

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791592

研究課題名（和文）一過性脳虚血に対する前庭神経細胞の脆弱性の解明

研究課題名（英文）Study of the sensitivity of vestibular neurons to the temporal ischemic stimulation

研究代表者

高安 幸弘 (TAKAYASU YUKIHIRO)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：70375533

研究成果の概要（和文）：ラット脳幹スライス切片において前庭神経核神経細胞をホールセルパッチクランプし、 $-70$  mV および  $+30$  mV の膜電位固定下に、自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) および自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を記録した。薬理的にそれぞれグルタミン酸作動性、および GABA 作動性入力であることが分かった。次に興奮性入力に focus を当て、無酸素無グルコース細胞外液の還流により虚血刺激を行った。結果、sEPSC の有意な変化は観察できなかった。このことから、脳幹スライスにおける前庭神経核神経細胞の興奮性入力は、虚血性刺激に対して大きな感受性は示さないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We tested spontaneous EPSCs (sEPSCs) and spontaneous IPSCs (sIPSCs) in neurons in the vestibular nucleus in rat acute slices of brainstem using whole-cell patch-clamp recording. sEPSCs and sIPSCs were recorded at  $-70$  mV and  $+30$  mV of voltage-clamped membrane potentials, respectively. Pharmacological experiments have shown that sEPSCs and sIPSCs are mediated by glutamatergic and GABAergic inputs, respectively. Next, we applied Oxygen-Glucose deprived external solution to mimic the ischemic insult. However, we did not detect any clear effects on sEPSCs in the vestibular neurons during ischemic stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経病態生理学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：めまい、虚血性神経障害、パッチクランプ、前庭神経核、脳幹

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性脳障害の約 20%は椎骨脳底動脈領域で発生すると考えられている。臨床的には、高齢者において頻発するめまい発作のうち、中枢性めまい所見を呈するが MRI 画像上脳梗塞像が確認できない症例に対し、しばしば椎骨

脳底動脈循環不全症と診断される。椎骨脳底動脈循環不全症は、一過性脳血流減少による梗塞を伴わない脳神経の代謝障害と定義されている。椎骨脳底動脈循環系は、末梢迷路、第 8 脳神経、脳幹（小脳、後頭葉を含む）などに血流を供給しているため、椎骨脳底動脈

系循環不全では、第8脳神経や末梢器（迷路）に起因するさまざまな機能障害が理論上生じうるが、実際には、中枢性めまいのみが観察される症例が大多数である。これは、椎骨脳底動脈系における虚血性機能障害が前庭神経核で生じ易い事を示唆しており、原因として、前庭神経核領域が脳幹において広範囲であること、および前庭神経核神経細胞が他領域の神経細胞に比べ虚血に対する脆弱性を持つことが考えられている。以上は椎骨脳底動脈循環不全症におけるめまい発作の病態生理として広く受け入れられている一方、前庭神経細胞の虚血に対する脆弱性を示す生理学的根拠は、未だ明確には示されていない。従って、本研究では、一過性虚血を実験的に再現し、それに伴う前庭神経細胞の興奮性変化を電気生理学的に解析することで、前庭神経細胞の虚血に対する脆弱性を直接的に証明し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、前庭神経核神経細胞において、虚血時の膜電位変化に伴う発火特性の変化も検出し、前庭系神経回路における具体的な機能障害を考察する。虚血性神経機能障害の細胞レベルでのメカニズムの解明は、予防を含めた新たなめまい治療法の確立にも有効である。

## 2. 研究の目的

前庭神経核神経細胞において一過性脳虚血により生じる機能障害を電気生理学的手法を用いて検出し、その脆弱性を証明する。具体的には、スライスパッチクランプ法にて前庭神経核神経細胞を膜電位固定また電流固定し、その時に記録される自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) および自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を観察する。次に、低酸素低グルコース (Oxygen-Glucose Deprivation: OGD) 刺激を与え、これにより生じる sEPSC および sIPSC の変化を観察する。障害発生までの時間経過、生理的条件下に戻した後の機能回復までに要する時間等を検討し、他の神経領域においてこれまで示されてきた虚血に対する反応と比較することで、前庭神経核神経細胞における一過性脳虚血に対する脆弱性を示す。同時に、虚血性に誘導された膜電位変化が、前庭神経核神経細胞の発火特性に与える影響を調べ、虚血時の前庭神経核機能障害が前庭系回路に与える影響を考察し、めまい発作の病態生理と結びつける。

