

氏名・(本籍)	赤坂 徹 (福岡県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙 第59号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当(論文博士)
学位論文題目	ベンゾジアゼピン投与による三叉神経中脳路核 GABA(A)受容体の変化についての研究—免疫組 織化学的手法によるGABA(A)受容体内在化の検 討—
論文審査委員	主査 教授 姜 英 男 副査 教授 矢島 俊彦 副査 教授 東城 庸介

論文内容の要旨

[緒言]

GABA (γ -Aminobutyric Acid) は抑制性の神経伝達物質として中枢神経系に広く存在している。咀嚼筋および歯根膜の感覚を司る一次感覚ニューロンである三叉神経中脳路核細胞にはGABA(A)受容体が多く発現している。GABA(A)受容体を構成している α , β , γ , σ , の4種のサブユニットのなかで, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ が三叉神経中脳路核ニューロンにおけるGABA(A)受容体を構成していることが石井により明らかにされている。またGABA(A)受容体は通常細胞膜表面に存在しているが、アゴニストと結合した後に、細胞内に取り込まれる、内在化現象を生じる可能性が近年報告されている。向精神薬の多くはGABA(A)受容体を賦活化するベンゾジアゼピン系の薬物であり、GABA(A)受容体の内在化現象の実証およびその機構の解明は極めて重要である。

[目的]

本研究は三叉神経中脳路核ニューロンにおけるGABA(A)受容体をポリクロナール抗体を用いた免疫組織化学的方法により検出し、アゴニストまたは生理食塩水投与後のGABA(A)受容体の染色像を比較・検討することで、GABA(A)受容体の内在化現象を視覚的に示すことを目的に行った。

[材料と方法]

①実験動物

本実験には5週齢Wistar系雄性ラットを用いた。全身麻酔下にて、咬筋神経を実体顕微鏡下に明示し、デキストラン・ローダミンをマイクロシリンジを用いて注入した。ローダミンが逆行性に三叉神経中脳路核にまで取り込まれる24時間後に、実験群にはジアゼパム(25mg/kg)またはムシモール(5mg/kg)を、また、コントロール群のラットには生理食塩水をそれぞれ腹腔内投与した。腹腔内投与30分後に、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M phosphate buffer (pH7.2~7.4)にて灌流固定後脳組織を摘出した。また、ジアゼパム投与6時間後のラットも同様の方法で灌流固定を行い脳組織を摘出した。摘出された脳組織は24時間の後固定をおこなった後に、30%シュウクロス溶液に24時間浸し、その後、液体窒素にて凍結保存した。

②免疫組織化学染色

凍結脳幹より、マイクロトームを用いて20 μ mの前額断連続脳切片を作製し、薄切した切片はmicroplateの各wellに集め、0.02M, phosphate buffered saline (PBS)にて10分間3回洗浄した。その後、ブロッキングに1% bovine serum albuminを30分反応させ、0.3%, tritonX-100 (TX-100)を含む0.02M, PBSにて100倍に希釈したGABA(A)受容体の $\alpha 2$ および $\alpha 5$ に対する抗体を1次抗体として、4 $^{\circ}$ C, 2日間反応させた。1次抗体の反応後に0.02M, PBSにて10分間3回洗浄し、FITC標識し

た2次抗体を0.3%, TX-100を含む0.02M, PBSにて100倍に希釈したものを2時間反応させた。2次抗体の反応終了後は0.02M, PBSにて10分間3回洗浄し, 切片をスライドグラスにマウントした。

③共焦点レーザー顕微鏡による蛍光強度の計測

スライドグラスにマウントした切片は以下の方法によって共焦点レーザー蛍光顕微鏡により蛍光強度を計測した。FITC蛍光染色のみによって染色された三叉神経中脳路核ニューロンの細胞体の領域およびバックグラウンド領域の蛍光強度を計測した。また, ローダミンの逆行性染色と免疫組織化学染色との二重染色を行った場合には, ローダミンの染色により示された三叉神経中脳路核ニューロンの細胞体領域のFITCの蛍光強度をバックグラウンドの蛍光強度とともに計測した。これらの計測結果から, 画素数を縦軸にとり, 横軸の蛍光強度に対してプロットした。そのとき, 細胞体領域の画素の総数で蛍光強度を有する画素の数を除し, 画素の総数が1になるように規格化したグラフを作成した。実験群と対照群についてそれぞれグラフを得て, 統計処理をおこない有意差について検討した。

[結 果]

GABA (A) 受容体の $\alpha 2$, $\alpha 5$ に対する1次抗体をそれぞれ使用して, 免疫組織化学染色をおこなった結果, $\alpha 5$ に対する1次抗体を使用したときのFITC蛍光強度は $\alpha 2$ に対する1次抗体を使用したときに比べ弱いことが示された。このため, $\alpha 2$ に対する1次抗体を使用して実験群とコントロール群のFITC蛍光強度を比較検討した。その結果, 実験群のFITC蛍光強度は, コントロール群に比べ有意に低かった。

またコントロール群はFITC蛍光強度が強く, 細胞の境界が明瞭に示されたが, 実験群ではFITC蛍光強度が弱く, 細胞体の領域を正確に測定していない可能性が考えられた。このため, あらかじめローダミンを逆行性に取り込ませておいた中脳路細胞の $\alpha 2$ サブユニットをFITC標識し, ローダミンとFITCによる二重染色をおこなった。ローダミン染色により明確となった細胞体領域のFITC蛍光強度を実験群およびコントロール群において計測した。この結果, 実験群のFITC蛍光強度はコント

ロール群に比べ減弱し, 有意差 ($P < 0.005$) が認められた。また, ジアゼパム投与6時間後のラットではコントロール群と実験群の細胞体の蛍光強度に有意差は認められなかった。

