

学 位 論 文 題 名

Different expressions of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid and N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs between visceromotor and somatomotor neurons of the rat lumbosacral spinal cord.

(ラット腰仙髄の内臓性運動ニューロンと体性運動ニューロンにおける α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid 受容体と N-methyl-D-aspartate 受容体サブユニットメッセンジャー RNA の発現の相違に関する研究)

学位論文内容の要旨

1) はじめに

グルタミン酸は、哺乳類の中樞神経系における最も主要な神経伝達物質である。グルタミン酸受容体は大きくイオンチャンネル型と代謝型に分けられ、さらにイオンチャンネル型は、kainate型、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA型)、N-methyl-D-aspartate (NMDA型) 受容体の3つに大別される。AMPA受容体は、一価陽イオンを通過させ、主に速い興奮性のシナプス伝達を担う。一方、NMDA型受容体はカルシウムイオンに透過性を有し、リガンドの結合と膜電位によって支配されその活性化は強く長時間におよぶシナプス伝達の効率化を引き起こす。これは記憶や学習といった脳の高次機能に関与していると考えられている。これまでに分子生物学的にAMPA受容体にはGluRA-Dの4つのサブユニットが、NMDA型受容体にはNR1, 2A-2Dの5つのサブユニットが存在することが知られている。

さて電気生理学および薬理学的実験からグルタミン酸は脊髄排尿中枢における主要な神経伝達物質であると考えられている。すなわち、Matsumoto et al, Yoshiyama et al, などの実験で、ウレタン麻酔ラットの膀胱排尿筋の収縮および外尿道括約筋の活動電位は、いずれもAMPA受容体あるいはNMDA型受容体の拮抗薬の静脈内投与およびL6-S1レベルのくも膜下投与により抑制されることが明らかとなっている。一方、覚醒ラットでは膀胱排尿筋の収縮はこれらの受容体拮抗薬による抑制を受けないが、外尿道括約筋の活動電位は著明に抑制されることも明らかとなっている。これらの報告は、脊髄排尿中枢においてグルタミン酸が排尿に関する神経伝達に関与していること、およびグルタミン酸受容体拮抗剤に対する膀胱と尿道の反応が異なることを示している。

これまでに脊髄排尿中枢におけるグルタミン酸受容体の局在を形態学的に細胞レベルで検討した報告はない。膀胱を含む骨盤臓器および外尿道括約筋をそれぞれ支配する腰仙髄

中間外側核の副交感神経節前細胞（以下PGN）および腰仙髄前角細胞（以下Onuf）について、逆行性標識物質にて細胞同定とin situハイブリダイゼーション法による二重標識を行い、これらに発現しているAMPAおよびNMDA型グルタミン酸受容体を各サブユニットのmRNAを検索することで形態学的に明らかにしようと試みた。

2) 材料と方法

Wistar系ラットの骨盤神経節あるいは外尿道括約筋（各々n=4）に、蛍光性逆行性神経標識物質である Fast Blueを注入し上記細胞を標識後、L6からS1の脊髓を摘出し、10 μ m厚の薄切切片を作製し、各々の受容体サブユニットのmRNAに相補的な35S標識オリゴヌクレオチドプローブにてin situハイブリダイゼーション法を施行し、AMPA型受容体サブユニット（GluRA-D）およびNMDA型受容体サブユニット（NMDAR1, NMDAR2A-2D）の各mRNAを各標識神経細胞上に検出した。

3) 結果

脊髓排尿中枢においてvisceromotor neuronであるPGNとsomatomotor neuronであるOnufでは、AMPA、NMDA受容体ともにサブユニット構成に大きな違いが認められた。すなわちAMPA受容体サブユニットについては、PGNにおいて、GluRAおよびGluRBサブユニットが強く発現しており、GluRCおよびGluRDサブユニットの発現レベルは低かった。一方、OnufではGluRAおよびGluRBサブユニットの他に、GluRCおよびGluRDサブユニットの発現がより強く認められた。NMDA型受容体については、PGNにおいてNR1サブユニットが強く発現していたが他のNR2サブユニットは極めて発現が弱かった。Onufにおいては、NR1サブユニットの他にNR2AおよびNR2Bサブユニットの発現が認められた。

4) 考察

以上より脊髓排尿中枢における膀胱、尿道を支配するPGNとOnufでは、そのグルタミン酸受容体のサブユニット構成に大きな違いがあることが明らかになった。特にNMDA型受容体においては、NR1サブユニットは、いずれかのNR2サブユニットとヘテロメリックチャンネルを作って活性型のNMDA型受容体になる事実が判明しているが、Onufに比較するとPGN自体のNMDA受容体チャンネル活性は極めて低いものと考えられた。これはグルタミン酸受容体拮抗薬に対して薬理学的に膀胱と尿道の反応が異なるというこれまでの報告の重要な裏付けのひとつであると考えられた。今後、サブタイプ別のグルタミン酸受容体拮抗薬の開発が進むと思われるが、それらを排尿障害の治療として臨床応用してゆく場合、本研究はその作用機序を解析する上で、重要な形態学な証左となると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 井 上 芳 郎
副 査 教 授 小 柳 知 彦

学 位 論 文 題 名

Different expressions of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid and N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs between visceromotor and somatomotor neurons of the rat lumbosacral spinal cord.

