

海馬の神経伝達物質遊離ならびに神経細胞死における カルシウムイオン放出システムの影響

Effects of Intracellular Ca²⁺ Release System on Neurotransmitter Release and Neuronal Cell Death

若林孝一¹⁾ 森文秋¹⁾ 岡田元宏²⁾ 兼子直²⁾

要旨：Ryanodine受容体 (RyR) はイノシトール3リン酸受容体 (IP3R) とともに小胞体に局在しCa²⁺-induced Ca²⁺ releasing systemを担っている。本研究では、RyRとIP3Rがラット海馬におけるGABAおよびglutamate開口分泌制御機構に及ぼす影響ならびにカイニン酸誘発けいれんマウス脳におけるRyR mRNAの発現について検討した。その結果、IP3R作動薬はGABAおよびglutamateの基礎遊離を濃度依存性に亢進した。RyR作動薬もglutamateの基礎遊離を濃度依存性に亢進したが、GABAの基礎遊離に対しては濃度依存性二相性の効果を示した。カイニン酸けいれんマウスではRyR-1およびRyR-2 mRNAに変化はなかったが、脳型であるRyR-3 mRNAの発現に変動が認められた。つまり、海馬CA3ならびに線条体では6時間をピークとするRyR-3 mRNAの発現亢進を認め、同部位ではmRNAの発現亢進と同時にあるいは遅れて神経細胞死 (アポトーシス) が観察された。以上の結果から、1) RyRの機能過剰亢進は神経伝達系機能の興奮をもたらし、てんかん発作を惹起しうること、2) RyR-3 mRNAの発現亢進はてんかん発作に伴う神経細胞死に関連している可能性が考えられた。このことは、RyR機能を抑制することにより、てんかん性二次性脳障害を防止しうることを示唆するものである。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2003;15:23-30

Key Words : ryanodine receptor, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, GABA, glutamate, neuronal cell death

はじめに

細胞内Ca²⁺は、神経細胞の興奮、伝達物質放出、シナプス可塑性、遺伝子発現ならびに神経毒性など種々の神経機能や病態に重要な役割を果たしている¹⁾。細胞内におけるCa²⁺濃度は、細胞膜上の電位依存性Ca²⁺チャネルおよび受容体作動性イオンチャネルを通るCa²⁺の流入によって上昇し、さらに細胞内のCa²⁺貯蔵プールからのCa²⁺の放出によって上

昇する。Ryanodine受容体 (RyR) はイノシトール3リン酸受容体 (IP3R) とともにCa²⁺貯蔵プールである小胞体に局在しCa²⁺-induced Ca²⁺ releasing system (CICR) を担っている。このうちRyRには骨格筋型 (RyR-1)、心筋型 (RyR-2)、脳型 (RyR-3) の3つのisoformが存在する^{2,5)}。最近、RyR-3欠損マウスでは海馬CA1における長期増強の増加と長期抑制の減少が報告されており⁶⁾、一方、Type 1-IP3R欠損マウスでは強直間代性けいれんが惹起さ

¹⁾ 弘前大学医学部 脳神経血管病態研究施設 分子病態部門
〔〒036-8562 弘前市在府町5〕

²⁾ 弘前大学医学部 神経精神医学講座
Koichi Wakabayashi¹⁾, Fumiaki Mori¹⁾, Motohiro Okada²⁾ and Sunao Kaneko²⁾

¹⁾ Department of Neuropathology, Institute of Brain Science, and ²⁾ Department of Neuropsychiatry, Hirosaki University School of Medicine

れる⁷⁾。一般的にてんかん発作は興奮性と抑制性神経伝達の不均衡によって惹起されると考えられていることから、本研究ではCICRであるRyRとIP3Rが海馬におけるGABAおよびglutamate開口分泌制御機構に及ぼす影響について検討を加えるとともに、カイニン酸誘発けいれんマウス脳におけるRyR mRNAの発現について検討した。

