

キノホルムによる脊髄後角の興奮性シナプス伝達増強作用について

山中 学 (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)
谷口 亘 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
西尾 尚子 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
曾根勝真弓 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
太地 良 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
筒井 俊二 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
中塚 映政 (関西医療大学保健医療学部疼痛医学分野)
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

昨年度、我々は Clioquinol が脊髄後角細胞における興奮性シナプス伝達に対し、どのような作用を与えるか whole-cell patch-clamp 法を用いて電気生理学的に解析を行った。その結果、Clioquinol は脊髄後角細胞に投射している末梢神経線維中枢端の終末部に作用し、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸放出を促進すること、すなわち Clioquinol には興奮性シナプス伝達の増強作用を有することが判明した。そこで今年度は、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 の単独灌流投与は自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) の発生頻度を有意に増加させ、振幅の程度に影響を及ぼさないが、TRPA1 受容体の選択的拮抗薬である HC-030031 存在下において Clioquinol は sEPSC の発生頻度に影響を与えなかった。このことから Clioquinol による脊髄後角細胞に対するシナプス伝達増強作用は TRPA1 受容体を介した作用であ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) の原因物質はキノホルム (Clioquinol) と判明している。しかしながら、下肢痛などの知覚異常をはじめとする SMON の症状に関する発生機序は未だ不明な点が多い。本研究は Clioquinol による脊髄後角細胞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ことを目的に、ラット脊髄横断スライスに whole-cell patch-clamp 法を用いて、電気生理学的検討を行った。

B. 研究方法

1. 脊髄横断スライス標本の作製

幼若 Sprague-Dawley ラット (9日~11日齢) にウレタンを腹腔内投与し、腰仙部の椎弓切除を行い、1.0~1.5cm 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 (NaCl 117mM : KCl 3.6mM : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2mM : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5mM : $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.2mM : NaHCO_3 25mM : Glucose 11mM) に浸した。実態顕微鏡視下に脊髄から硬膜、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 (D.S.K社 DTK 1000) 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。切片化した脊髄スライスを記録用のチャンパーに移し、グリッドで固定後、酸素付加した人工脳脊髄液で5~10ml/分の速度で灌流した。

2. 脊髄後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、脊髄後角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 (K gluconate 135 mM : KCl 2 mM : CaCl₂ · 2H₂O 0.5 mM : MgCl₂ · 6H₂O 2 mM : EGTA 5 mM : Mg ATP 5 mM : HEPES 5 mM) 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 (Molecular Devices社 AXOPATCH 200B)、A/D変換器 (Molecular Devices社 DIGIDATA 1322A)、データ記録・解析用ソフト (Axon Instruments社 pClamp 9.2・Synaptosoft社 Mini Analysis Program 6.1) を用いて、コンピュータにより記録・解析した。膜電位は-70 mVに電圧固定した。実験結果は平均±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。また、括弧内のnの値は記録した細胞の数を示している。使用した薬剤については、5-Chloro-7-iodo-8-quinolinol (Clioquinol), HC-030031はSigma-Aldrichから購入したものである。(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。

C. 研究結果

膜電位固定下 (-70 mV) において、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したことから、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。