[考 察]

① $\alpha 2$ に対する1次抗体と $\alpha 5$ に対する1次抗体の染色性の違いについて

三叉神経中脳路核ニューロンのGABA (A) 受容体サブユニットのmRNAをsingle cell RT-PCR法で分析した石井の研究では $\alpha 2$ および $\alpha 5$ サブユニットの発現が認められた。本研究ではGABA (A) 受容体の $\alpha 5$ に対する抗体を使用した方が $\alpha 2$ に対する抗体を使用するよりFITCの蛍光強度は弱くなった。この結果は, 石井の研究と一見矛盾するものであった。本研究で使用した1次抗体は $\alpha 2$ サブユニットC末端を, $\alpha 5$ サブユニットではN末端をそれぞれ認識するものであった。三叉神経中脳路核ニューロンにおける $\alpha 5$ サブユニットのN末端はsplicing variantを生じていて抗体のエピトープの3/4は欠損部位に含まれている。このため本研究では三叉神経中脳路核の $\alpha 5$ サブユニットは抗体により十分に認識されていない可能性があると考えられた。

②実験群のFITC蛍光強度がコントロール群より弱いことについて

本研究では, 実験群のFITC蛍光強度がコントロール群より有意に低かった。これは実験群におけるGABA (A) 受容体あるいはGABA (A) 受容体サブユニット $\alpha 2$ の数が減少したか, 1次抗体に認識されにくい状態になっていることを示している。ベンゾジアゼピン系の薬物であるジアゼパムはGABA (A) 受容体と複合体を形成するベンゾジアゼピン受容体と結合することにより, GABA (A) 受容体のCl⁻イオンのチャンネル開確率を増加させGABAの作用を増強すると考えられている。またムシモールはGABA受容体のアゴニストとして作用しGABAと同様の薬理作用をもたらす。どちらの場合もラットは睡眠状態でGABA (A) 受容体が強く活性化されていたと考えられる。こうしたGABA (A) 受容体の強い活性化が受容体の内在化を引き起こし, 実験群ではFITC蛍光強度の低下という現象が生じたと考えた。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

三叉神経中脳路核ニューロンにはGABA (A) 受容体が豊富に発現しているが, GABA (A) 受容体はアゴニストと結合した後に, 通常発現している細胞膜から細胞内に取り込まれる, 内在化現象(internalization)を生じ

る可能性が培養系や発現系において近年報告されている。三叉神経中脳路核細胞におけるGABA (A) 受容体の内在化は近年, 関心が高まっている顎関節症およびブラキシズムといった咀嚼運動調節機構の障害に関与する

可能性がある。しかしこれらの疾患に大きく関わる咀嚼運動の調節機構およびGABA (A) 受容体との関わりについては未だ不明な点が多い。

そこで本研究は三叉神経中脳路核ニューロンにおけるGABA (A) 受容体の活性化に依存して生じる急性の内在化現象について、主にポリクロナール抗体を用いた免疫組織化学的方法を用いて、実証することを目的におこなった。

本研究において申請者は以下の結果を得た。

1. ジアゼパムの腹腔内投与30分後には、三叉神経中脳路核細胞においてGABA (A) 受容体の存在を検出する蛍光強度が減弱した。この所見はGABA (A) 受容体の内在化により受容体タンパク質が分解された結果、GABA (A) 受容体の数が減少したことを示唆している。
2. ムシモールの腹腔内投与30分後には、三叉神経中脳路核細胞においてGABA (A) 受容体の存在を検出する蛍光強度が減弱した。この所見はGABA (A) 受容体の内在化により受容体タンパク質が分解された結果、GABA (A) 受容体の数が減少したことを示唆し

ている。

3. ジアゼパム投与6時間後のラットの三叉神経中脳路核細胞の蛍光強度についてはコントロール群と有意差がなかった。このことから、アゴニスト投与30分後に認められたGABA (A) 受容体数の減少は細胞障害性のものではなく可逆性の現象であることが示された。

4. 実験群ラットの三叉神経中脳路核細胞におけるGABA (A) 受容体は投与薬剤の影響を受けていることが示された。また、これらの結果とGABA (A) 受容体のサブユニットの構成要素について検討したところ、分子生物学的解析の結果とも適合した。

これらの結果から、三叉神経中脳路核細胞におけるGABA (A) 受容体はアゴニストの作用によりその数を減少させ、受容体数の減少については受容体の内在化機構が大きく関わっていると推測された。

本研究から得られた結果は歯科医学特に咀嚼運動調節機構の解明において進歩発展に寄与するところは大であり、よって審査の結果、本論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと考えられる。

氏名・(本籍)	内 田 暢 彦 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	乙 第60号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当 (論文博士)
学位論文題目	有郭乳頭味蕾におけるBDNF (脳由来神経栄養因子) とtrkBの発現
論文審査委員	主 査 教 授 金 澤 正 昭 副 査 教 授 矢 嶋 俊 彦 副 査 教 授 武 田 正 子

論 文 内 容 の 要 旨

[緒 言]

マウスを用いた実験により、舌咽神経を切断すると舌有郭乳頭の味蕾がアポトーシスによる細胞死により次第に数を減らし、手術後10日目頃までに完全に消失してしまうことが報告されている。すなわち味蕾の支配神経は、味蕾細胞のアポトーシスを抑制する因子、言いかえると

生存維持作用を持つ因子を放出するのではないかと思われる。また、味蕾の発生過程や神経切断後の再生過程においては、上皮内に神経が侵入した後に味蕾が形成されることから、味蕾の発生、分化、成長には神経から放出される栄養因子が必要不可欠であると考えられる。

味蕾細胞は神経細胞に似た明るい大きな細胞で神経とシナプス接合を行い、ニューロンと近縁の細胞である。