

脊髄前角におけるカルシウムチャンネルを介した キノホルムの興奮性シナプス伝達メカニズム

谷口 亘 (和歌山県立医科大学 整形外科学講座)

泉 尚史 (関西医療大学 保健医療学部神経病研究センター)

西尾 尚子 (和歌山県立医科大学 整形外科学講座)

山田 宏 (和歌山県立医科大学 整形外科学講座)

吉田 宗平 (関西医療大学 保健医療学部神経病研究センター)

研究要旨

SMONの原因物質はキノホルム (Clioquinol) であるが、その神経毒性発症メカニズムには様々な説が報告されているものの、未だ一定の見解を得られていない。これまで我々は Clioquinol の脊髄前角における興奮性シナプス伝達に対する作用を明らかにする為、脊髄前角細胞に Clioquinol を灌流投与し、whole-cell patch-clamp 法を用いて電気生理学的解析を行った。その結果 Clioquinol が脊髄前角細胞に投射するシナプス前終末部に作用して、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を増強すること、すなわち Clioquinol には興奮性シナプス伝達増強作用があることが明らかとなった。今回、我々は Clioquinol による興奮性シナプス伝達増強作用のメカニズムを検討した。Clioquinol の単独灌流投与は sEPSC の振幅の程度を変化させず、発生頻度を有意に増加させるが、カルシウムイオンを含まない人工脳脊髄液中における Clioquinol の灌流投与は sEPSC の振幅の程度ならびに発生頻度に影響を及ぼさなかった。また電位依存性 N 型カルシウムチャンネルのブロッカーである ω -Conotoxin 存在下においても Clioquinol は sEPSC の振幅の程度ならびに発生頻度に影響を及ぼさなかった。以上のことから Clioquinol は脊髄前角細胞に入力するシナプス前終末部の膜上に存在する電位依存性 N 型カルシウムチャンネルに作用し、カルシウムイオンを流入させることによってグルタミン酸の放出を増強させることが示唆された。

A. 研究目的

亜急性脊髄視神経症 (Subacute-Myelo-Optico-Neuropathy : SMON) について、整腸剤キノホルム (Clioquinol : 5-Chloro-7-iodo-8-quinolinol) による発症機序には過去にいくつか報告されている。ビタミン B₁₂ 不足、キレート作用による障害、ミトコンドリア障害に伴う酸化ストレス、神経成長因子受容体の自己リン酸化反応の抑制¹⁾ などさまざまな報告があるが、未だ一定の見解を得られていない。これまで我々は Clioquinol が脊髄前角細胞に投射するシナプス前終末部に作用して、興奮性神経伝達物質であるグルタミン

酸の放出を増強すること、すなわち Clioquinol には興奮性シナプス伝達増強作用があることを明らかにしてきた²⁾。今回この脊髄前角細胞における Clioquinol の興奮性シナプス伝達増強作用のメカニズムを明らかにする目的で脊髄横断スライスに whole-cell patch-clamp 法を適用し、電気生理学的検討を行った。

B. 研究方法

1. 脊髄スライス標本の作製

幼若 Sprague-Dawley 系雄性ラット (9~11 日齢) にウレタンを腹腔内投与し麻酔後、腰仙部の椎弓切除

を行い、1.0~1.5 cm の長さで脊髄を摘出し、酸素付加した 2~4 の人工脳脊髄液に浸した。脊髄から実体顕微鏡視下に硬膜、前根、後根、くも膜、軟膜を除去した後、脊髄を寒天ブロックに作った溝に設置し、マイクロスライサーを用いて、約 500 μ m の厚さの脊髄横断スライス標本を作製した。切片化した脊髄スライスを記録用のチャンバーに移し、固定グリッドで固定後、酸素付加した人工脳脊髄液で 5~10 ml/分の速度で灌流した。

2. 脊髄前角細胞からのパッチクランプ記録

赤外線システム含有の顕微鏡を用いて、脊髄前角の層の細胞をモニターで観察しながら、微小ガラス電極を刺入、whole-cell patch-clamp 法を適用し、単一細胞からデータ記録を行った。記録用電極には電極内液を充填した先端抵抗 5~12 M の微小ガラス電極を用いた。得られた記録電流はパッチクランプ用アンプ、A/D 変換器、データ記録・解析用ソフトを用いて、記録・解析した。膜電位は -70 mV に電圧固定した。実験結果は平均 \pm 標準誤差で表し、検定は paired student's t-test を用いた。危険率 5% ($P < 0.05$) をもって有意と判定した。

(倫理面への配慮)

