

論文名 : Hydrogen peroxide modulates synaptic transmission in ventral horn neurons of the rat spinal cord (要約)

新潟大学大学院医歯学総合研究科 (論文博士は氏名のみでも可)

氏名 大橋 正幸

---

(以下要約を記入する)

### 【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  $\text{Ca}^{2+}$ 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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )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  $\mu\text{m}$  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°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  $\text{Na}^+$ 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  $-70 \text{ mV}$  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  $0 \text{ mV}$  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】

$\text{H}_2\text{O}_2$  (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。すなわち、mEPSC の頻度はコントロールの 163%に増加したが、その後は減少に転じ、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 投与終了後 10 分で 52%となった。この結果は、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 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確率は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存することが報告されており、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の作用機序に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化が関与しているかを検討した。 $\text{Ca}^{2+}$ を除去した ACSF を用いると、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 流入増加が関与していることが判明した。電位依存性

Ca<sup>2+</sup>チャネル (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による mEPSC の頻度増加は完全に抑制された。次に細胞内 Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫である小胞体からの Ca<sup>2+</sup>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 (IP<sub>3</sub>R)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、IP<sub>3</sub>R 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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 Ca<sup>2+</sup>流入、および RyR、IP<sub>3</sub>R の活性化を介した小胞体からの Ca<sup>2+</sup>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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投与による mEPSC 頻度減少の機序を検討したところ、GABA<sub>A</sub>受容体阻害薬により抑制された。この結果は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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 GABA<sub>A</sub>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。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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 IP<sub>3</sub>R 阻害薬を投与することで抑制された。以上より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は抑制性シナプス前終末にも直接作用し、小胞体の IP<sub>3</sub>R 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 IP<sub>3</sub>R 阻害薬で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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。