OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大脳皮質体性感覚野錐体細胞の虚血負荷による神経細胞死に対する小胞体内Ca2+放出抑制の効果
Author(s)	河野, 奨
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69499
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（河　野　奨）	
論文題名	大脳皮質体性感覚野錐体細胞の虚血負荷による神経細胞死に対する小胞体内Ca^{2+}放出抑制の効果

論文内容の要旨

【緒言】

脳は多量の血液循環により多くの酸素およびグルコースを消費しているため，体のなかで最も虚血に弱い臓器の一つである．このため，低酸素・低血糖や外傷などによって神経細胞死が生じやすい．脳の中では，大脳皮質，海馬や小脳が，低酸素・低血糖の影響を受けやすいことが知られている．脳血管障害に伴う麻痺や失語など生活に支障をきたす大きな障害を残す厄介な疾患であるため，原因究明は急務である．

脳において，虚血時間が6～8分を過ぎると神経細胞に不可逆的変化が生じ，細胞死が引き起こされる．脳虚血による神経細胞死の機序としては，グルタミン酸大量放出によるNMDA(N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体の活性化に基づく細胞内Ca^{2+}の過剰蓄積が良く知られている．また，細胞外からのCa^{2+}流入のみならず，細胞内Ca^{2+}貯蔵部位である小胞体からのCa^{2+}放出が，虚血に伴う神経細胞の不可逆性の変化発生に重要な役割を担っていることが示唆されている．虚血時においては，リアノジン受容体およびイノシトール三リン酸受容体(IP_3受容体)の活性化を介した小胞体からのCa^{2+}放出が，細胞死に寄与することが報告されている．さらには，リアノジン受容体やIP_3受容体の活性化後に小胞体内のCa^{2+}が枯渇して，ストア作動性Ca^{2+}チャネルが活性化された結果，細胞内Ca^{2+}の過剰蓄積が生じ，細胞死が引き起こされることが報告されている．しかし，脳虚血によって生じる小胞体からのCa^{2+}放出が，神経細胞死に対してどのような役割を果たすかについては不明な点が多い．

本研究では，ホールセルパッチクランプ記録を用い，虚血負荷による神経細胞死に対し，小胞体からのCa^{2+}放出抑制がどのような効果を示すかを検討した．

【実験方法】

生後14～21日齢のC57BL/6Jマウスを用いて，大脳皮質体性感覚野を含む脳スライス標本を作製した．微分干渉正立顕微鏡下で同定した第II/III層錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い，電流固定下で膜電位の経時変化を記録した．人工脳脊髄液の組成は，NaCl(126 mM)，$NaHCO_3$(26 mM)，KCl(1.8 mM)，KH_2PO_4(1.2 mM)，$MgCl_2$(1.0 mM)，$CaCl_2$(2.0 mM)，D-glucose(10 mM)であり，95%酸素および5%二酸化炭素の混合ガスを常時通気した．電極内液の組成は，118 K-gluconate(118 mM)，KCl(18 mM)，NaCl(14 mM)，ATP-Mg(2 mM)，GTP-Na_3(0.3 mM)，HEPES(10 mM)，EGTA(0.1 mM)，バイオサイチン(10 mM)とした．虚血状態を再現するため，無酸素・無グルコース溶液を脳スライス標本に灌流した．無酸素状態は，人工脳脊髄液を95%窒素および5%二酸化炭素の混合ガスで通気することにより誘導し，無グルコース状態は，通常の人工脳脊髄液からD-glucoseを除くことにより誘導した．小胞体からのCa^{2+}放出を減少させるため，電極内液にRyR阻害薬であるruthenium red(100 μM)またはIP_3R阻害薬であるxestospongin C(10 μM)のいずれか一方または両方を充填した(以下，RR群，Xest C群，RR+Xest C群)．また，ストア作動性Ca^{2+}チャネルを介した細胞内Ca^{2+}の過剰蓄積を抑制するため，ストア作動性Ca^{2+}チャネル阻害薬であるSKF96365(10 μM)を，虚血前および虚血中に灌流投与した(以下，SKF群)．電気生理学的記録終了後，スライス標本をZamboni固定液で一晩以上固定し，固定した標本をavidin: biotinylated enzyme complexで，1晩反応させた．コバルト・ニッケル増感法によるDAB反応を行い，蛍光顕微鏡で観察した．

マウス大脳皮質スライス標本に無酸素・無グルコース溶液を灌流すると，虚血初期には緩徐な脱分極が生じ，5～12分後から急峻な脱分極が発生して，細胞膜に不可逆的変化が生じていた．本研究では，5つの条件下(Cont群，RR群，Xest C群，RR+Xest C群，SKF群)で膜電位の経時変化を記録した後，急峻脱分極電位の最大勾配，発生潜時，最大勾配時点の膜電位，振幅，最大膜電位について計測し，比較検討し

た．

【結果】

1．虚血負荷による錐体細胞の細胞構築変化

バイオサイチン染色を用いて，錐体細胞の細胞構築が，虚血負荷によって，どのように変化するかを観察した．虚血負荷後で，急峻脱分極電位発生以前の錐体細胞の形態を観察したところ，細胞体や樹状突起に形態変化が認められなかった．しかし，急峻脱分極電位発生直後では細胞体が膨化し，細胞体や樹状突起の染色性が顕著に低下した．