方 法

1. 海馬におけるGABAおよびglutamate濃度の測定

ハロセン吸入麻酔下に雄性Wistar系ラットの海馬にdialysis probeを挿入した。Probe挿入36時間後に修正リンゲル液の還流を開始し、microdialysisを用いて細胞外のGABAおよびglutamateを回収した。回収したGABAおよびglutamateの濃度測定にはhigh performance liquid chromatograph system with an electrochemical detector (ECD-HPLC system)⁸⁾を用いた。還流開始6時間以降に細胞外濃度の測定値が安定化したことを確認後、IP3R作動薬 (adenophostin A), IP3R阻害薬 (xestospongine C), RyR作動薬 (ryanodine) またはRyR阻害薬 (ruthenium red) を含有する修正リンゲル液の還流を施行し、GABAおよびglutamateの基礎遊離に及ぼす影響について検討した。

2. カイニン酸誘発けいれんマウス脳の病理組織学的検索

8週齢のC57BLマウスにカイニン酸 (420318; Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA, USA) 25 mg/kgを腹腔内投与し、1時間以内に全身性けいれんを起こしたものをを用いた。けいれんから2, 6, 12, 24, 48時間後に以下の検索を行った。対照には非投与マウスを用い同様の検索を行なった。ペントバルビタール深麻酔下に、4%パラホルムアルデヒド-0.1%グルタルアルデヒドで経心的に灌流固定し、脳を摘出した。脳を正中矢状断し、右半球からは4ミクロン厚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン

エオジン染色を施した。左半球からはジブラトームで50ミクロン厚の切片を作製し、ウサギ抗c-Fos抗体 (SC52; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:1000) およびウサギ抗ssDNA抗体 (A4506; Dako Cytomation, Kyoto, Japan; 1:100) を一次抗体としてABC法にて免疫染色し、顕微鏡観察した。

3. In situ hybridization

けいれんから2, 6, 12, 24, 48時間後に頸椎脱臼放血後、脳を摘出し粉末ドライアイス上で急速凍結した。クリオスタット (HM500-OM, MICROM) を用い、20ミクロン厚の矢状断切片を作製した。RyR-1 mRNA (bp 1541-1585), RyR-2 mRNA (bp 1195-1240), RyR-3 mRNA (bp 363-411) およびc-Fos mRNA (bp 712-756) に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを作製した。これらのプローブは [³³P] αdATP (2000 Ci/mmol, NEN) とterminal deoxynucleotidyl transferase (Boehringer Mannheim) を用いて標識し、Qiagen spin column (QIAGEN) にて精製した。In situ hybridizationはTomiyamaらの方法⁹⁾ に従った。つまり、50% formamide (Merck), 4x standard saline citrate, 1x denhardt's solution, 1% Salcocy (Sigma), 0.02% phosphate buffer (pH 7.0), 10% dextran sulphate (Sigma), 500 μg/ml salmon sperm DNA (Sigma), 250 μg/ml yeast tRNA (BRL) にて、標識プローブを2x 10⁷ μg/ml の濃度に希釈した。組織標本は4% パラホルムアルデヒドにて浸漬固定した後、標識プローブとハイブリダイゼーションさせた。42℃で18時間反応させた後、洗浄した。洗浄温度は60℃、洗浄時間は45分x4回、洗浄液には20 mM Tris-HCL (pH 7.5) と1mM EDTAを含んだ600 mM NaCl 溶液を用いた。さらにethanolにて脱水し、乾燥させた。ハイブリダイゼーションさせた組織標本はKodak BioMAX MS films に-70℃にて2週間露光させ、現像した。mRNAの発現レベルの定量化にはスキャナー (Epson GT-9500)

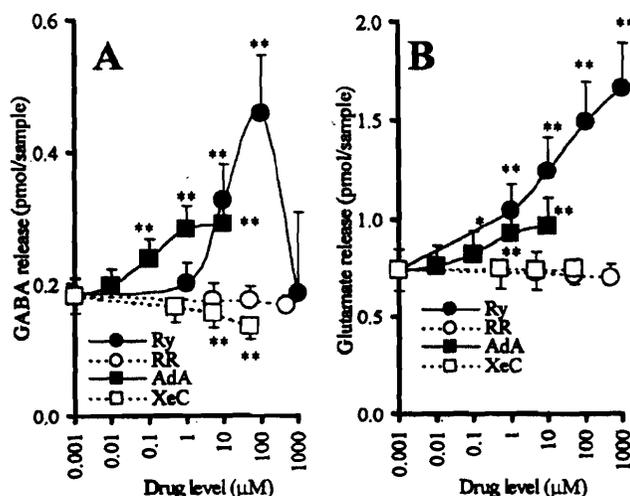


Fig.1 ラット海馬におけるGABA (A) およびglutamate (B) の基礎遊離に対する各種薬剤の影響。RyR作動薬 (ryanodine, Ry)、RyR阻害薬 (ruthenium red, RR)、IP3R作動薬 (adenophostin A, AdA)、IP3R阻害薬 (xestospongion C, XeC)。