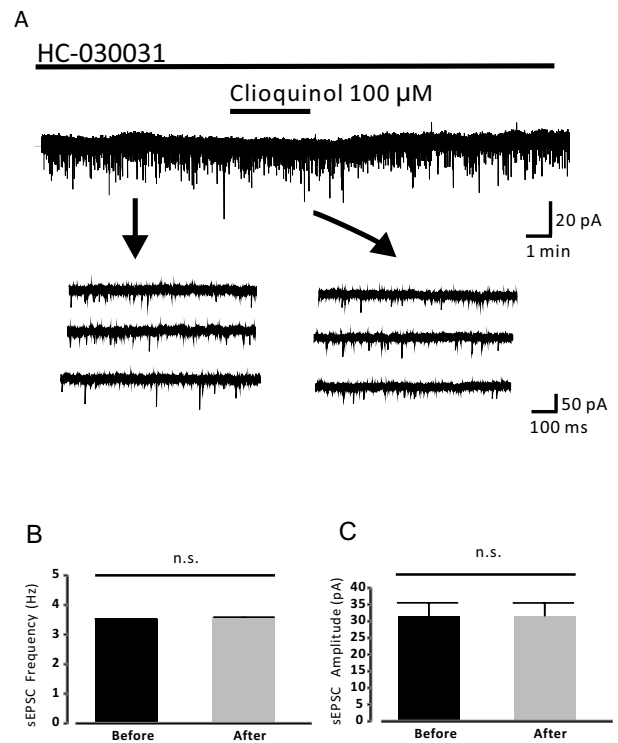


Fig. 1

HC-030031がClioquinolによるグルタミン酸放出増強作用に与える影響

TRPA1受容体の選択的拮抗薬であるHC-030031存在下 (50 μM) においてClioquinol (100 μM) を5分間灌流投与し、その影響を検討したところ、Clioquinol投与前後においてsEPSCの発生頻度及び振幅の程度に変化はみられなかった (Fig. 1 A)。Clioquinol投与開始前の30秒間におけるsEPSCの発生頻度の平均は3.5±0.9 Hzであり、Clioquinol投与後の30秒間におけるsEPSCの発生頻度の平均は3.6±0.8 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見られなかった (P>0.05, n=10) (Fig. 1 B)。

また、Clioquinol投与開始前の30秒間におけるsEPSCの平均振幅は31.6±3.5 pAで、Clioquinol投与後の30秒間におけるsEPSCの平均振幅は31.6±3.9 pAであった。振幅においても、両群間に有意な差は見られなかった (P>0.05) (Fig. 1 C)。

D. 考察

我々は以前、脊髄前角においてClioquinolが興奮性

シナプス伝達増強作用を有することを報告し¹⁾、そのメカニズムは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を介した作用であることも報告した。また、脊髄前角と同様に脊髄後角においても Clioquinol は興奮性シナプス伝達増強作用を有することを報告した²⁾。本研究は脊髄後角細胞に whole-cell patch-clamp 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検討を行なった。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 がミトコンドリアの SOD1 活性を阻害し、活性酸素種 (ROS) を増加させることによって細胞の障害が起こるという報告³⁾がある。活性酸素種は細胞障害だけでなく、シグナル伝達機能も有しておりその受容体の 1 つとして TRPA1 が知られている。我々は過去に脊髄後角において ROS が末梢神経線維中枢端の終末部に存在する TRPA1 を活性化することにより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示した⁴⁾。また Clioquinol が TRPA1 を活性化させるという報告もある⁵⁾。これらのことより、今回の実験では Clioquinol と TRPA1 の関連をまず検討した。その結果、TRPA1 の選択的拮抗薬である HC-030031 存在下における Clioquinol 投与は、sEPSC の発生頻度及び振幅の程度、どちらにも影響を及ぼさなかった。昨年度の解析では Clioquinol の脊髄後角における単独投与は sEPSC の発生頻度を増強させ、振幅の程度に影響を与えず、またグルタミン酸受容体拮抗薬である CNQX 存在下では sEPSC は消失するが、Clioquinol 投与後も変化はみられなかった。さらに Na チャンネルブロッカーである TTX 存在下においては mEPSC の発生頻度を増強させ、振幅の程度に影響を与えなかった。以上の結果より、Clioquinol は脊髄後角細胞に入力する末梢神経線維中枢端の終末部に存在する TRPA1 を活性化させ、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を促進させていることが示唆された。SMON の主症状に疼痛、異常感覚障害などの下肢感覚障害があるがグルタミン酸の放出促進による脊髄後角細胞の興奮持続が症状発生メカニズムの 1 つとして考えられた。

E. 結論

Clioquinol は脊髄後角細胞に入力する末梢神経線維中枢端の終末部に存在する TRPA1 に作用し、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸の放出を促進することが判明した。これらの脊髄後角における作用が下肢痛など異常感覚の発生機序に関連している可能性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 泉尚文, 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 曾根勝真弓, 太地良, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏, 吉田宗平: 脊髄後角における興奮性シナプス伝達に対するキノホルムの作用. 脊髄機能診断学 41: 1-5, 2020

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

- 1) 泉尚史, 谷口亘, 山中学他: 脊髄前角細胞におけるキノホルムの興奮性シナプス伝達増強作用. 脊髄機能診断学: 36: 40-46, 2015.
- 2) 泉尚文, 谷口亘, 西尾尚子他: 脊髄後角における興奮性シナプス伝達に対するキノホルムの作用. 脊髄機能診断学: 41: 1-5, 2020
- 3) Kazuyuki K, Yukiko K, Masao S, et al.: Superoxide dismutase as a target of clioquinol-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*: 452 (1): 181-185, 2014
- 4) Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, et al.: Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. *Neuroscience*: 247: 201- 212, 2013
- 5) Andersson DA, Gentry C, Moss S, et al.: Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺. *Proc Natl Acad Sci USA*: 106 (20): 8374-8379, 2009