## 3. 研究の方法

生後 14~21 日齢ラットを使用し、脳幹スライス切片を作成、スライス上の前庭神経核神経細胞にホールセルパッチクランプし、 $-70$  mV の膜電位固定下に、自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) および自発性抑制性シナプス

後電流 (sIPSC) を記録した。それぞれ、amplitude および frequency を算出し、定量的に解析した。

次に、無酸素無グルコース細胞外液 (Oxygen-Glucose Deprivation: OGD) を記録脳幹スライス周囲に還流させることにより虚血刺激を行った。このときの sEPSC の変化について Amplitude と frequency の平均値について評価を行い、虚血性刺激に対する変化を調べた。

## 4. 研究成果

まず、前庭神経核神経細胞をパッチクランプし  $-70$  mV の膜電位固定下に記録される、自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) および自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を観察した。sEPSC はキヌレイン酸で完全に抑制した (Fig1)。また、sIPSC はピクロトキシンで完全に抑制した (Fig2)。このことから、薬理的にそれぞれグルタミン酸作動性、および GABA 作動性入力であることが分かった。

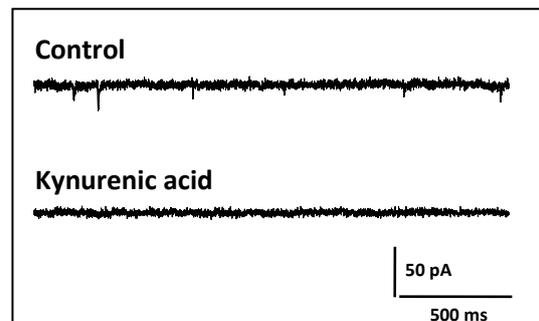


Fig1 sEPSC in Vestibular neuron

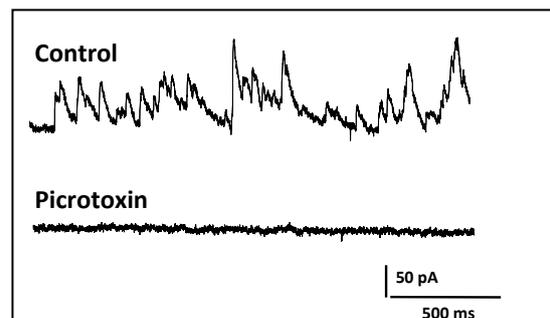


Fig2 sIPSC in Veatibular neuron

sEPSC について個々の inert-event interval,

Amplitude を算出し、定量化した。同様の解析を sIPSC についても行った (Fig3)。Fig3 で示されたような両者を定量化した比較では、sIPSC の方が sEPSC より frequency および Amplitude どちらも大きい値で分布していた。

そこで、今度は Amplitude と frequency の平均値で比較すると、Fig4 の如く違いがさら

に明らかになった。

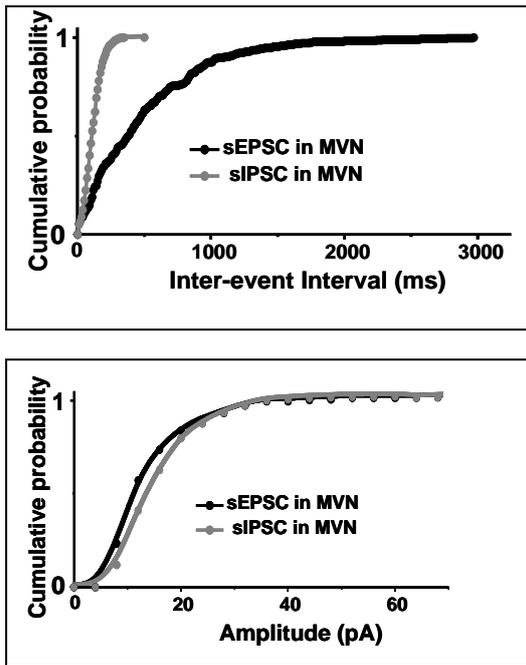


Fig3 Cumulative probability of inter-event interval and Amplitude of sEPSCs and sIPSCs in Vestibular neurons

