



Title	Dominant localization of adenosine deaminase in leptomeninges and involvement of the enzyme in sleep
Author(s)	岡田, 哲也
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45365
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	岡 田 哲 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 4 9 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	Dominant localization of adenosine deaminase in leptomeninges and involvement of the enzyme in sleep (脳膜におけるアデノシンデアミナーゼの特異的な局在と睡眠調節における役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 杉 田 義 郎 (副査) 教 授 福 田 淳 教 授 祖 父 江 憲 治

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

アデノシンは内因性の睡眠物質であり、アデノシン受容体の拮抗薬であるカフェインの摂取により入眠困難になることが一般的によく知られている。アデノシンの睡眠誘発作用は脳内のアデノシン A₁ および A_{2A} 受容体によって仲介されることが、これまでの行動薬理学的な研究から明らかになっている。特に、A_{2A} 受容体の作動薬である CGS-21680 を前脳基底部のくも膜下腔へ投与することにより、顕著に睡眠を誘発できることが報告されている。しかし、くも膜下腔における細胞外アデノシン濃度の調節メカニズムは解明されていない。本研究では、脳内およびくも膜下腔周辺におけるアデノシンの代謝酵素の分布を調べることで、くも膜下腔周辺に特徴的なアデノシンの代謝経路を検索し、その代謝経路が睡眠調節にどのようにかわるかを検討した。

〔方法ならびに成績〕

方法

ノザンハイブリダイゼーション：ラット脳を視床下部、大脳皮質、小脳、視床、延髄、海馬、中脳、線条体、くも膜に解剖し、それぞれから抽出した全 RNA 10 μg に対して、アデノシンデアミナーゼ (ADA)、5'-ヌクレオチダーゼ (5'-NT)、S-アデノシルホモシステインヒドロゲナーゼ、アデノシンキナーゼの cDNA 断片を用いてハイブリダイゼーションを行った。

酵素活性測定：大脳皮質、前脳基底部、視床下部、くも膜のホモジネートを用い、0.5 mM アデノシン (ADA 活性) または 0.5 mM AMP (5'-NT 活性) を基質として Mg²⁺ 存在下で反応を行い、代謝産物を HPLC にて定量した。

免疫染色：ラット脳切片を ADA およびリボカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (LPGDS) に対する抗体とインキュベートし、その後それぞれに対する蛍光標識二次抗体を用いて染色した。

マイクロダイアリシス：ウレタン麻酔下でラット前脳基底部くも膜下腔へマイクロダイアリシスプローブを刺入し、人工脳脊髄液を灌流させて透析液を回収した。薬物の投与は術後 3 時間から開始した。透析液中のアデノシンおよびその代謝産物は HPLC にて定量した。

睡眠解析：ペントバルビタール麻酔下で薬液微量注入用のカニューレを前脳基底部くも膜下腔へ刺入し、さらに、脳波記録用電極を大脳皮質へ、筋電位記録用電極を頸部筋肉へ挿入した。回復後、睡眠解析プログラム SleepSign (キッセイコムテック株式会社) を用いて EEG/EMG 記録および睡眠解析を行った。1 日目を基礎睡眠量の測定とし、2 日目の消灯後 3 時間目から薬物の投与を行った。

結果

ノザンハイブリダイゼーション法および酵素活性測定により、アデノシンの合成にかかわる 5'-NT、および分解を担う ADA がくも膜に強く発現することを明らかになった。また、免疫組織染色により、ADA はくも膜のマーカー分子である LPGDS と共局在し、arachnoid barrier cell および arachnoid trabecular cell に優位に局在することがわかった。マイクロダイアリシス法により、前脳基底部くも膜下腔へアデノシン ($10\mu\text{M}$) を投与したところ、投与開始後 60 分で透析液中のイノシン濃度が 20.6 ± 6.9 から $238.7\pm 46.7\text{ nM}$ に増加した。このイノシン濃度の増加は、ADA 阻害薬であるコホルマイシン ($10\mu\text{M}$) との同時投与により 80% 以上抑えられた。また、 $10\mu\text{M}$ コホルマイシンの単独投与により、透析液中のアデノシン濃度は非投与群 ($5.6\pm 1.1\text{ nM}$) の 2.6 倍に増加した。さらに、コホルマイシン ($400\text{ pmol}/0.4\mu\text{l}/\text{min}$) を暗期 (活動期) に同部位へ連続微量注入すると、実験前日に比べて、投与後 2 時間目からノンレム睡眠が有意に増加し、投与後 5 時間目における増加量は約 30% となった。しかしながら、レム睡眠に対する効果は認められなかった。コホルマイシン投与時のノンレム睡眠をさらに詳しく解析したところ、ノンレム睡眠の出現回数は変化せず、各エピソードの平均持続時間が延長することにより、ノンレム睡眠の総量が増加したことが明らかになった。投与中のノンレム睡眠時における脳波のパワースペクトルを解析したところ、実験前日のノンレム睡眠時のパワースペクトルとほぼ一致しており、深い睡眠の指標であるデルタ波の割合のみが増加していることがわかった。

〔総括〕

以上の実験結果は、前脳基底部くも膜がくも膜下腔におけるアデノシンの代謝に重要な役割を果たし、特にノンレム睡眠の調節に深く関与することを示している。前脳基底部くも膜下腔でのアデノシン濃度増加に伴うノンレム睡眠の誘発は、LPGDS によって産生される睡眠物質プロスタグランジン D_2 の作用と非常に類似していることから、くも膜は睡眠物質の合成・分解に深く関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

この論文では、睡眠物質であるアデノシンの分解を担うアデノシンデアミナーゼがラット脳のくも膜、特に arachnoid barrier cells の細胞質に局在することを、生化学、免疫組織化学など、様々な手法によって明らかにした。さらに、ラット前脳基底部のくも膜下腔へ投与したアデノシンが、くも膜に局在するアデノシンデアミナーゼによってイノシンへ代謝されることを示し、脳脊髄液中のアデノシン濃度がくも膜細胞によって調節されることを強く示唆している。また、アデノシンデアミナーゼの阻害薬をくも膜下腔へ投与することにより、投与局所におけるアデノシン濃度の増加と同時に、睡眠が誘発されることを明らかとし、くも膜が高次脳機能を調節する可能性を示唆したという点で、学位の授与に値すると考えられる。