



# Excitatory effect of propentofylline on neurotransmission in guinea pig hippocampal slice

木村, 好江

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1156

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001156>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	木 村 好 江	（北海道）
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）	
学位記番号	博い第830号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成5年3月31日	
学位論文題目	Excitatory effect of propentofylline on neurotransmission in guinea pig hippocampal slice モルモット海馬切片標本におけるプロベントフィリンのシナプス伝達促進作用	
審 査 委 員	主査 教授 岡 田 安 弘	
	教授 山 鳥 崇	教授 尾 原 秀 史

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔要旨〕

モルモット海馬切片標本を用いて、貫通枝を電気刺激し、顆粒細胞層のシナプス後電位（集合電位；PS）を記録した。キサンチン誘導体であるプロベントフィリン（PP）は、100nM から 1 mM の濃度において、PS の振巾は徐々に増大し、10-15 分で薬物投与前の 120-150% に増大した。テオフィリン（TP）は、10  $\mu$ M 以上の濃度で、PS の振巾を薬物投与前の約 200% に増大したプロテインキナーゼC阻害剤である 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7 ; 100  $\mu$ M) 処置下では、PP のシナプス伝達促進作用は抑制されたが、TP の興奮作用は抑制されなかった。以上より、PP の興奮作用は、プロテインキナーゼCを含む細胞内代謝過程を介していることが示唆された。

### 〔はじめに〕

キサンチン誘導体の中でもテオフィリン（TP）は、中枢神経興奮作用を持ち、虚血による神経細胞傷害を増悪することが知られている。これらの現象のメカニズムは従来、内因性アデノシンの脳保護効果に対する TP の拮抗作用であると説明されてきた。アデノシンは、シナプス終末からの神経伝達物質放出抑制、後シナプス細胞のカリウムコンダクタンス増加により、神経活動を抑制することは広く認められている。

一方、最近合成されたキサンチン誘導体であるプロベントフィリン（PP）は、虚血に対し抵抗性の低い海馬 CA1 ニューロンにおいて、虚血時細胞保護効果を持つことが報告されている。更に、PP は、アデノシン取り込み抑制作用、アデノシン A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> レセプター結合作用を示すことから、PP の脳

保護効果は、虚血時に内因性アデノシンの作用を修飾することによると示唆されている。しかし、PP 自身がアデノシンと同様、シナプス伝達を抑制するかなかは不明である。本研究において、我々は海馬スライスを用い、PP と TP のシナプス電位に対する効果を調べ、PP、TP 共にシナプス伝達に促進的に作用することを明らかにした。

#### [方法]

体重 250–350 g のモルモット海馬より作成した厚さ約 200  $\mu$  のスライス標本を、標準液（人口脳脊髄液：NaCl 125mM, NaHCO<sub>3</sub> 26mM, KCl 3mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM, MgSO<sub>4</sub> 1.3mM, glucose 10mM）で 20 分間インキュベーションした後、シナプス電位を記録するための灌流チャンバーに移した。チャンバーには、摂氏 36 度の標準液を 5 ml/min で灌流した。双極銀線電極を用いて、貫通枝を 0.3Hz、刺激巾 100  $\mu$ sec の矩形波で電気刺激し、歯状回顆粒細胞の集合電位（PS）を抵抗 1 M $\Omega$  のガラス電極で記録した。刺激強度は、各標本において最大刺激で得られる PS 振中の 1/2 の電位が得られるよう設定した。PS は少なくとも 30 分間安定させた後、薬剤を投与し、薬剤投与後の PS の大きさの変化は、薬物投与前の PS の振巾に対する % で表した。

#### [結果]

灌流液中に加えられた PP は、顆粒層細胞の PS の振幅を増大した。PP100  $\mu$  M 投与後、PS は 5–10 分後に増加し始め、20 分以内にもとの  $134 \pm 12.6\%$  (mean  $\pm$  SEM., n = 10, p = 0.005 で有意差あり) に達した。増大した PS の振巾は灌流液を再び PP を含まない標準液に置換することにより、もとの大きさに低下した。しかし PS は、PP の作用時間が 30 分以上になると、薬物を除去しても増大したままであった。この場合、貫通枝のシナプス前線維の電位および顆粒細胞層の逆行性刺激による電位は PP により変化せず、PS の振巾のみが増大したことから、PP の PS 増大作用はシナプス伝達促進によると考えられた。

TP も PS 増大作用を示した。TP100  $\mu$  M 投与後、20 分で PS の振巾は薬物投与前の約 200% に増大した。しかし PP 投与時とは異なり、TP 投与後 30 分以上経過した標本でも、増大した PS は薬物除去後、常にもとの大きさに低下した。

次に、これらのキサントチンの濃度反応曲線を作成した。PP は、100nM から 1 mM の濃度で PS の振巾を 30–70% 増大させ、興奮作用を示した。TP は 10  $\mu$  M 以上の濃度で PS の振巾を 100% 増大させた。

PP、TP の興奮作用が徐々に発現することにより、その発現過程に何らかの代謝過程を含む可能性が考えられた。我々は以前モルモット海馬、上丘標本におけるアデノシンの緩徐な興奮作用がプロテインキナーゼ C を含む代謝過程を介していることを報告した。そこでこれらのキサントチンによる興奮に対するプロテインキナーゼ阻害剤の効果を検討した。PP100  $\mu$  M で増大された PS は、プロテインキナーゼ C 阻害剤である H-7 (100  $\mu$  M) 投与により、可逆的に抑制されたが、プロテインキナーゼ A 阻害剤である H-8 (100  $\mu$  M) では抑制されなかった。一方、H-7 (100  $\mu$  M) 投与では TP100  $\mu$  M による PS 増大作用は抑制されなかった。