にて画像として取り込み、NIH Image 1.61を用い、海馬 (CA1, CA3)、歯状回、前頭皮質、線条体、視床のgray levelの値からバックグラウンドの値を引いた値をoptical densityとして算出した。

結 果

1. 海馬におけるGABAおよびglutamate遊離に対する各種薬剤の影響

IP3R作動薬はGABAおよびglutamateの基礎遊離を濃度依存性に亢進した (Fig.1)。RyR作動薬もglutamateの基礎遊離を濃度依存性に亢進したが、GABAの基礎遊離に対しては濃度依存性二相性の効果を示した。つまり、GABAの基礎遊離はryanodine 100 mMでピークに達し、逆に1mMでは効果がなかった。IP3R阻害薬はGABAの基礎遊離を濃度依存性に抑制したが、glutamateには効果がなかった。RyR阻害薬はGABAおよびglutamateいずれの基礎遊離にも影響を与えなかった。

2. カイニン酸けいれんマウス脳の病理組織学的検討

カイニン酸投与例では、けいれん開始から2時間以降において海馬CA3、歯状回、線条体ならびに大脳皮質II~IV層に変性神経細胞 (核濃縮および胞体の好酸性化) が散在性に認められた (Fig.2A, B)。

c-Fos免疫組織化学では、カイニン酸投与例において2-12時間後に海馬CA1-3、歯状回、線条体、大脳皮質にc-Fos強陽性の核を有する神経細胞が多数認められた (Fig.2C, D)。24時間以降にはc-Fosの発現はほとんど認められなかった。対照例の海馬、線条体、大脳皮質にはc-Fos陽性の神経細胞はほとんど観察されなかった。

アポトーシスのマーカーであるssDNAを用いた免疫組織化学では、カイニン酸投与例において2時間後に歯状回および線条体に、6時間後に海馬CA3、線条体および大脳皮質II~IV層に、12時間後には海馬CA1にも少数のssDNA陽性細胞が認められた (Fig.2E, F)。

3. カイニン酸けいれんマウス脳におけるRyR mRNAの発現

対照例では、RyR-1 mRNAのシグナルは歯状回およびプルキンエ細胞層で高度、嗅球、

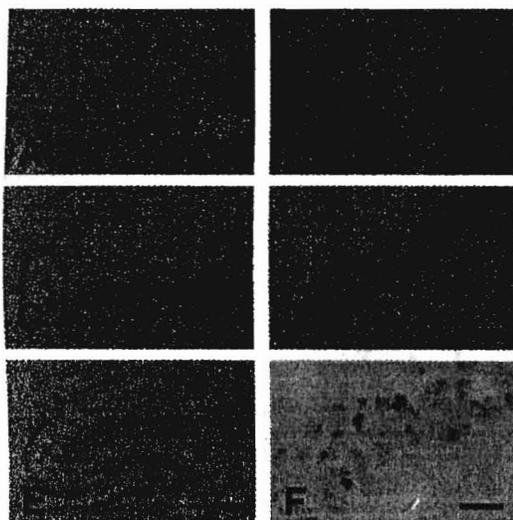


Fig.2 カイニン酸けいれんマウス海馬の病理組織学的所見。(A, B)核濃縮と胞体の好酸性化を示す神経細胞 (CA3, けいれん開始2時間後, H & E 染色)。(C, D)海馬および歯状回におけるc-Fosの高度の発現(けいれん開始2時間後)。(E, F)ssDNA陽性の神経細胞核 (CA3, けいれん開始24時間後)。A, C, E : Bar=200 μ m, B, D, F : Bar=50 μ m。

