

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 大橋 正幸
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 696 号
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Hydrogen peroxide modulates synaptic transmission in ventral horn neurons of the rat spinal cord.
(ラット脊髄前角ニューロンのシナプス伝達に対する過酸化水素の作用機序)

論文審査委員 主査 教授 日比野 浩
副査 教授 遠藤 直人
副査 教授 馬場 洋

博士論文の要旨

【背景と目的】

活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) は中枢神経系の外傷、虚血-再灌流障害の病態に関与している分子種である。その細胞障害機序の一つとして、神経シナプスにおいて興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の過剰放出を生じ、シナプス後細胞のグルタミン酸受容体の活性化と、それに引き続く細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が細胞死を引き起こす、「グルタミン酸毒性」が報告されている。脊髄前角細胞は酸化ストレスや虚血に対して脆弱であるが、ROS によるグルタミン酸放出増加の機序は不明である。本研究の目的は、ROS の一つである過酸化水素 (H_2O_2) が脊髄前角細胞のシナプス伝達に与える影響とその機序をホールセル・パッチクランプ法により解明することである。

【方法】

幼若 Wistar 系ラット (7~15 日齢) にウレタン麻酔を行い、椎弓切除ののち腰仙部脊髄を切り出し、マイクロスライサーを用いて厚さ約 500 μm の脊髄横断スライス標本を作製した。脊髄横断スライスを記録用チャンバーに移し、95%酸素、5%二酸化炭素の混合ガスで飽和し、36 $^{\circ}$ C に加温した人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) で灌流した。ホールセル・パッチクランプ記録は、赤外線システムを備えた顕微鏡を用い、テレビモニター下に脊髄前角細胞 (第 IX 層) から行った。記録は電位固定法で、電位依存性 Na^{+} チャンネル阻害薬 (テトロドトキシン) 投与下に行った。保持膜電位を -70 mV とすることで微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic current, mEPSC) を、保持膜電位を 0 mV とすることで微小抑制性シナプス後電流 (miniature inhibitory postsynaptic current, mIPSC) を記録した。

【結果と考察】

H_2O_2 (1 mM) を灌流投与すると、mEPSC の振幅は不変であったが、頻度は二相性の変化を示した。mEPSC の頻度は H_2O_2 投与開始 2-5.5 分でコントロールの 163% に増加したが、その後は減少に転じ、 H_2O_2 投与終了後 10 分でコントロールの 52% に減少した。この結果は、 H_2O_2 が興奮性シナプス前終末に直接作用し、グ

ルタミン酸の放出に影響を与えていることを示している。シナプス前終末からの神経伝達物質放出確率は細胞内 Ca²⁺濃度に依存することが報告されており、H2O2 の作用機序に細胞内 Ca²⁺濃度の変化が関与しているかを検討した。Ca²⁺を除去した ACSF を用いると、H2O2 による mEPSC の頻度増加が抑制されたことから、シナプス前終末への Ca²⁺流入増加が関与していることが判明した。電位依存性 Ca²⁺チャンネル (Voltage-gated calcium channel, VGCC) の各サブタイプの阻害薬を投与したところ、N 型 VGCC 阻害薬により H2O2 による mEPSC の頻度増加は完全に抑制された。次に細胞内 Ca²⁺貯蔵庫である小胞体からの Ca²⁺放出増加が関与しているかを検討するため、小胞体に存在するリアノジン受容体 (RyR) またはイノシトール 3 リン酸受容体 (IP3R) に対する阻害薬をそれぞれ投与した。その結果、RyR 阻害薬では mEPSC の頻度増加が、IP3R 阻害薬で mEPSC の頻度増加と減少の両者が抑制された。以上から、H2O2 は興奮性シナプス前終末に直接作用し、N 型 VGCC の活性化を介したシナプス前終末への Ca²⁺流入、および RyR、IP3R の活性化を介した小胞体からの Ca²⁺放出によりグルタミン酸の放出を増強することが示された。次に、H2O2 投与による mEPSC 頻度減少の機序を検討したところ、GABAA 受容体阻害薬により抑制された。この結果は H2O2 投与により抑制性神経伝達物質である GABA が過剰に放出され、興奮性シナプス前終末の GABAA 受容体の活性化によりグルタミン酸放出が減少している可能性を示唆している。

保持膜電位を 0 mV とし、グリシン受容体阻害薬を投与することで GABA 性 mIPSC を記録した。H2O2 を投与すると、GABA 性 mIPSC の振幅は不変であったが、頻度はコントロールの 648% へ有意に増加し、投与終了後 10 分の時点でも頻度増加は持続していた (223%)。この変化は IP3R 阻害薬を投与することで抑制された。以上より、H2O2 は抑制性シナプス前終末にも直接作用し、小胞体の IP3R の活性化を介して GABA 放出を増加させることが示された。この結果は IP3R 阻害薬で H2O2 による mEPSC の頻度増加および減少が抑制されたことに矛盾しない。

過剰に放出された GABA は興奮性シナプス前終末に作用してグルタミン酸の放出を抑制していたことから、「グルタミン酸毒性」に対する生体の防御機構と考えられる。従って、N 型 VGCC 阻害薬や RyR 阻害薬を用いることで、GABA による神経保護作用を損なうことなく、H2O2 によるグルタミン酸の過剰放出を選択的に抑制することが可能となり、効率的な神経保護効果を期待できる。

審査結果の要旨

活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) は中枢神経系の外傷、虚血-再灌流障害の病態に関与している。その細胞障害機序の一つとして、神経シナプスにおいて興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の過剰放出を生じ、シナプス後細胞のグルタミン酸受容体の活性化と、それに引き続く細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が細胞死を引き起こす、「グルタミン酸毒性」が報告されている。本研究では、ROS の一つである過酸化水素 (H2O2) が脊髄前角細胞のシナプス伝達に与える影響やグルタミン酸放出増加の機序をホールセル・パッチクランプ法により解析した。その結果、H2O2 は興奮性シナプス前終末に直接作用し、N 型 VGCC、RyR、および IP3R の活性化を介して細胞内 Ca²⁺を増加させることにより、グルタミン酸の放出を増強することが示された。また、H2O2 投与により抑制性神経伝達物質である GABA が過剰に放出され、興奮性シナプス前終末の GABAA 受容体の活性化によりグルタミン酸放出が減少していることが示唆された。これは、グルタミン毒性に対する生体の防御機構と考えられる。

本研究は、臨床の現場で大きな問題となっている脊髄損傷の際の二次障害の発症と防御のメカニズムの一端を解明したため、効果的な治療法の開発につながると期待される。この点に学位論文としての価値があると判定した。