

Title	Alterations in Neocortical Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor mRNAs Following Unilateral Lesions of the Rat Nucleus Basalis Magnocellularis
Author(s)	宮井, 一郎
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37589
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	みや	い	いち	ろう
	宮	井	一	郎
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 3 1 0	号	
学位授与の日付	平	成	2 年 8 月 8 日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	Alterations in Neocortical Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor mRNAs Following Unilateral Lesions of the Rat Nucleus Basalis Magnocellularis (痴呆モデルにおける脳ニコチン性アセチルコリン受容体遺 伝子発現の解析)			
論文審査委員	(主査) 教授	垂井清一郎		
	(副査) 教授	西村 健	教授	津本 忠治

論文内容の要旨

〔目的〕

脳の高次機能は神経細胞相互のシナプスを介した情報伝達を基盤として成立している。高次脳機能障害を招く一因としてシナプスにおける神経伝達物質受容体の減少による伝達効率の低下があげられる。事実、アルツハイマー型痴呆ではマイネルト核から大脳皮質へ投射するコリン作動系神経細胞の変性が認められ、大脳皮質のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 数が減少している。したがって痴呆モデルにおける大脳皮質 nAChR 発現の解析はニコチン性コリン作動系の高次脳機能への関与を知る上で重要であると考えられる。そこで本研究では動物でマイネルト核と相同である nucleus basalis magnocellularis (ubm) を破壊して大脳皮質への入力を断ち、コリン性脱神経支配 (cholinergic deafferentation) をおこすと学習障害が生じることに着目した。本研究はこの実験動物におけるニコチン性コリン作動性神経細胞の機能変化を受容体 mRNA 発現を主な指標として解析することにより、神経細胞間の相互作用を遺伝子レベルで明らかにすることを目的とした。

〔方法〕

Sprague-Dawley ラット (オス, 250-300 g) の左 nbm を脳定位手術にてイボテン酸を注入破壊後, 1 週と 4 週に断頭し前頭頂葉皮質を摘出し, 同部の 1) アセチルコリン合成酵素 (コリンアセチルトランスフェラーゼ, ChAT) 活性, 2) nAChR 含量, 3) nAChR mRNA の発現量の変化を非破壊側を対照として解析した。4) Sham 手術を行ったラットでも同様に検討した。大脳皮質 ChAT 活性は ^{14}C -アセチル CoA を基質として Fonnum の方法にしたがって測定した。nAChR 含量は ^3H -L-

ニコチンをリガンドとして、プロテアーゼ阻害剤の存在下でホモゲナイズした脳組織への結合を Lippiello らの方法で測定した。RNA は脳組織よりグアニジン / 塩化セシウム法で抽出し、オリゴ (dT) カラムでポリ(A)⁺ RNA を分離した。各 nAChR サブユニット cDNA ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$) の相同性の低い 3' 側約 500 bp を ³²P でラベルし、プローブとして用いた。各 nAChR サブユニット mRNA 発現量はノザンプロット法およびドットプロット法で解析した。また対照として β アクチン mRNA 発現を検討した。

〔成績〕

- 1) ChAT 活性：非破壊側の脳皮質 ChAT 活性は平均 4.0 $\mu\text{mol hour/g tissue}$ であった。破壊側の ChAT 活性は nbm 破壊後 1 週, 4 週とも有意に低下し ($p < 0.01$, Student's *t* test), それぞれ非破壊側の 65%, 64% であった。
- 2) nAChR 含量：Scatchard 解析では脳皮質には単一の高親和性ニコチン結合部位が存在し、非破壊側の K_d, B_{max} はそれぞれ平均 23.8 nM, 67.2 fmol/mg protein であった。破壊側において K_d, B_{max} は 1 週後, 4 週後とも変動を示さなかった。
- 3) nAChR mRNA 発現量：ノザンプロット分析の結果, $\alpha 4$ プローブで 2.4 Kb, $\alpha 3$ で 2.0 Kb, $\beta 2$ で 3.9 Kb と 5.7 Kb のバンドが検出され, 各プローブ間で交叉反応は認められなかった。そこで各 nAChR サブユニット mRNA 発現量は段階希釈したポリ(A)⁺ RNA 量と, ドットプロットのオートラジオグラムからデンスシトメーターで測定した信号強度をプロットして決定した。nbm 破壊 1 週後, 対照とした β アクチン mRNA の発現量は変動しなかったにもかかわらず, $\alpha 4$ および $\beta 2$ mRNA の発現量は非破壊側より有意に増加し ($p < 0.01$, Student's *t* test), それぞれ平均 +82%, +19% であった。これらの mRNA 発現量は 4 週後には非破壊側と同一のレベルにもどった。一方, $\alpha 3$ mRNA 発現量の nbm 破壊による変動はみられなかった。
- 4) Sham 手術群においては ChAT 活性, nAChR 含量, nAChR サブユニット mRNA 発現量に変動はみられなかった。

〔総括〕

前頭頂葉皮質の ChAT 活性は nbm からのコリン性脱神経支配により非破壊側の 65% に低下した。nbm 破壊 1 週後, $\alpha 4$ と $\beta 2$ mRNA の発現量が非破壊側のそれぞれ 1.8, 1.2 倍に増加したが, 4 週後にはともに非破壊側と同一のレベルにもどった。 β アクチン mRNA 発現量に変化がなかったことから, これらの変動は nAChR サブユニット mRNA に特異的なものであると考えられ, 脱神経をうけた脳皮質神経細胞において早期に除神経性過敏に対応した受容体 mRNA 発現の変化が存在することを示唆する。nbm 破壊による皮質 nAChR 発現の変動は, 従来リガンド結合法では検出されていなかったが, 本研究ではそれを遺伝子発現レベルではじめて明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究は、動物でnucleus basalis magnocellularis (nbm)を破壊して大脳皮質への入力を断ち、コリン性脱神経支配をおこすと学習障害が生じることに着目し、この際のニコチン性コリン作動性神経細胞の機能変化をニコチン性アセチルコリン受容体mRNA発現を主な指標として経時的に解析したものである。その結果、nbm破壊後1週でニコチン性受容体サブユニットのうち $\alpha 4$ と $\beta 2$ mRNAの発現量がそれぞれ1.8倍、1.2倍に増加し、4週でもに対照と同一のレベルにもどることが明らかになった。このような早朝の変動は、脱神経をうけた大脳皮質神経細胞において除神経性過敏に対応した受容体mRNA発現の変化が存在することを示唆する。nbm破壊による皮質ニコチン性受容体発現の変動は従来、リガンド結合法では検出されていなかったが、本研究はそれを受容体遺伝子発現レベルではじめて明らかにしたものであり学位に値する業績と認められる。