

平成23年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591804

研究課題名(和文) 虚血性神経細胞障害のミトコンドリア治療

研究課題名(英文) Treatment of ischemic neuronal damage by the preservation of mitochondrial membrane potential

研究代表者

森田 潔 (MORITA KIYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40108171

研究成果の概要(和文)：

本研究により以下のことが明らかとなった。

- ①カリウムチャンネルオープナー投与によりミトコンドリア電位はコントロール値の51%に低下する。
- ②ミトコンドリア膜電位形成にK<sup>+</sup>の濃度勾配が関与している。
- ③ミトコンドリア膜電位の変化は解糖系の活性化に影響しない。
- ④ミトコンドリアのカリウム電位は神経細胞のエネルギー代謝に大きな影響を及ぼしていない。

研究成果の概要(英文)：

The present research revealed following phenomenon.

1. Potassium channel opener decreases mitochondrial membrane potential to 51% of control level in rats (in vivo).
2. Concentration gradient of potassium is one of the most important factors that generate mitochondrial membrane potential.
3. Attenuation of mitochondrial potential does not activate glycolysis.
4. Attenuation of potassium gradient in mitochondria does not affect energy production in rat brain (in vivo).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：蘇生学、ミトコンドリア、脳虚血

## 1. 研究開始当初の背景

脳虚血後の神経細胞死はネクローシスとアポトーシスによりもたらされる。ネクローシスは、ミトコンドリア機能の低下に伴うエネルギー障害が本態である。一方アポトーシスはミトコンドリア膜電位の低下に伴うチトクローム c の遊出により引き起こされる。このように、ミトコンドリアの機能異常は虚血性神経細胞障害の拡大に大きく関与している。虚血により過剰なカルシウムがミトコンドリアに流入するとミトコンドリア外膜と内膜に孔（Mitochondrial Permeability Transition）が開き、透過性亢進によりミトコンドリアが膨化する。そのまま機能が停止するとネクローシスになる。機能を維持しつつチトクローム c を放出するとアポトーシスになる。ミトコンドリアへのカルシウムの流入を抑制し、ミトコンドリアの機能障害を軽減することが重要である。

## 2. 研究の目的

虚血後にミトコンドリア電位が過分極することが報告されている (Neurosci Res. 55:234-43. 2006)。右図に示すように、カルシウムの流入はミトコンドリア電位に依存するので、ミトコンドリアの過分極によりカルシウムの流入量が増加すると考えられている。本研究はATP感受性Kチャンネルオープナーを用いてミトコンドリア過分極を抑制し、虚血性神経細胞障害の軽減を図ることを目的としている。

### (2) 平成 20 年度

- ①虚血後にミトコンドリア電位を in vivo で確認する。
- ②ラットにATP感受性カリウムチャンネルオープナーを投与し、投与量とミトコンドリア電位抑制効果の関係を in vivo で観察する。

### (1) 平成 21-22 年度

ミトコンドリア電位をATP感受性カリウムチャンネルオープナーで抑制する。投与時のミトコンドリア電位、ミトコンドリア酸化還元電位、脳組織中のエネルギー代謝を観察する。