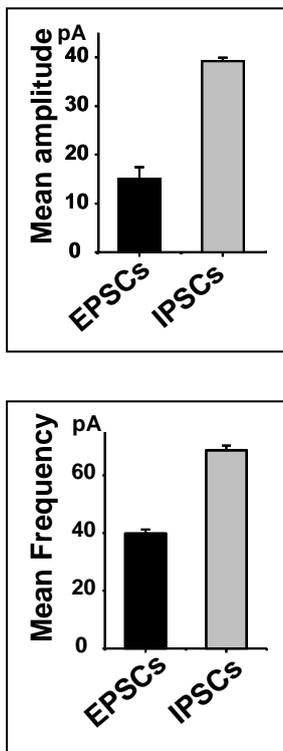


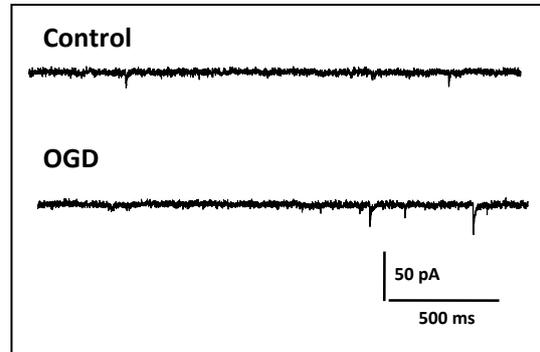
Fig4 平均 Amplitude と平均 frequency の比較

以上の実験結果から、脳幹スライス切片

上では、抑制性局所回路が興奮性回路に比べて有意に温存されていることが示唆された。

次に、ピクロトキシン投与にて興奮性回路に絞り、虚血性変化を sEPSC の変化で観察した。虚血刺激として OGD 細胞外液の還流を行った。

3分から5分の短時間の OGD 刺激では有意な sEPSC の発生頻度や振幅の変化は観察されなかった (Fig5)



このことから、前庭神経核の興奮性局所回路において短時間の虚血性刺激は神経細胞の発火頻度の変化に起因した大きな興奮性変化は来さないと考えられた。

過去の研究では、前庭神経核神経細胞における sEPSC と sIPSC の amplitude と frequency に関して、 $-60$  mV の膜電位固定でそれぞれ、 $13.9 \pm 1.9$  pA,  $1.5 \pm 0.4$  Hz,  $18.1 \pm 2.0$  pA,  $4.3 \pm 0.9$  Hz とした報告がある (Chun SW et al., 2003)。本実験で得られた値は、sEPSC と sIPSC の amplitude と frequency のそれぞれは、 $15.9 \pm 0.6$  pA,  $3.1 \pm 0.4$  Hz,  $39.2 \pm 0.6$  pA,  $15.0 \pm 2.3$  Hz であった。Amplitude、frequency 共に本実験結果の方がやや大きい値を示したが、これはスライス切片を含めたコンディションの違いによる可能性が考えられる。一方、sEPSC に対して sIPSC がかなり high frequency であるという傾向は同様であった。このことは、スライス切片における前庭神経核の神経細胞では、抑制性入力に優位であることを示唆している。実際、これまでの前庭神経核に関する研究でも、対側の前庭神経核から興奮性入力を受ける interneuron が前庭神経核の神経細胞近傍に存在し、その intrinsic な興奮性に関して高度に抑制性制御されているが示されている (Shimazu H, Precht W., 1966)。一方、前庭神経核に直接入力する興奮性線維は、末梢前庭器からの一次入力を含め比較的遠方からの投射が多い (内野 2002)。そのため、本実験のようなスライス切片上では、興奮性入力はその軸索で切断されている、言い換えれば、シナプス前細胞の細胞体は同一スライス上に存在していない可能性が高く、これによって sEPSC があまり観察されないと考察できる。