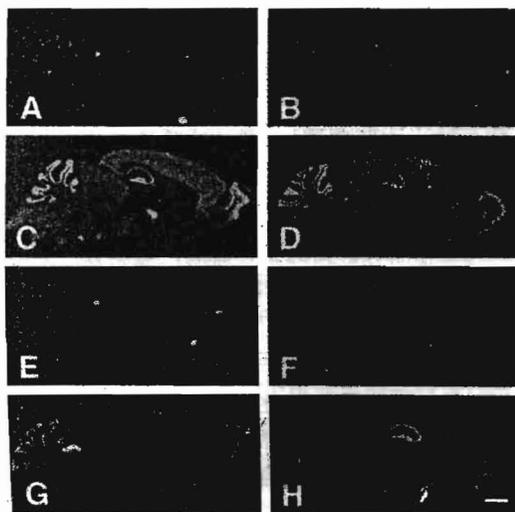


Fig.3 対照 (A, C, E, G) およびカイニン酸けいれんマウス脳 (けいれん開始から2時間後) (B, D, F, H)におけるRyR-1 mRNA(A, B), RyR-2 mRNA (C, D), RyR-3 mRNA (E, F), c-Fos mRNA (G, H) の発現。Bar=1mm。

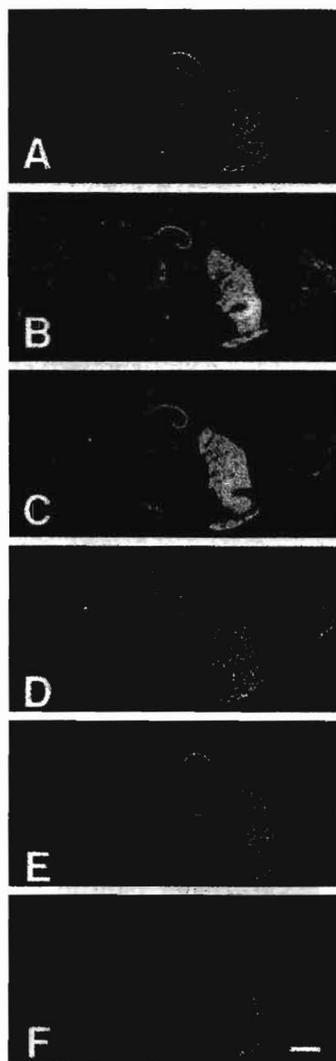


Fig.4 カイニン酸けいれんマウス脳におけるRyR-3 mRNAの経時的変化。対照 (A), けいれん開始から2時間 (B), 6時間 (C), 12時間 (D), 24 時間 (E), 48時間 (F)。Bar=1mm。

海馬CA1, 線条体, 大脳皮質浅層で軽度~中等度であった (Fig.3A)。RyR-2 mRNAのシグナルは視床を除く広範な部位に認められたが, 最も強いシグナルは海馬CA1-3, 歯状回, 小脳顆粒細胞層に認められた (Fig.3C)。RyR-3 mRNAのシグナルは海馬, 線条体, 視床背側で中等度に認められた (Fig.3E)。これらの分布はマウス脳における我々の以前の報告に一致していた¹⁰⁾。

