

氏 名 刘 洪涛

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 972 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Channel-mediated release of glutamate and ATP from
astrocytes

| | | |
|--------|--------|-----------------|
| 論文審査委員 | 主 査 教授 | 池中 一裕 |
| | 教授 | 岡田 泰伸 |
| | 教授 | 伊佐 正 |
| | 教授 | 山下 勝幸(奈良県立医科大学) |

**CHANNEL-MEDIATED RELEASE OF GLUTAMATE AND ATP
FROM ASTROCYTES**

Astrocytes release glutamate upon hyperexcitation in the normal brain, and in response to pathologic insults such as ischemia and trauma. In the first part of his study, the pathway responsible for release of glutamate from astrocytes was examined. Both hypotonic and ischemic stimuli caused the release of glutamate from cultured mouse astrocytes. The basal glutamate release from astrocytes was relatively low in standard Ringer solution and did not exceed $0.28 \pm 0.05 \mu\text{M}$ over a 45-min incubation time. In contrast, when the cells were transferred to hypotonic or ischemic solution, the extracellular glutamate concentration rapidly increased and reached a level of $1.7 - 2 \mu\text{M}$ within 15 min. In hypotonic solution, the extracellular glutamate concentration rise was transient; the extracellular glutamate reached a maximum level and then gradually decreased. In contrast, in ischemic condition the extracellular glutamate concentration remained at the maximum level up to at least 45 min of incubation. Pharmacological study by using the relative specific inhibitors demonstrated that the glutamate release occurred with little or no contribution of gap junction hemichannels, vesicle-mediated exocytosis or reversed operation of the Na-dependent glutamate transporter. In the cell-attached (on-cell) configuration, no single-channel events were observed in astrocytes perfused with standard Ringer solution. When the isotonic bath solution was replaced with hypotonic solution, he could consistently observe single-channel events of large amplitude. The channel events had the mean unitary amplitudes of $10.5 \pm 0.7 \text{ pA}$ ($n = 10$) and $-6.0 \pm 0.8 \text{ pA}$ ($n = 10$) at +25 and -25 mV, respectively. Similar events with the mean unitary amplitudes of $10.3 \pm 1.2 \text{ pA}$ ($n = 12$) and $-6.0 \pm 0.8 \text{ pA}$ ($n = 10$) at +25 and -25 mV, respectively, were also observed when astrocytes were stimulated with chemical ischemia. The unitary I-V relationship for these events exhibited slightly outward rectification and had a reversal potential of $-5.1 \pm 0.7 \text{ mV}$. The mean slope conductances for channels activated by hypotonicity were $409 \pm 18 \text{ pS}$ and $241 \pm 20 \text{ pS}$ for outward and inward currents, respectively; the channels activated by chemical ischemia had the mean slope conductances of $430 \pm 12 \text{ pS}$ and $272 \pm 19 \text{ pS}$ for outward and inward currents, respectively. Channel activation occurred after a lag time, which varied from patch to patch and ranged from 6.8 to 16.6 min for hypotonic stimulation and from 7.6 to 15.9 min for chemical ischemia. Mean values, however, did not differ significantly for hypotonic and ischemic stimulation. Further study demonstrated that maxi-anion channel is anion-selective with a permeability ratio of glutamate to Cl^- of 0.20 ± 0.01 . Gadolinium, arachidonic acid (AA), NPPB and SITS shared consistent effects on both the activity of maxi-anion channel and glutamate release from astrocytes in either hypotonic or ischemic stress which indicated that maxi-anion channel is a major pathway for glutamate release in

these situation.

The volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) Cl^- channel, which was also expressed in astrocytes, exhibited an intermediate unitary conductance (~ 80 pS) and inactivation kinetics at large positive potentials of more than $+40$ mV, was permeable to glutamate with a permeability ratio of glutamate to chloride of 0.15 ± 0.01 . However, the release of glutamate was significantly more sensitive to Gd^{3+} , a blocker of maxi-anion channel, than to phloretin, a blocker of the VSOR Cl^- channel.

In the second part of the present study, the possible relation between activity of maxi-anion channel and ATP release was tested in mouse astrocytes in primary culture upon hypoxia. In response to hypoxia stress, astrocytes exhibited both activation of maxi-anion channel and massive release of ATP. Hypoxia-induced ATP release was inhibited by blockers of maxi-anion channel, but not by those of the VSOR Cl^- channel and other candidate pathways for ATP release, such as gap junction hemichannel, ABC (ATP-binding cassette) transporters (CFTR, MDR), and exocytosis. Using a biosensor technique based on ATP responses of P2X_2 receptors overexpressed in HEK293 cells, the local ATP concentration on a single astrocyte surface was found to increase to about $3.7 \mu\text{M}$ during hypoxia.

