Osaka University Knowledge Archive

Title	Deafness induced up-regulation of GluR2/3 and NR1 in the spiral ganglion cells of the rat cochlea
Author(s)	長谷川, 太郎
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42682
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【9】

氏　　名	長谷川（はせがわ）　太郎（たろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15683　号
学位授与年月日	平成12年8月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Deafness induced up-regulation of GluR2/3 and NR1 in the spiral ganglion cells of the rat cochlea （聾ラット蝸牛における AMPA 型、NMDA 型グルタミン酸受容体発現量の増加）
論文審査委員	（主査） 教授　久保　武 （副査） 教授　津本　忠治　　教授　遠山　正彌

論文内容の要旨

【目的】

両側高度感音難聴（聾）患者の聴覚系に、正常聴力者と比較して、どのような器質的・機能的な変化が生じているのかを知ることは、聾患者に対する人工内耳手術後に観察される聴覚の可塑性を解明する上で重要と考えられる。これまでの研究から、聴覚系の求心性神経伝達には主としてグルタミン酸受容体が関与すること、また、中枢神経系の可塑性にグルタミン酸受容体が関与していることが明らかになってきている。そこで、本研究では、聴覚系末梢受容器である蝸牛におけるグルタミン酸受容体の発現量について、聾動物と正常動物とで比較を行い、どのような違いが生じているか検討した。

【方法】

生直後よりカナマイシン（800mg/Kg/day）を2週間連続で全身投与して聾ラットを作成した。カナマイシン投与終了時を0週とし、以後、2週、4週、8週それぞれの時点で、蝸牛の器質的・機能的な変化を検討した。0週の時点で、聴性脳幹反応（ABR）にて全てのラットが聾であることを確認した。ABR 施行後、ペントバルビタール麻酔下に4％パラホルムアルデヒドにより経心潅流固定し、蝸牛を摘出、脱灰して凍結切片を作成した。各週数で、蝸牛、コルチ器の形態的変化、ラセン神経節細胞数について解析し、正常動物との比較を行った。

さらに、グルタミン酸受容体サブタイプの内、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1, GluR2/3, GluR4, NMDA 型グルタミン酸受容体 NR1、NR2に対する抗体を用いて ABC 法による免疫染色を行い、ラセン神経節細胞におけるこれら受容体蛋白の発現量を NIH-image により定量化した。なお、免疫染色の各段階において、試薬、温度、反応時間等全ての条件が同じになるよう留意した。

また、0、2、4、8週それぞれの時点で、PBS 中にて切り出した蝸牛軸から mRNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を作成し、PCR 定量システム、パーキンエルマー社製 ABI7700を用いた real time PCR 法により、0週での発現量を基準とした各時点での相対的なグルタミン酸受容体 mRNA の発現量を求めた。その際、house keeping gene である GAPDH mRNA の発現量を各 mRNA 量の補正に用いた。

【結果】

聾ラットでは、0週～8週の時間軸の経過にともなって、ラセン神経節細胞数は単調な減少を示した。他方、正常動物のラセン神経節細胞数には変化を認めなかった。正常動物のラセン神経節細胞では、AMPA型グルタミン酸受容体GluR1、GluR2/3、およびNMDA型グルタミン酸受容体NR1、NR2が発現していた。聾ラットのラセン神経節細胞では、求心性神経伝達の主役とされるG1uR2, G1uR3蛋白の発現量が、時間経過と共に増加し、0週との比較で、4週と8週では統計学的な有意差を認めた。NR1蛋白の発現量も、4週で統計学的に有意な増加を示した。また、蛋白発現量の変化と一致して、生存するラセン神経節細胞1個当たりのGluR2、GluR3、NR1mRNAの発現量は、4週、8週で統計学的に有意な増加を示した。

【総括】

GluR2を含むグルタミン酸受容体が発現する細胞では、その細胞膜のCa2+透過性は極めて低くなることが知られている。一方、NR1を発現する細胞は、Ca2+を極めて効率よく透過させることが知られている。本研究で観察されたグルタミン酸受容体の質的・量的な変化は、聾ラット蝸牛内で生存するラセン神経節細胞のCa2+透過性の変化を示唆するものと考えられる。細胞内Ca2+濃度は、神経細胞死に密接に関連すること、また、神経細胞の可塑性において重要な役割を果たすことが知られており、聾ラット蝸牛内での器質的・機能的変化を分子レベルで説明するものと考えられる。さらに、求心系神経伝達の主役であるGluR2、GluR3発現量の増加は、減少したラセン神経節細胞の機能を代償するための細胞興奮性の上昇とも解釈される。

論文審査の結果の要旨

本研究は人工内耳の動物モデルとして、ラットにカナマイシンを2週間連続投与して聾ラットを作成、投与終了時を0週として、以後2週、4週、8週の時点で、内耳ラセン神経節の変化を経時的に観察したものである。

形態学的観察では、聾ラットでは、0週～8週の時間経過に従い、ラセン神経節細胞数は単調な減少を示した。さらに、グルタミン酸受容体サブタイプである、AMPA型グルタミン酸受容体GluR1、GluR2/3、NMDA型グルタミン酸受容体NR1の蛋白、mRNA発現量の変化を、免疫染色およびrealtime PCR monitoring法を用いて解析した。

聾ラットのラセン神経節細胞では、NR1蛋白の発現量は0週との比較で、4週で統計学的に有意な増加を示し、GluR2、GluR3蛋白の発現量は、時間経過と共に増加し、4週と8週では統計学的な有意差を認めた。さらに、生存するラセン神経節細胞1個当たりにおいて、蛋白発現量の変化と一致して、NR1 mRNA発現量は4週で、GluR2、GluR3 mRNA発現量は、4週、8週で、それぞれ統計学的に有意な増加を示した。

NR1受容体とGluR2受容体は細胞内Ca濃度を、前者は増加、後者は減少させることが知られる。細胞内Ca濃度は、神経細胞死、いわゆるapoptosisの誘導、抑制に密接に関連し、cell survivalを規定する因子であることから、本研究で観察されたNR1、GluR2受容体発現量の増加は、2つの受容体発現量のバランスにより、新たなる細胞内Ca濃度の設定がなされラセン神経節細胞の生存に寄与しているものと考えられる。

一方、内有毛細胞とラセン神経節細胞間のシナプス再生に、NR1受容体が関与することが報告されており、また、蝸牛コルチ器の形成・発達時期にNR1、GluR2、GluR3の各受容体が感覚細胞と1次ニューロン間のシナプス形成に密接に関与していることが推察されている。本研究で観察されたNR1、GluR2、GluR3受容体発現量の増加は、シナプス再生へ向けて、生存するラセン神経節細胞において、細胞内Caにより制御される種々の細胞内シグナル伝達系の活性化が生じていることを示唆するものとも考えられる。

これらの結果は内耳性難聴の病態解明に寄与するものであり、学位に値するものと考える。