#### [考察]

本研究では、PPの興奮作用は、TPの興奮作用と有効濃度、PS増大の程度が異なること、また前者には、プロテインキナーゼCを含む代謝過程が関与していることを示した。この結果から、PPとTPは類似した構造を持つにもかかわらず、シナプス伝達促進作用に対しては異なる作用機序を持つことが示唆された。

PPの興奮作用は、10分以内に緩徐に発現し、PPの作用時間が30分以上になると不可逆性変化となり、プロテインキナーゼC阻害剤により抑制された。この興奮の様式がアデノシンの興奮作用と類似している点、PPがアデノシン取り込み抑制作用を持つことより、PPは、アデノシン濃度の増加により興奮作用を示す可能性が考えられる。しかし、アデノシンは濃度依存性に1  $\mu$ M以下では興奮作用、10  $\mu$ M以上では抑制作用を示し、一方PPは100nMの濃度より興奮作用のみを示した。もしPP投与時、シナプス間隙におけるアデノシン濃度がPPの濃度依存性に増加しているのであれば、増加したアデノシンによる抑制作用が発現するはずであるが、PPは100nMの濃度より興奮作用のみを示した。さらに、1  $\mu$ Mアデノシン前処置時、PP100  $\mu$ M投与では、興奮作用のみが観察された。従って、PPの興奮作用は、アデノシン取り込み抑制の結果起こるアデノシン蓄積によるものではなく、PPのシナプス伝達促進作用は、アデノシン系を介しないものである可能性が強いと考えられた。

PP前投与により、脳虚血時に脳内アデノシン濃度は上昇し、グルタミン酸濃度は低下し神経活動が抑制されるとの知見がある。しかし今回の結果では、PPは神経活動を抑制せず興奮させることが明らかとなった。虚血時のPPによる脳保護作用にはアデノシンを介した抑制作用以外のメカニズムが存在する可能性があり、この点については今後更に検討を要する。

## 論文審査の結果の要旨

キサンチン誘導体の中でもテオフィリン (TP) は、中枢神経興奮作用を持ち、虚血による神経細胞障害を増悪することが知られている。これらの現象のメカニズムは従来、内因性アデノシンの脳保護効果に対するTPの拮抗作用であると説明されてきた。アデノシンは、シナプス終末からの神経伝達物質放出抑制、後シナプス細胞のカリウムコンダクタンス増加により、神経活動を抑制することは広く認められている。

最近合成されたキサンチン誘導体であるプロベントフィリン (PP) は、虚血に対し抵抗性の低い海馬CA1ニューロンにおいて、虚血時細胞保護効果を持つことが報告されている。さらにPPが、アデノシンの細胞への取り込み抑制作用およびアデノシン  $A_1$ ,  $A_2$  レセプター結合作用を示すことからPPの保護効果は虚血時に内因性アデノシンの作用を修飾することによることが示唆されている。しかし、PP自身がアデノシンと同様、シナプス伝達を抑制するか否かは不明である。

本研究では、モルモット海馬スライスを用い、PPとキサンチン誘導体の一つであるテオフィリン (TP) の歯状回顆粒細胞のシナプス電位 (PS) に対する効果を調べ、PP、TP共にシナプス伝達に促進的に作用することを明らかにした。更に、蛋白キナーゼC阻害剤を用いてPPによるシナプス伝達促進作用が蛋白キナーゼCを含む代謝過程を介しているかを電気生理学的に検討した。

PP100  $\mu$ M 投与後 PS の振巾は緩徐に増大し、20 分でもとの  $134 \pm 12.6\%$  となった。PP を灌流液から除去すると PS はもとのレベルに減少した。しかし PP の作用時間が 30 分以上になると、増大した PP 振巾は薬物を除去しても増大したままであった。この場合、貫通枝のシナプス前線維の電位、逆行性刺激による顆粒細胞の逆行性電位は PP により変化せず、PS の振巾のみが増大したことから、PP の PS 増大作用はシナプス伝達促進によると考えられた。TP100  $\mu$ M も 20 分後 PS の振巾を薬物投与前の約 200% に増大した。しかし PP 投与時とは異なり、TP 投与後 30 分以上経過した標本でも、増大した PS は薬物除去後、常にもとの大きさに低下した。また PS の振巾は PP (100nM ~ 1 mM) で 30 ~ 70% 増大したのに対し、TP (10  $\mu$ M 以上) で 100% 増大した。

PP の興奮作用を緩徐に発現するが、この興奮性の発現はいわゆる高頻度刺激後におこる LTP (長期増強) やアデノシンによる興奮性効果の時間経過と類似している。LTP およびアデノシンの緩徐な興奮性効果は、蛋白キナーゼ系を含む代謝過程を介してなされることが明らかにされていることから、PP の興奮性効果についても H-7、H-8 などを用いてこの可能性を検討した。PP100  $\mu$ M で増大された PS は、蛋白キナーゼ C 阻害剤である H-7 (100  $\mu$ M) 投与で可逆的に抑制され、蛋白キナーゼ A 阻害剤である H-8 (100  $\mu$ M) では抑制されなかった。このことから PP による緩徐な興奮作用にも蛋白キナーゼ C が関与することが示された。

PP の神経伝達に対する興奮性効果が、蛋白キナーゼ C を含む代謝系を介していることは注目に値する。すなわち、PP の興奮性作用が記憶に関与するといわれるシナプスの可塑性の一つである LTP の維持機構と同一の機序を持つとすれば、今後 PP の興奮性機構を明らかにすることは LTP の発現維持の機構を明らかにすることになる。本研究で明らかにされた PP による興奮性効果は、従来ほとんど行なわれなかった PP の生理作用に重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。