Based on his results, he concluded that cultured mouse astrocytes abundantly express both the maxi-anion channel and the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) chloride channel. The maxi-anion channel and VSOR Cl^- channel jointly represent a major conductive pathway for release of glutamate from swollen and ischemia-challenged astrocytes, with a predominant contribution from the maxi-anion channel. The maxi-anion channel but not the VSOR Cl^- channel, contributes to the release of ATP from astrocytes under hypoxic stress. Hypoxia could induce maxi-anion channel activation in astrocytes of acutely isolated mouse hippocampus slices further indicated that maxi-anion channel properly functioning for some important roles in physiological/pathological conditions.

論文の審査結果の要旨

アストロサイトは正常脳では過興奮時に、そして虚血・外傷などのような病的傷害時にもグルタミン酸やATPを放出し、脳機能の修飾に大きな影響を及ぼす。これらの物質の放出経路を明らかにすることはそれらの放出を制御するために極めて重要であるが、未だ統一した見解が得られていない。本研究の第1部では、マウスのアストロサイトにおけるこのグルタミン酸を放出路が検討された。低浸透圧刺激や虚血刺激に対して培養マウス脳アストロサイトはグルタミン酸を放出した。basalのグルタミン酸放出は大変低く、正常リンゲル液中でのそれは0.28.M程度であった。これに対し、低浸透圧液や虚血誘導液にアストロサイトを移すと、細胞外グルタミン酸濃度は急速に高まり、刺激15分後には1.7-2.Mのレベルに達した。比較的特異的なブロッカーを用いての薬理的検討の結果、ギャップジャンクション・ヘミチャネルや、エキソサイトーシスやNa依存症グルタミン酸トランスポータの逆回転反応は、これらのグルタミン酸放出には殆ど寄与していないことが明らかとなった。セルアタッチモード・パッチクランプ法によって、大型の単一チャネルコンダクタンスをもったチャネル活性が、低浸透圧刺激によって引き起こされることが観察された。同様の大型チャネル活性は、化学的虚血刺激によってももたらされた。電気生理学的および薬理的解析の結果、このマキシ・アニオンチャネルがグルタミン酸放出の主要路であるものと考えられた。

容積感受性外向整流性(VSOR)クロライドチャネルもアストロサイトに発現しており、このチャネルもグルタミン酸放出に関与していることが示されたが、マキシ・アニオンチャネルより寄与は少ないことが示唆された。

アストロサイトは低酸素ストレス下においてマキシ・アニオンチャネル活性化とATP放出を示したので、本研究の第2部ではこれら両者の関係が調べられた。低酸素刺激性に引き起こされたATP放出時はマキシ・アニオンチャネルのブロッカーで抑制されたが、VSORクロライドチャネルのブロッカーや、その他のATP放出路の候補であるギャップジャンクション・ヘミチャネルやABCトランスポータ(CFTRやMDRなど)やエキソサイトーシスのブロッカーでは抑制されなかった。HEK293細胞に強制発現させたP2X₂レセプター(ATP作動性カオチンチャネル)のATP応答を用いてのバイオセンサー法によって、単一アストロサイト外表面の局所ATP濃度は低酸素刺激によって約3.7.Mに上昇することが判明した。

今回の実験結果によって、アストロサイトからのグルタミン酸やATPの放出に新たな経路の存在することが示された。グルタミン酸放出にはマキシ・アニオンチャネルとVSORクロライドチャネル、ATP放出に対しては、マキシ・アニオンチャネルが寄与すると結論された。海馬スライス内のアストロサイトにおいてもマキシ・アニオンチャネルが低酸素刺激で活性化するので、このマキシ・アニオンチャネルは生理的・病的条件下で重要な機能を果たしていることが示唆された。

本研究はグリア研究の最も重要な課題に新たな方向性をつけるものであり、学位論文として充分である。また、学位審査における発表も英語で行われ、論文も申し分のない英語で書かれており、語学力も学位授与に充分であった。以上のようにLiu氏の研究内容と研究能力は十分な水準に達していると判定された。