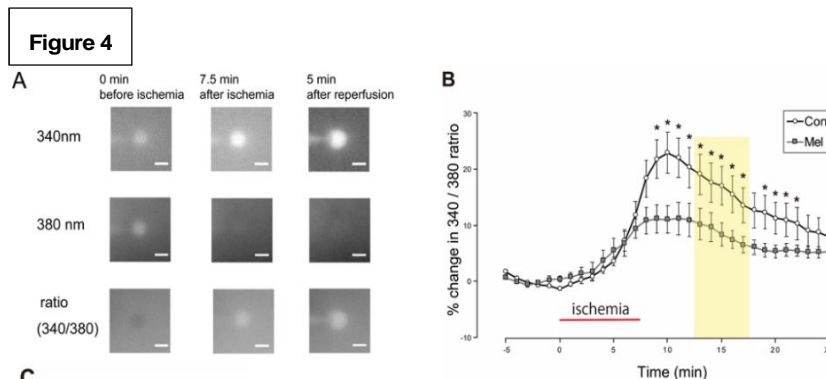
### メラトニン誘導 PostC の再灌流後 NMDAR 電流抑制効果

再灌流初期の NMDAR 電流はコントロール群に比しメラトニン群では大きく減少した ( $p < 0.01$ )。ラメルテオン群では、NMDAR 電流が対照群と比較して減少した ( $p < 0.01$ )。さらにメラトニン群ではルジンドール+メラトニン群およびメラトニン+CsA 群と比較して NMDAR 電流が減少した ( $p < 0.01$  for both) (Figure 3A,B)。これらの結果はメラトニンによる PostC が再灌流初期に NMDAR 活性を抑制しその効果が MT によって媒介されることを示している。



### メラトニン誘導 PostC の細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇抑制

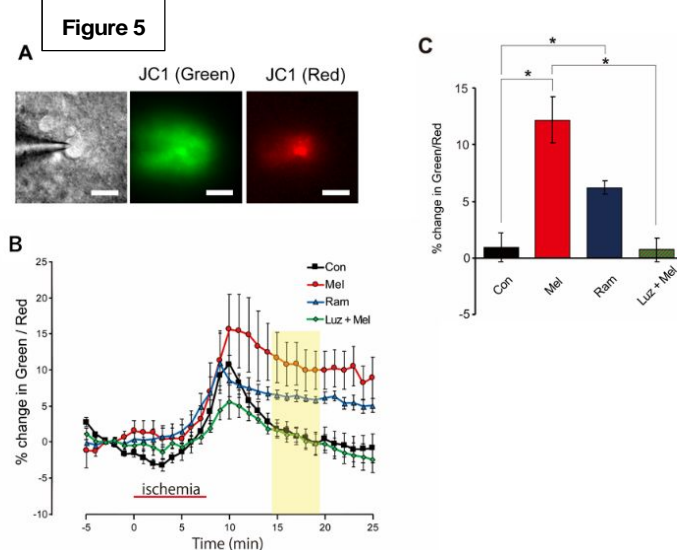
虚血負荷中 Fura-2 比は徐々に増加し細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度の増加を示した (Figure 4A,B)。メラトニン誘導 PostC 群では、Fura-2 比の変化率がコントロール群



に比べて有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (Figure 4B)。これらの結果はメラトニンによる PostC が再灌流初期における細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を抑制することを示す。

### メラトニン誘導 PostC によるミトコンドリア膜電位の一時的脱分極

JC1 蛍光法によりミトコンドリア膜電位変化を各群で比較した。(Figure 5A)。メラトニン群およびラメルテオン群の緑/赤比は、対照群に比べて有意に高かった ( $p < 0.05$  for both)。メラトニン群の緑/赤比はルジンドール+メラトニン群に比べて有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (Figure 5B,C)。これらの結果は、再灌流初期において、メラトニン群ではコントロール群よりもミトコンドリア膜電位が脱分極していたことを示した。