本実験計画は和歌山県立医科大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

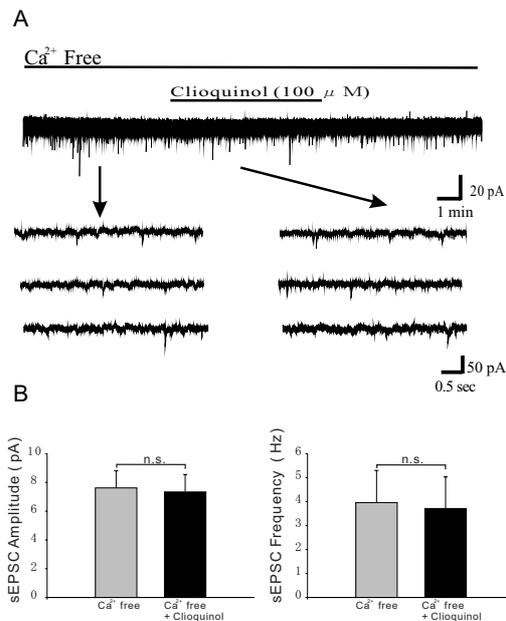


Fig. 1

C. 研究結果

膜電位固定下 (-70 mV) では、記録した全ての細胞において自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic current : sEPSC) が観察された。この sEPSC はグルタミン酸受容体拮抗薬である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) 存在下で完全に消失されることから、神経終末内のシナプス小胞から放出された興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を介した反応であることが示された。

1. 細胞外 Ca^{2+} が Clioquinol によるグルタミン酸放出増強作用に与える影響

Ca^{2+} を含まない人工脳脊髄液を灌流した後、Clioquinol (100 μ M) を 5 分間灌流投与しその影響を調べたところ、sEPSC の振幅の程度ならびに発生頻度に影響を与えなかった。($n = 9$) (Fig. 1A)。Clioquinol 投与開始前の 30 秒間における sEPSC の平均振幅は 7.6 ± 1.2 pA で、Clioquinol 投与後の 30 秒間における sEPSC の平均振幅は 7.3 ± 1.2 pA であった。この両群間において paired t test を行ったところ、両群間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$) (Fig. 1B)。また Clioquinol 投与開始前の 30 秒間における sEPSC の発生頻度の平均は 4.0 ± 1.3 Hz で、Clioquinol 投与後の 30 秒間における sEPSC の発生頻度の平均は、 3.7 ± 1.3 Hz であった。この両群間において paired t test

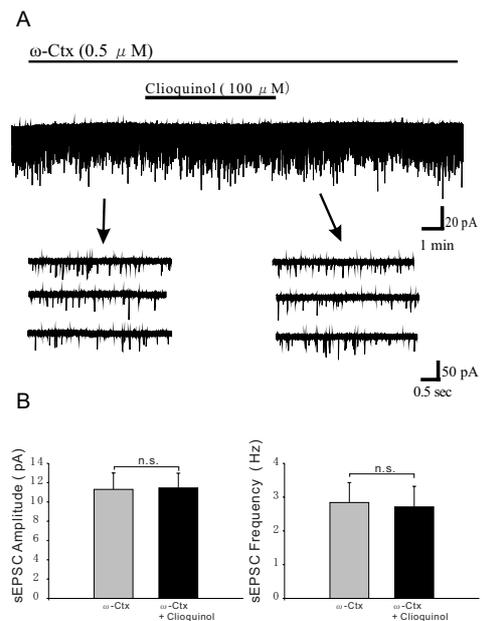


Fig. 2

を行ったところ、両群間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$) (Fig. 1B)。

2. ω -Conotoxin が Clioquinol によるグルタミン酸放出増強作用に与える影響

電位依存性 N 型カルシウムチャネルのブロッカーである ω -Conotoxin 存在下 ($0.5 \mu\text{M}$) に Clioquinol ($100 \mu\text{M}$) を 5 分間灌流投与しその影響を調べたところ、sEPSC の振幅の程度ならびに発生頻度に影響を与えなかった。 ($n = 13$) (Fig. 2A)。Clioquinol 投与開始前 30 秒間における sEPSC の平均振幅は $11.3 \pm 1.7 \text{ pA}$ で、Clioquinol 投与後の 30 秒間における sEPSC の平均振幅は $11.5 \pm 1.5 \text{ pA}$ であった。この両群間において paired t test を行ったところ、両群間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$) (Fig. 2B)。また Clioquinol 投与開始前 30 秒間における sEPSC の発生頻度の平均は $2.8 \pm 0.6 \text{ Hz}$ で、Clioquinol 投与後の 30 秒間における sEPSC の発生頻度の平均は、 $2.7 \pm 0.6 \text{ Hz}$ であった。この両群間において paired t test を行ったところ、両群間に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$) (Fig. 2B)。