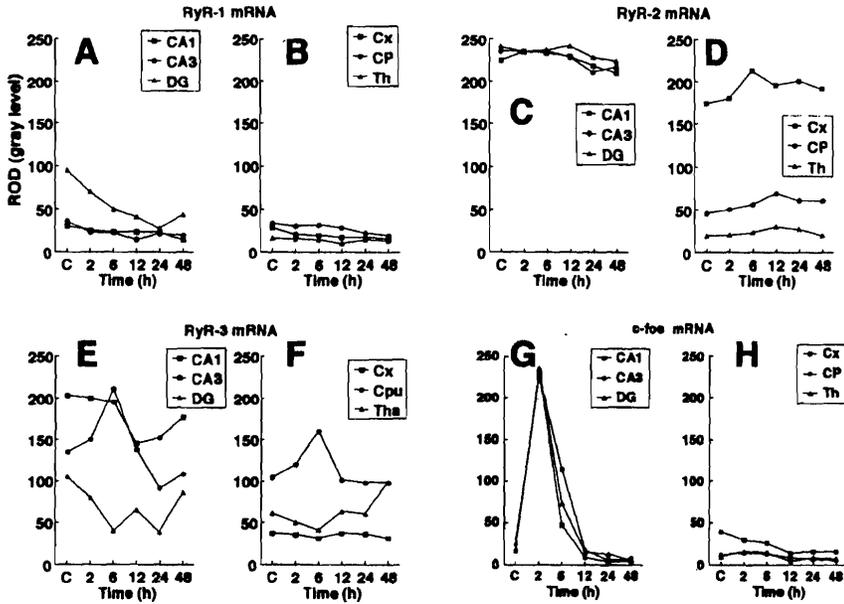


Fig.5 カイニン酸けいれんマウス脳におけるRyR-1 (A, B), RyR-2 (C, D), RyR-3 (E, F) およびc-Fos mRNA (G, H)の変動。DG, dentate gyrus; Cx, cerebral cortex; CP, caudate-putamen; Th, thalamus。

カイニン酸投与例では、RyR-1 mRNA (Fig.3B) および RyR-2 mRNA (Fig.3D) の発現に顕著な変動は認められなかったが、RyR-3 mRNAはけいれん開始から2時間および6時間の海馬CA3ならびに線条体で発現亢進が認められ、その後減弱した (Fig.3F, Fig.4)。

c-Fos mRNAのシグナルは、対照例では大脳皮質、海馬、歯状回、小脳顆粒細胞層で軽度～中等度に認められた (Fig.3G)。カイニン酸投与例では2時間後に海馬CA1-3、歯状回および大脳皮質深層でc-Fos mRNAの高度のシグナルが認められた (Fig.3H)。その後は減弱し、12時間以降にはほとんど消失した。

カイニン酸けいれんマウス脳の各部位におけるRyR mRNAおよびc-Fos mRNAの経時的变化をFig. 5に示した。

考 察

本研究では、カイニン酸誘発けいれんマウスの海馬、線条体、大脳皮質において、投与後早期におけるc-Fos mRNAおよび蛋白の一過性の発現亢進、RyR-3 mRNAの発現亢進が認められた。c-Fos は様々な刺激により活

性化されるimmediately early geneの一つである^{11, 12)}。c-Fos mRNAおよび蛋白の一過性の発現亢進は、発現亢進の見られた海馬、線条体、大脳皮質に存在する神経細胞の過剰興奮に加え、これにより生じる細胞内Ca²⁺の増加があったことを示唆している。最大電撃けいれんでは3-24時間後のラット海馬CA1においてIP3R mRNAの発現低下が報告されている¹³⁾。けいれん誘発法の違いはあるが、本研究結果は、少なくとも神経細胞の過剰興奮によってRyR-3 mRNAがup-regulationされうること示している。

既に、我々は、興奮トリガーの違いによって発動する開口分泌機構が異なる可能性を示してきた⁸⁾。今回、非興奮時においてCICR (IP3R & RyR) の機能亢進はGABAおよびglutamateの遊離を亢進した。一方、RyRの機能過剰亢進はglutamate遊離を亢進したが、GABA遊離は逆に抑制した。このことは、ryanodineは低濃度ではアゴニストとして作用するが、高濃度ではアンタゴニストとして働くことで説明可能である。あるいはGABAニューロンの方がより感受性が高いことを反映しているのかもしれない。いずれにしても、

GABAニューロンが先に破綻し相対的に glutamate優位となれば, RyRの機能過剰亢進, ひいては神経伝達系機能の興奮をもたらし, てんかん発作を引き起こす可能性は充分に考えられる。

本研究では, カイニン酸けいれんマウスにおいて, けいれん後6時間をピークとする RyR-3 mRNAの発現亢進が海馬CA3と線条体に認められた。さらに, これらの部位では mRNAの発現亢進と同時または遅れて神経細胞死(アポトーシス)が認められた。これまで, 海馬スライスを用いた反復刺激において, 小胞体からのCa²⁺放出を阻害する dantrolene ならびに thapsigargin はてんかん性脱分極の誘導ならびに持続には影響を与えないが, けいれんによって惹起される神経細胞死を抑制することが報告されている¹⁴⁾。つまり, 細胞外からのCa²⁺の流入に加えて, ryanodine感受性のCa²⁺貯蔵プールからのCa²⁺が, けいれん誘発性の神経細胞死には必須であることが示唆されている。さらに, RyRのアンタゴニストである dantrolene を投与することで, カイニン酸による神経細胞死が抑制されるという報告^{15, 16)}もこの機序を支持している。これらの報告と今回の結果を併せ考えると, カイニン酸けいれんに伴う神経細胞死にRyR-3が関与していることが考えられる。このことはRyRを介したCa²⁺放出を抑制することにより, けいれん発作に伴う神経細胞死が防止できる可能性を示唆するものである。