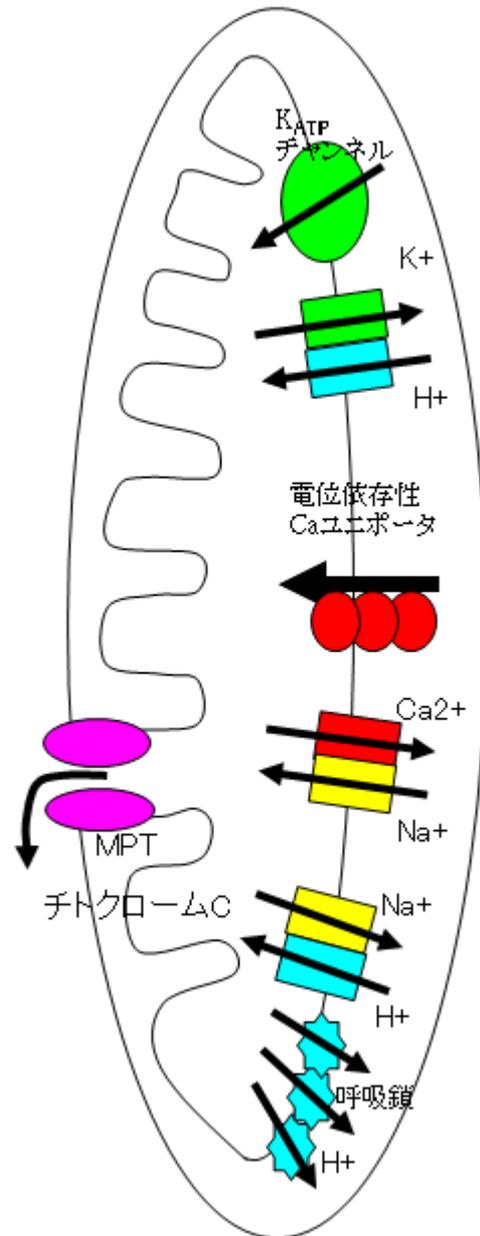


図. ミトコンドリアのイオンチャンネル  
ミトコンドリアのイオンチャンネル。カルシウムは内膜に存在する Uniporter により Up take される。Up take はミトコンドリア膜電位に依存しカルシウムを取り込む。ミトコンドリア内カルシウム濃度が上昇すると膜透過性亢進 (MPT; Mitochondrial Permeability Transition) が形成され、ミトコンドリア機能の低下によるネクローシスや、チトクローム c の流出によるアポトーシスが引き起こされる。ミトコンドリア電位はカリウム濃度勾配により形成され、ATP 感受性カリウムチャンネルよりカリウムが流入すると大きく低下

する。流入したカリウムは水素イオンと交換で排出され、水素イオンは呼吸鎖により供給される

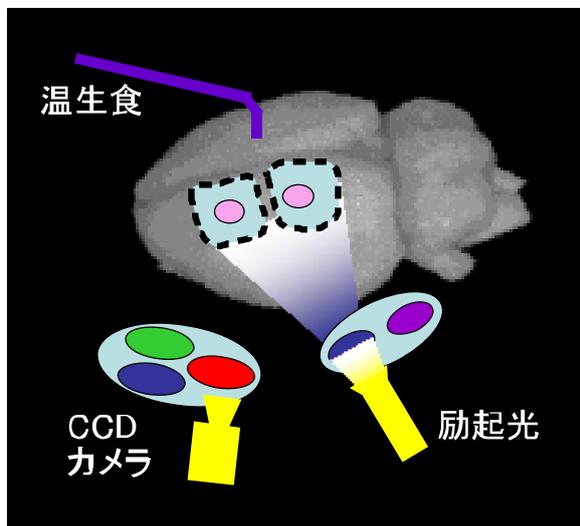
### 3. 研究の方法

#### (1) ミトコンドリア膜電位の測定

脳実質内にミトコンドリア電位感受性色素 (JC-1) を注入し、大脳皮質の神経細胞内に loading する。キセノンランプで 490 nm の青色光を 2 秒間脳表に照射し、ミトコンドリア内に集積した色素を励起させる。脳表の赤色蛍光 (590 nm)、緑色蛍光 (530 nm) を電子冷却 CCD カメラで撮影し、その比率から  $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$  の分解能で 20 秒毎にミトコンドリア電位を算出する。

#### (2) ミトコンドリア酸化還元電位の測定

ミトコンドリア電位測定に引き続き、キセノンランプで 365nm の紫外線を 2 秒間脳表に照射し、大脳皮質ミトコンドリアの NADH (90% 以上の NADH はミトコンドリア内に存在し、電子伝達系の停滞により蓄積する) を励起する。脳表の NADH 蛍光 (460 nm) を電子冷却 CCD カメラ (解像度  $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ ) で撮影し 20 秒毎にミトコンドリア電子伝達系の酸化還元状態を観察する。ミトコンドリア膜電位が低下しても、電子伝達系が停滞せずエネルギーを産生しているかを明らかにする。



人工呼吸下にラットの左頭頂側頭骨に cranial window を開け、脳表を露出する。ATP 感受性カリウムチャンネルオープナー (ダイアゾキサイド) を電極を通して脳内に直接投与する。投与中の細胞膜電位の変化、ミトコンドリア膜電位の変化、ミトコンドリア酸化還元電位の変化、全脳虚血負荷時の膜電位消失時間を観察する。

## 4. 研究成果

### (1) 平成 20 年度

カリウムチャンネルオープナー (ダイアゾキサイド) がミトコンドリア電位に及ぼす影響、ミトコンドリア電子伝達系 (酸化還元電位) に及ぼす影響を明らかにした。カリウムチャンネルオープナー (濃度組成、 $1\text{mmol/l}$  in  $1.5\text{mmol/l}$  NaOH,  $150\text{mmol/l}$  NaCl) を  $0.5\mu\text{l/分}$  の速度で大脳皮質に直接注入し、ミトコンドリア膜電位とミトコンドリア酸化還元電位を測定した。ミトコンドリア膜電位は 490 nm の青色光を 2 秒間脳表に照射し、膜電位標識色素 (JC-1) の蛍光比 (赤色蛍光 590 nm、緑色蛍光 530 nm) より求めた。ミトコンドリア酸化還元電位は 365nm の紫外線を 2 秒間脳表に照射し、ミトコンドリア内 NADH の蛍光強度 (青色蛍光 460nm) より求めた。