2．虚血負荷に対するRR，Xest C，SKFの効果

急峻脱分極電位の発生潜時は，Cont群，RR群，Xest C群，RR+Xest C群，SKF群の順に，8.3 ± 2.3分，15.7 ± 4.7分，17.1 ± 8.8分，23.3 ± 8.5分，21.8 ± 8.8分であり，RR群，Xest C群，RR+Xest C群，SKF群では，Cont群と比較して，有意に延長した．急峻脱分極電位の最大勾配時点の膜電位は，上記と同様の順に，-49.7 ± 6.8 mV，-47.6 ± 10.0 mV，-49.8 ± 10.6 mV，-44.9 ± 9.7 mV，-53.1 ± 11.6 mVであり，5群の間に有意差は認められなかった．急峻脱分極電位の最大勾配は，上記と同様の順に，8.7 ± 2.7 mV/秒，5.5 ± 1.5 mV/秒，5.0 ± 2.7 mV/秒，1.9 ± 1.2 mV/秒，4.3 ± 1.7 mV/秒であり，RR群，Xest C群，RR+Xest C群，SKF群では，Cont群と比較して，有意に減少した．また，RR+Xest C群では，RR群およびXest C群と比較して，有意に減少した．最大膜電位は，順に，-15.4 ± 9.1 mV，-18.5 ± 6.0 mV，-22.7 ± 13.5 mV，-16.5 ± 5.8 mV，-29.8 ± 8.8 mVであり，SKF群では，Cont群と比較して，有意に深い膜電位を示した．また，SKF群では，RR群およびRR+Xest C群と比較して，有意に深い膜電位を示した．急峻脱分極電位の振幅は，順に，62.8 ± 12.7 mV，65.0 ± 3.9 mV，61.3 ± 15.3 mV，61.6 ± 5.8 mV，55.5 ± 7.1 mVであり，5群の間に有意差は認められなかった．

【考察および結論】

脳梗塞発生時，虚血状態になってから数分で，細胞膜上のNa^+-K^+ポンプが破綻し，細胞膜を介して大量のイオンの流入と流出が起きることが知られており，この現象は，虚血性脱分極と呼ばれている．この状態では，神経細胞の再分極に，多大なエネルギーが消費されるため，神経細胞が危機的な状況に陥り，長く続くと不可逆的壊死(梗塞)が生じる．本研究の結果において，リアノジン受容体やIP_3受容体を介した小胞体からのCa^{2+}放出およびストア作動性Ca^{2+}チャネルからのCa^{2+}の流入を抑制することにより，急峻な脱分極電位発生までの潜時が延長したことから，虚血による細胞内Ca^{2+}濃度の上昇を抑制することで，Na^+-K^+ポンプの機能不全が抑制された可能性が示唆される．

本研究の結果において，小胞体からのCa^{2+}放出およびストア作動性Ca^{2+}チャネルからのCa^{2+}流入の抑制により，急峻脱分極発生時における最大勾配が減少することを見出した．つまり，小胞体からのCa^{2+}放出およびストア作動性Ca^{2+}チャネルからのCa^{2+}流入の抑制が，神経細胞死の遅延に寄与することが明らかになった．急峻脱分極電位の最大勾配は，急速な膜電位変化をもたらすイオンチャネル(電位依存性Na^+チャネルや電位依存性Ca^{2+}チャネル等)の開口確率が関与し，急峻脱分極発生時，非選択的イオン(Na^+, Ca^{2+}, Cl^-等)の透過性上昇が生じることが報告されている．イオンチャネルの開口確率の増大においては，Ca^{2+}依存性酵素(カルモジュリン依存性キナーゼ等)の活性化が重要な役割を果たすことが示されている．小胞体からのCa^{2+}放出およびストア作動性Ca^{2+}チャネルからのCa^{2+}流入の抑制により，Ca^{2+}依存性酵素の働きが抑制され，その結果，急峻脱分極発生時の非選択的イオン(Na^+，Ca^{2+}，Cl^-等)の透過性上昇をもたらすイオンチャネルの開口確率の増大が抑制されたと考えることができる．

以上のことから，リアノジン受容体やIP_3受容体の活性化を介した小胞体からのCa^{2+}放出やその後に続くストア作動性Ca^{2+}チャネルの活性化を介した細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が，急峻脱分極電位の発生潜時や最大勾配に影響を与え，神経細胞死に深く関与することが明らかになった．したがって，虚血負荷による神経細胞死に対し，小胞体からのCa^{2+}放出を抑制することにより，神経保護作用が生じる可能性が示唆された．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（河　野　奨）		
	（職）	氏　　名
論文審査担当者	主査　教授　加藤隆史 副査　教授　脇坂聡 副査　准教授　野村良太 副査　講師　村上智彦	

論文審査の結果の要旨

本研究では，虚血負荷後に生じる大脳皮質体性感覚野錐体細胞の神経細胞死に対して，小胞体からの Ca^{2+}放出抑制の効果を検討した．その結果，小胞体からの Ca^{2+}放出を抑制すると，虚血負荷後の神経細胞死に至る過程を遅延させることが明らかになった．

本研究の結果は，虚血負荷後に生じる大脳皮質錐体細胞の神経細胞死のメカニズムに関する重要な知見と考えられる．よって，本論文は，博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める．