



Dopamine D2 Receptor mRNA Level in Rat Striatum after Chronic Haloperidol Treatment

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松永, 勉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/966

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 1 1 3 号	学位授与年月日	平成 3 年 3 月 2 6 日
氏 名	松 永 勉		
論文題目	Dopamine D2 Receptor mRNA Level in Rat Striatum after Chronic Haloperidol Treatment (ハロペリドール慢性投与後のラット線条体におけるドーパミン D2 受容体 mRNA 量の検討)		

Dopamine D2 Receptor mRNA Level in Rat Striatum after Chronic Haloperidol Treatment
(ハロペリドール慢性投与後のラット線条体におけるドーパミンD2受容体mRNA量の検討)

論文の内容の要旨

D2受容体アンタゴニストで、抗精神病薬として使用されているハロペリドールの慢性投与によって、ラットの線条体内のD2受容体は増加する。しかしその際の同部位におけるD2受容体mRNA量に関しては、増加するという報告と不変という報告があり、一致をみていない。後者の報告ではRNAをノザンプロット法等を用いて測定しており、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いている前者よりもやや信頼性が高いと考えられるが、最終投与24時間後の一点しかみていない点で疑問が残る（前者ではこの時間を特定化していない）。なぜなら、ラット下垂体において最終投与2時間後にD2受容体mRNAが増加していたという報告があり、線条体においてもこのような早期の反応が存在する可能性があるからである。またこれらの報告ではごく最近クローニングされたD2受容体の二種類のisoform (D2A, D2B) を区別していない。そこで本実験では、ハロペリドール慢性投与後の時間経過を考慮し、また二つのisoformの共通部分に対するプローブに加えて、D2Aに特異的なプローブを使用してノザンプロット法によりD2受容体mRNA量の検討をおこなった。

SD系雄性6週令ラットに、ハロペリドール5 mg/kg/dayを2週間1日1回皮下投与した。最終投与後3時間、9時間、24時間経過した時点で線条体を摘出し、Chomczynski & Sacchiの方法によってRNAを抽出した。プローブは、4種類の合成オリゴヌクレオチドプローブを用意した。プローブA, BはD2A, D2Bに共通な部分と相補的（60塩基）、プローブCはD2Aに特異的な挿入領域と相補的（24塩基）、プローブDは内部スタンダードとして用いたβアクチンmRNAと特異的に結合するプローブ（27塩基）で、³²P-dATPでエンドラベルした。プローブA, Bを混合したものに対しては、プレハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、4 x SSPE、250 μg/ml イーストtRNA、500 μg/ml サケ精巣DNA、0.1% SDSの緩衝液中で37℃、18時間、ハイブリダイゼーションは同じ緩衝液に1-2 x 10⁷ c. p. m. /mlのプローブを加え、37℃、20時間おこなった後、1 x SSPE、0.1% SDS中で56℃、20分間、4回洗浄した。プローブCおよびプローブDに対しては、23%ホルムアミドを含む緩衝液中で39℃でインキュベートし、洗浄を43℃でおこなったほかは、条件は上記と同様である。えられたオートラジオグラムはデンストメーターで定量化したが、すべてβアクチンmRNAのレベルとの比をもとめ、定量的な検討はこの比を用いておこなった。

その結果、ハロペリドール慢性投与後、3、9、24時間経過したいずれの時点においても、実験群のD2およびD2A受容体mRNAレベルは、対照群と比較して有意差はなかった。本実験結果から、ハロペリドール慢性投与後のD2受容体mRNA量は不変であり、同遺伝子の活性化はおこらないことが示唆された。このことは他の誘因によるD2受容体増加の機序とは異なっているようであり、興味深い。また、二つのisoformができるプロセスと考えられているオルタナティブスプライシングに対しては、このような薬物投与が影響をおよぼさなかったことを本実験結果は示唆した。

論文審査の結果の要旨

ドーパミン (DA) と特異的に結合してその信号情報を細胞内へ伝達するDA受容体はD1受容体とD2受容体に大別される。最近、精神分裂病に関連して注目されているD2受容体のcDNAがクローン化され、D2受容体遺伝子からD2A、D2Bという二種類のD2受容体イソ型蛋白質のmRNAが二者択一スプライシングにより生成されることが明らかにされた。D2A mRNAは第三細胞内ループと推定される領域に29個のアミノ酸残基に対応する挿入塩基配列を持つ。