D. 考察

本研究は、脊髄前角細胞にパッチクランプ法を適用し、単一細胞レベルでの Clioquinol による興奮性シナプス伝達増強作用のメカニズムについて解析した。我々は以前 Clioquinol が脊髄前角細胞に投射するシナプス前終末部に作用して、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を増強することを報告した²⁾。Clioquinol による神経毒性の発現機序には、様々な説があるが、その 1 つに Clioquinol が細胞死を誘導させる過程においてカスパーゼ 3 を活性化し、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の産生を増強させるとの報告がある³⁾。ROS は細胞障害だけでなく、シグナル伝達にも関与しており、その受容体の一つに低温度感受受容体の TRPA1 が関与していることが過去に報告されている^{4,5)}。我々は以前、脊髄後角において神経終末部に存在する TRPA1 を ROS が活性化させることで、グルタミン酸の放出を増強する事を示した⁶⁾。また Clioquinol が TRPA1 を活性化させるという報告⁷⁾もある。これらのことより Clioquinol による

グルタミン酸の放出増強作用に TRPA1 チャネルの関与を疑い、検討を行ったが関与を示唆する結果は得られなかった。2016 年に ROS の 1 種である過酸化水素が脊髄前角において N 型電位依存性カルシウムチャネルを活性化させ、グルタミン酸の放出を増強させるとの報告⁷⁾がなされた。電位依存性カルシウムチャネルは、細胞外に高濃度に存在する Ca^{2+} を細胞内へ選択的に透過させるイオンチャネルであり様々な生理機能調節に役立っている。電位依存性カルシウムチャネルには L 型、P/Q 型、N 型、R 型、T 型と様々なサブタイプが存在する。N 型電位依存性カルシウムチャネルは L 型、P/Q 型、R 型と共に脊髄前角細胞に発現が認められている⁸⁾。そこで本研究では N 型カルシウムチャネルのブロッカーである ω -Conotoxin 存在下において Clioquinol の灌流投与を行った。その結果、Clioquinol は sEPSC の振幅の程度ならびに発生頻度に影響を与えなかった。また Ca^{2+} を含まない人工脳脊髄液を灌流後に Clioquinol を灌流投与したところ、sEPSC の振幅の程度ならびに発生頻度に影響を及ぼさなかった。シナプス前 Ca^{2+} 濃度は mEPSC の発生頻度と相関すると考えられている⁹⁾。以上のことより、Clioquinol は ROS の産生増加によって脊髄前角細胞に入力するシナプス前終末部の膜上に存在する電位依存性 N 型カルシウムチャネルに作用し、カルシウムイオンを流入させることにより、グルタミン酸の放出を増強していると考えられた。SMON の主症状である痙性麻痺の発症機序として脊髄前角運動ニューロンに投射する神経終末部からのグルタミン酸放出が Clioquinol により促進された結果、脊髄前角細胞の興奮増強が持続している点に関与している可能性が考えられた。またグルタミン酸毒性による細胞死が起こる可能性もあり、脱力に関与している可能性も考えられた。今後は Clioquinol の脊髄前角細胞に対する興奮性シナプス伝達増強メカニズムに対して L 型、P/Q 型、R 型の電位依存性カルシウムチャネルとの関与など、さらなる検討を行っていく予定である。

E. 結論

脊髄前角細胞に whole-cell patch-clamp 法を適用し、脊髄前角細胞における Clioquinol の興奮性シナプス伝

達増強メカニズムを解析した。Clioquinol は脊髄前角細胞に入力するシナプス前終末部の膜上に存在する電位依存性 N 型カルシウムチャンネルに作用することで、カルシウムイオンが流入し、その結果グルタミン酸の放出を増強していると考えられた。このメカニズムが Clioquinol の脊髄前角細胞に対する興奮性シナプス伝達増強メカニズムの 1 つであると考えられた。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) Asakura K, Ueda A, Kawamura N, Ueda M, Mihara T, Mutoh T. Clioquinol inhibits NGF-induced Trk autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res* 2009; 1301: 110-5.
- 2) Izumi N, Taniguchi W, Yamanaka M, Sonekatsu M, Nishio N, Nakatsuka T, Yoshida S, Yoshida M. An enhancement of excitatory synaptic transmission by Clioquinol in spinal ventral horn neurons. *The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord* 2015; 36: 40-6.
- 3) Kawamura K, Kuroda Y, Sogo M, Fujimoto M, Inui T, Mitsui T. Superoxide dismutase as a target of clioquinol-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452: 181-5.
- 4) Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest* 2008; 118: 1899-910.
- 5) Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 2008; 28: 2485-94.
- 6) Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, Takiguchi N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Yamada H, Miyazaki N, Yoshida M, Nakatsuka T. Reactive oxygen

- species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. *Neuroscience* 2013; 247: 201-12.
- 7) Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 8374-9.
- 8) Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA. Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 1998; 18: 6319-30.
- 9) Augustine GJ, Santamaria F, Tanaka K. Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 2003; 40: 331-46.