以上の結果から、前庭神経核を含む脳幹スライス切片では抑制性の局所回路は比較的温存されており、特に対側抑制を中心とした前庭神経核の興奮性制御に関する研究では、脳幹スライス切片は非常に有用なツールとなりえると考えられた。

#### 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 7 件)

① Takayasu Yukihiro, Takeuchi K, Kumari R, Bennett MV, Zukin RS, Francesconi A. Caveolin-1 knockout mice exhibit impaired induction of mGluR-dependent long-term depression at CA3- CA1 synapses. 査読有 *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 21778-21783, 2010

② Sharma A, Hoeffler CA, Takayasu Yukihiro, Miyawaki T, McBride SM, Kaln E, Zukin RS. : Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. 査読有 *Journal of Neuroscience* 30:694-702, 2010

③ Lau CG, Takayasu Yukihiro, Rodenas-Ruano A, Paternain AV, Lerma J, Bennett MV, Zukin RS. : SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. 査読有 *Journal of Neuroscience* 30:242-254, 2010

④ Liu Y, Formisano L, Savtchouk I, Takayasu Yukihiro, Szabó G, Zukin RS, Liu SJ. : A single fear-inducing stimulus induces a transcription-dependent switch in synaptic AMPAR phenotype. 査読有 *Nature Neuroscience* 13:223-231, 2010

⑤ Lau CG, Takeuchi K, Rodenas-Ruano A, Takayasu Yukihiro, Murphy J, Bennett MV, Zukin RS. : Regulation of NMDA receptor Ca(2+) signaling and synaptic plasticity. 査読有 *Biochemical Society Transactions* 37:1369-1374, 2009

⑥ Takayasu Yukihiro, Iino M, Takatsuru Y, Tanaka K, Ozawa S. Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell

synapses. 査読有

*Acta Physiologica* (Oxford, England) 197:1-12, 2009

⑦ Yang Y, Takeuchi K, Rodenas-Ruano A, Takayasu Yukihiro, Bennett MV, Zukin RS. : Developmental switch in requirement for PKA RIIbeta in NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses. 査読有

*Neuropharmacology* 56: 56-65, 2009

[学会発表] (計 5 件)

① Takayasu Yukihiro, Shino M, Furuya N Property of spontaneous EPSCs in Purkinje cells in the vestibule-cerebellum and their high sensitivity to oxygen-glucose deprivation. ARO 34th MidWinter Meeting, February 21, 2011, Baltimore Marriott Waterfront Hotel (Baltimore, USA)

② 高安幸弘、紫野正人、斎藤彩子\*、岡宮智史、高橋克昌、宮下元明、古屋信彦：前庭小脳プルキンエ細胞 sEPSC における特徴と無酸素無グルコース刺激に対する易感受性 第 69 回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会、2010.11.17、国立京都国際会館(京都府)

③ 高安幸弘、高橋克昌、紫野正人、岡宮智史、宮下元明、古屋信彦：温度刺激検査における左右差の検討 第 93 回 日耳鼻群馬県地方部会学術講演会、2009.12.13、群馬ロイヤルホテル(前橋市)

④ 高安幸弘、高橋克昌、紫野正人、岡宮智史、宮下元明、古屋信彦：温度眼振検査における左右差の検討 - その 2 - 第 68 回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会、2009.11.26 ホテルクレメント徳島(徳島県)

⑤ 高安幸弘、古屋信彦、RS Zukin: ラット *in vivo* model における beta-lactam 系抗生物質による虚血性障害に対する神経保護作用 第 92 回 日耳鼻群馬県地方部会学術講演会、2009.07.05、群馬ロイヤルホテル(前橋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高安 幸弘 (TAKAYASU YUKIHIRO)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：70375533