抗精神病薬として使用されているD2受容体拮抗薬のハロペリドールの慢性投与によりラット線条体のD2受容体が増加することが知られている。しかし、その際の同部位におけるD2受容体mRNA量に関しては、増加するという報告と不変という報告があり、一致をみていない。また、これらの報告ではD2AとD2Bにそれぞれ

対応するmRNAを区別して測定していない。

そこで申請者は、D2AとD2BのmRNAに共通な部分に相補的な60塩基合成オリゴヌクレオチドとD2A mRNAに特異的な挿入領域と相補的な24塩基合成オリゴヌクレオチドをプローブとするRNAプロット解析により、ハロペリドール慢性投与ラット線条体のD2受容体mRNA量を測定した。D2B-mRNA量の変動は、上記二種類のプローブによる測定値の変動の差から推定しようとした。 β -アクチンmRNAはハロペリドールにより変動しないとされているので、常に対照としてその量を測定し、D2-mRNAについての測定値を β -アクチンmRNA量との比として表示した。ハロペリドール慢性投与ラットは1日量5 mg/kgの同薬剤を2週間にわたって皮下に投与することにより作成し、最終投与後3時間、9時間、24時間の時点で摘出した線条体からRNAを抽出した。

実験の結果、ハロペリドール慢性投与後3、9、24時間のいずれの時点においても実験群のD2およびD2A受容体mRNA量と、対照として溶剤のみを投与した群のそれとの間に有意差はなかった。そこで申請者は、ハロペリドール慢性投与によるラット線条体D2受容体の増加は、mRNAの増加に基づく生合成の促進によるものではなく、受容体蛋白質の代謝回転速度全体の遅延等他の要因によるものではないかと推論した。また、D2AとD2Bの両方のmRNAを検出するプローブによる測定値、D2A-mRNAを特異的に検出するプローブによる測定値が共に有意に変化しなかったことから、ハロペリドール慢性投与はD2受容体遺伝子転写産物の二者択一スプライシングにも影響を及ぼさないと推定された。

論文審査会では、以上の内容の申請者の発表と関連して以下の質問がなされた。

- (1) クローン化したcDNAの解析から存在が推定されたD2受容体イソ型蛋白質D2AとD2Bは実際に受容体蛋白質として存在するのか。
- (2) mRNAから推定されるD2AとD2Bの組織分布および実際に蛋白質として検出されるD2AとD2Bの組織分布
- (3) D2受容体遺伝子の構造、特にD2AとD2Bにそれぞれ対応するmRNAの生成をもたらす二者択一スプライシングのスプライス部位の構造、およびエキソン-イントロン構造について
- (4) RNAプロット解析によるmRNA定量の精度、正確さ等について
- (5) 適当なアンチセンスRNAプローブを調整することにより、D2A-mRNA、D2B-mRNAをそれぞれサイズの異なるRNase A、T1に対する防護バンドとして検出あるいは測定することは、この場合には不可能だったのか。
- (6) ハロペリドール慢性投与ラットの最終投与後3時間、9時間、24時間において線条体を摘出し、D2-mRNAを測定している。ということは、ハロペリドール慢性投与ラットでは常時D2-mRNAレベルが上昇しているのではなくて、たとえばハロペリドールに対する感受性が上昇していて、毎日同薬剤の投与の度にD2-mRNAが増加を繰り返すという可能性を考えたのか。
- (7) ハロペリドール慢性投与で線条体のD2受容体が増加するというのは確か。またそれは、D2拮抗薬等の結合のB_{max}だけからいっているのか、それとも他の証拠もあるのか。
- (8) in situ でのハイブリッド形成法により、ハロペリドール慢性投与ラットの線条体でD2-mRNAの増加が認められると報告されているということであるが、今回の実験との違いは何に由来すると考えているのか。

以上の質問に対する申請者の回答は概ね適切であった。総合的に審議の結果、審査委員会は本論文が医学博士の学位授与に値する内容を備えていると、全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市	山	新		
	副査	教授	中	島	光 好	副査	教授 藤 井 喜一郎
	副査	助教授	太	田	英 彦	副査	助教授 宮 里 勝 政