カリウムチャンネルオープナー投与によりミトコンドリア電位は直ちに低下し、約 5 分後には定常状態 (コントロール値の 51%) に達した。持続投与を終了すると直ちにコントロール値に回復した。この間、NADH 蛍光強度に変化は認められなかった。カリウムチャンネルオープナー投与によりミトコンドリア電位が低下したことは、ミトコンドリア膜電位形成に  $\text{K}^+$  の濃度勾配が関与していることが示唆された。また、ミトコンドリア膜電位低下が低下しても NADH 蛍光強度に変化を認めなかったことは、ミトコンドリア膜電位の変化は解糖系の活性化に影響しないことを示唆していると考えられた。

### (2) 平成 21 年度

カリウムチャンネルオープナー (ダイアゾキサイド) が細胞膜電位に及ぼす影響、ミトコンドリア電位に及ぼす影響を明らかにした。ミトコンドリア電位を求めるため、Wistar ラットおよび砂ネズミの左頭頂側頭骨に cranial window を開け、脳表を露出し、細胞外ガラス電極より大脳皮質にミトコンドリア電位感受性色素 (JC-1) を 10 分間かけて注入し、色素を神経細胞内に loading した。色素注入による細胞外電位の変化は認められなかった。次に細胞外ガラス電極よりダイアゾキサイドを  $0.5\mu\text{l/分}$  の速度で大脳皮質に直接注入した。キセノンランプで 490 nm の青色光を 2 秒間脳表に照射し、ミトコンドリア内に集積した色素を励起させ、脳表の赤色蛍光 (590 nm)、緑色蛍光 (530 nm) を電子冷却 CCD カメラで撮影し、その比率から 20 秒毎にミトコンドリア電位を測定した。この方法によりミトコンドリア

電位と細胞外電位を同時に測定することが可能になった。ダイアゾキサイドの投与でミトコンドリア電位はコントロール値の51%に低下した。しかし細胞外電位に変化は認められなかった。この状態で椎骨動脈、総頸動脈を結紮し全脳虚血を負荷すると3.1分で細胞膜は脱分極を示した。ダイアゾキサイドを投与しなかった群は2.3分で細胞膜は脱分極を示した。ミトコンドリアのカリウム電位は神経細胞のエネルギー産生に大きな影響を及ぼしていないことを示唆していると考えられた。ミトコンドリアカリウム電位勾配のコントロールはエネルギー代謝に障害を及ぼすことなく治療効果を発揮できる可能性がある。

### (3) 平成22年度

ミトコンドリア電子伝達系阻害薬 (CCCP) が細胞膜電位とミトコンドリア電位に及ぼす影響、ミトコンドリア電子伝達系 (酸化還元電位) に及ぼす影響を明らかにした。ミトコンドリア電位を求めるため、Wistar ラットおよび砂ネズミの左頭頂側頭骨に cranial window を開け、脳表を露出し、細胞外ガラス電極より大脳皮質にミトコンドリア電位感受性色素 (JC-1) を10分間かけて注入し、色素を神経細胞内に loading した。色素注入による細胞外電位の変化は認められなかった。キセノンランプで490nmの青色光を2秒間脳表に照射し、ミトコンドリア内に集積した色素を励起させ、脳表の赤色蛍光(590nm)、緑色蛍光(530nm)を電子冷却CCDカメラで撮影し、その比率から20秒毎にミトコンドリア電位を測定した。この方法によりミトコンドリア電位と細胞外電位を同時に測定することが可能になった。ミトコンドリア電子伝達系阻害薬は微細ガラス電極を用いて大脳皮質に持続注入した。ミトコンドリア電子伝達系阻害薬の持続注入により酸化還元電位は緩やかに還元型に傾いた。ミトコンドリア電位はコントロール値の10%に低下した。細胞膜電位に変化を認めなかった。これら観察結果よりハロタン麻酔下の大脳皮質はミトコンドリアのエネルギー産生の有無によらず細胞膜電位を維持できる可能性が示唆された。

## 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 1件)

①Toshihiro Sasaki, Yoshimasa Takeda, Hideki Taninishi, Minako Arai, Kensuke Shiraishi, Kiyoshi Morita

Dynamic changes in cortical NADH fluorescence in rat focal ischemia: Evaluation of the effects of hypothermia on propagation of peri-infarct depolarization by temporal and spatial analysis  
Neuroscience Letters、査読有、449, 2009, 61-65

[学会発表] (計 2件)

①佐々木俊弘、ラット脳部分虚血における低体温による再発性脱分極の伝播様式に対する影響 (NADH 蛍光画像を用いた検討)、麻酔科学会、2008年6月12日、横浜

②佐々木俊弘、低体温による再発性脱分極の発生・伝播に対する影響の NADH 蛍光画像を用いた検討、神経麻酔集中治療研究会、2008年4月12日、新潟

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 潔 (MORITA KIYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40108171

### (2) 研究分担者

武田 吉正 (TAKEDA YOSHIMASA)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：30294466

### (3) 連携研究者

該当なし