文 献

- 1) Simpson PB, Challiss RA, Nahorski SR. Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends Neurosci* 1995; **18**, 299-306.
- 2) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 1989; **339**, 439-445.
- 3) Nakai J, Imagawa T, Hakamata Y, Shigekawa M, Takeshima H, Numa S. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* 1990; **271**, 169-177.
- 4) Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 1992; **312**, 229-235.
- 5) McPherson PS, Campbell KP. The ryanodine receptor/CA²⁺ release channel. *J Biol Chem* 1993; **268**, 13765-13768.
- 6) Futatsugi A, Kato K, Ogura H, Li ST, Nagata E, Kuwajima G, et al. Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *Neuron* 1999; **24**, 701-713.
- 7) Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H et al. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature* 1996; **379**, 168-171.
- 8) Okada M, Zhu G, Yoshida S, Kanai K, Hirose S, Kaneko S. Exocytosis mechanism as a new targeting site for mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Life Sci* 2002; **72**, 465-473.
- 9) Tomiyama M, Rodriguez-Puertas R, Cortés R, Christnacher A, Sommer B, Pazos A, et al. Differential regional distribution of AMPA receptor subunit messenger RNAs in the human spinal cord as visualized by in situ hybridization. *Neuroscience* 1996; **75**, 901-915.
- 10) Mori F, Fukaya M, Abe H, Wakabayashi K, Watanabe M. Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain. *Neurosci Lett* 2000; **285**, 57-60.
- 11) Gass P, Prior P, Kiessling M. Correlation between seizure intensity and stress protein expression after limbic epilepsy in the rat brain. *Neuroscience* 1995; **65**, 27-36.
- 12) Ferrer I, Lpez E, Blanco R, Rivera R, Krupinski J, Marti E. Differential c-Fos and caspase expression following kainic acid

- excitotoxicity. *Acta Neuropathol* 2000; **99**, 245-256.
- 13) Kim H, Rhyu IJ, Kim CM, Suh YS, Park JB, Kang UG, et al. Electroconvulsive shock reduces inositol trisphosphate receptor1 mRNA in rat brain. *Mol Cells* 2001; **12**, 173-177.
- 14) Pelletier MR, Wadia JS, Mills LR, Carlen PL. Seizure-induced cell death produced by repeated tetanic stimulation in vitro: possible role of endoplasmic reticulum calcium stores. *J Neurophysiol* 1999; **81**, 3054-3064.
- 15) Berg M, Bruhn T, Frandsen A, Schousboe A, Diemer NH. Kainic acid-induced seizures and brain damage in the rat: role of calcium homeostasis. *J Neurosci Res* 1995; **40**, 641-646.
- 16) Popescu BO, Oprica M, Sajin M, Stanciu CL, Bajenaru O, Predescu A et al. Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2002; **6**, 555-569.

Summary

Effects of Intracellular Ca^{2+} Release System on Neurotransmitter Release and Neuronal Cell Death

Koichi Wakabayashi, Fumiaki Mori, Motohiro Okada and Sunao Kaneko

Dynamic changes in the intracellular free Ca^{2+} concentration play a crucial role in various neural functions. Neuronal ryanodine receptor (RyR) is thought to be responsible for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, while inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) is involved in IP3-induced Ca^{2+} release. We investigated the effects of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release agents on basal releases of GABA and glutamate in the rat hippocampus and the expression of RyRs mRNA in the mouse brain after kainic acid-induced seizures. IP3R agonist and RyR agonist increased the basal releases of GABA and glutamate. However, excessive amount of RyR agonist increased the basal release of glutamate and decreased that of GABA. Following the kainic acid-induced seizures, transient up-regulation of RyR-3 mRNA was observed in the hippocampal CA3 region and the striatum. Thereafter, neuronal cell death (apoptosis) occurred in these areas. These findings suggest that inhibition of RyR function might prevent neuronal cell death following epileptic seizures.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found.2003;15:23-30