(ラット腰仙髄の内臓性運動ニューロンと体性運動ニューロンにおける α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid 受容体と N-methyl-D-aspartate 受容体サブユニットメッセンジャー RNA の発現の相違に関する研究)

グルタミン酸は、哺乳類の中枢神経系における最も主要な神経伝達物質である。グルタミン酸受容体は大きくイオンチャンネル型と代謝型に分けられ、さらにイオンチャンネル型は、kainate型、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA型)、N-methyl-D-aspartate (NMDA型) 受容体の3つに大別される。AMPA受容体は、一価陽イオンを通過させ、主に速い興奮性のシナプス伝達を担う。一方、NMDA型受容体はカルシウムイオンに透過性を有し、リガンドの結合と膜電位によって支配されその活性化は強く長時間におよぶシナプス伝達の効率化を引き起こす。これは記憶や学習といった脳の高次機能に関与していると考えられている。これまでに分子生物学的にAMPA受容体にはGluRA-Dの4つのサブユニットが、NMDA型受容体にはNR1, 2A-2Dの5つのサブユニットが存在することが知られている。

さて電気生理学的および薬理学的実験からグルタミン酸は脊髄排尿中枢における主要な神経伝達物質であると考えられている。すなわち、実験的に、麻酔ラットの膀胱排尿筋の収縮および外尿道括約筋の活動電位は、いずれもAMPA受容体あるいはNMDA型受容体の拮抗薬の投与により抑制されることが明らかとなっている。一方、覚醒ラットでは膀胱排尿筋の収縮はこれらの受容体拮抗薬による抑制を受けないが、外尿道括約筋の活動電位は著明に抑制されることも明らかとなっている。これらの報告は、脊髄排尿中枢においてグルタミン酸が排尿に関する神経伝達に関与していること、およびグルタミン酸受容体拮抗剤に対する膀胱と尿道の反応が異なることを示している。

これまでに脊髄排尿中枢におけるグルタミン酸受容体の局在を形態学的に細胞レベルで検討した報告はない。膀胱を含む骨盤臓器および外尿道括約筋をそれぞれ支配する腰仙髄中間外側核の副交感神経節前細胞（以下PGN）および腰仙髄前角細胞（以下Onuf）について、逆行性標識物質にて細胞同定とin situハイブリダイゼーション法による二重標識を行い、これらに発現しているAMPAおよびNMDA型グルタミン酸受容体を各サブユニットのmRNAを検索することで形態学的に明らかにしようと試みた。

Wistar系ラットの骨盤神経節あるいは外尿道括約筋（各々n=4）に、蛍光性逆行性神経標識物質であるFast Blueを注入し上記細胞を標識後、L6からS1の脊髄を摘出し、10 μ m厚の薄切切片を作製し、各々の受容体サブユニットのmRNAに相補的な35S標識オリゴヌクレオチドプローブにてin situハイブリダイゼーション法を施行し、AMPA型受容体サブユニット（GluRA-D）およびNMDA型受容体サブユニット（NMDAR1, NMDAR2A-2D）の各mRNAを各標識神経細胞上に検出した。

脊髄排尿中枢においてvisceromotor neuronであるPGNとsomatomotor neuronであるOnufでは、AMPA、NMDA受容体ともにサブユニット構成に大きな違いが認められた。すなわちAMPA受容体サブユニットについては、PGNにおいて、GluRAおよびGluRBサブユニットが強く発現しており、GluRCおよびGluRDサブユニットの発現レベルは低かった。一方、OnufではGluRAおよびGluRBサブユニットの他に、GluRCおよびGluRDサブユニットの発現がより強く認められた。NMDA型受容体については、PGNにおいてNR1サブユニットが強く発現していたが他のNR2サブユニットは極めて発現が弱かった。Onufにおいては、NR1サブユニットの他にNR2AおよびNR2Bサブユニットの発現が認められた。

以上より脊髄排尿中枢における膀胱、尿道を支配するPGNとOnufでは、そのグルタミン酸受容体のサブユニット構成に大きな違いがあることが明らかになった。特にNMDA型受容体においては、NR1サブユニットは、いずれかのNR2サブユニットとヘテロメリックチャンネルを作って活性型のNMDA型受容体になる事実が判明しているが、Onufに比較するとPGN自体のNMDA受容体チャンネル活性は極めて低いものと考えられた。これはグルタミン酸受容体拮抗薬に対して薬理学的に膀胱と尿道の反応が異なるというこれまでの報告の重要な裏付けのひとつであると考えられた。今後、サブタイプ別のグルタミン酸受容体拮抗薬の開発が進むと思われるが、それらを排尿障害の治療として臨床応用してゆく場合、本研究はその作用機序を解析する上で、重要な形態学な証左となると考えられた。

さらに排尿神経機構におけるNMDA型受容体の神経可塑性という特徴から、排尿神経機構の発達や脊髄損傷などの排尿異常の病態解明に大きく寄与する研究と思われた。

発表終了後、主査および副査の4教授より、実験方法の基礎的事項に対する質問から、排尿神経系の発生、成熟にいたる神経機構におけるグルタミン酸受容体の意義、また臨床的な排尿異常におけるグルタミン酸受容体の意義に至るまでの広範囲の質問があり、これに対し申請者は、実験により得られた多くの経験と、豊富な文献的知識から、これらの質問に対して妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの排尿神経機構におけるグルタミン酸受容体の関与に関する形態学的研究についての成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。