本研究では、電気生理学的アプローチを用いて、マウス海馬 CA1 細胞の虚血再灌流傷害に対するメラトニン誘導 PostC の神経保護効果を明らかにした。メラトニンは虚血再灌流後のシナプス性グルタミン酸放出の急増と神経細胞死を抑制した。メラトニンによる PostC は NMDAR 電流を抑制することにより、虚血状態での細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を強く抑制し、mPTP 阻害剤 (CsA) と MT 阻害薬 (ルジンドール) はいずれもメラトニン誘発 PostC 効果をキャンセルした。さらに、メラトニンおよびメラトニン作動薬 (ラメルテオン) は、虚血再灌流初期にミトコンドリア内膜電位を脱分極させた。これらの結果は、MT が PostC 機構を介した虚血再灌流障害後の神経保護に重要な役割を果たすことを示唆した。

本研究の結果は昨年 International Journal of Molecular Sciences 誌に報告した (Int J Mol Sci. 2022 Mar 30;23(7):3822)。現在は Ischemic PostC 現象のミトコンドリア膜電位制御にかかわるミトコンドリアカルシウムユニポーター (MCU) の役割について MCU 阻害薬 (Ru265) を用いた研究を進めている。

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 1件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Furuta Takanori, Nakagawa Ichiro, Yokoyama Shohei, Morisaki Yudai, Saito Yasuhiko, Nakase Hiroyuki  | 4. 巻<br>23                |
| 2. 論文標題<br>Melatonin- Induced Postconditioning Suppresses NMDA Receptor through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore via Melatonin Receptor in Mouse Neurons | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>3822 ~ 3822 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms23073822   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Sasaki H, Furuta T, Nakagawa I   |
| 2. 発表標題<br>Melatonin- Induced Postconditioning Suppresses NMDA Receptor through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore via Melatonin Receptor in Mouse Neurons |
| 3. 学会等名<br>Brain PET 2022（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐々木弘光、古田隆徳、中川一郎 他   |
| 2. 発表標題<br>メラトニン受容体を介したChemical Postconditioningはミトコンドリア膜電位制御を介して神経保護効果をもたらす |
| 3. 学会等名<br>Stroke2022  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>古田隆徳、中川一郎、横山昇平 他                                 |
| 2. 発表標題<br>メラトニンによる薬剤性postconditioningにおけるミトコンドリア膜電位制御メカニズム |
| 3. 学会等名<br>第64回日本脳循環代謝学会                                    |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古田隆徳  |
| 2. 発表標題<br>メラトニンによる ischemic postconditioning の検証 -電気生理学的見地から- |
| 3. 学会等名<br>STROKE2020  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古田隆徳  |
| 2. 発表標題<br>メラトニンによる ischemic postconditioning の検証 -電気生理学的見地から- |
| 3. 学会等名<br>第79回日本脳神経外科学会総会                                     |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古田隆徳  |
| 2. 発表標題<br>メラトニンによる ischemic postconditioning の検証 -電気生理学的見地から- |
| 3. 学会等名<br>第63回日本脳循環代謝学会                                       |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古田隆徳                          |
| 2. 発表標題<br>メラトニンによる薬剤性虚血耐性現象における電気生理学的検討 |
| 3. 学会等名<br>STROKE2021                    |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古田隆徳  |
| 2. 発表標題<br>神経細胞における虚血耐性現象の解明&nbsp;- Ischemic postconditioningによるミトコンドリア膜電位制御の機序- |
| 3. 学会等名<br>第62回日本脳循環代謝学会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古田隆徳  |
| 2. 発表標題<br>メラトニンによる ischemic postconditioningの有効性とメカニズムの検証 |
| 3. 学会等名<br>第22回日本分子脳神経外科学会                                 |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐々木弘光  |
| 2. 発表標題<br>メラトニンを介したミトコンドリア膜電位制御による Postconditioningの神経保護効果に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>第81回日本脳神経外科学会総会  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中川一郎                             |
| 2. 発表標題<br>虚血耐性現象におけるミトコンドリア膜電位制御のメカニズム     |
| 3. 学会等名<br>第65回日本脳循環代謝学会 エビデンス創出・基礎研究（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2022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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|