



Increase of GAP-43 expression following kainic acid injection into whisker barrel cortex

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 貴道 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/323

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	医博論第 4 2 2 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 9 日
氏 名	山 本 貴 道		
論文題目	Increase of GAP-43 expression following kainic acid injection into whisker barrel cortex (ウイスキー・バレル皮質へのカイニン酸注入後の GAP-43 発現の増強)		

博士(医学) 山 本 貴 道

論文題目

Increase of GAP-43 expression following kainic acid injection into whisker barrel cortex

(ウイスキー・バレル皮質へのカイニン酸注入後のGAP-43発現の増強)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ラットのバレル皮質(barrel cortex)を利用した大脳皮質可塑性の研究は従来、末梢からの知覚を遮断することで行われてきた。即ち生後7日に至る前であれば、頬髯を切ったり、抜いたり、または毛根を処理することで、バレル皮質の著明な再構築を見ることができる。生後7日以後では同じ処理を行ってもバレル皮質に形態的な変化は見られなくなるが、電気生理学的またはオートラジオグラフィーなど機能的な面では可塑性が認められる。

成長関連蛋白(GAP)-43は神経系特有のリン酸蛋白で、成人においても可塑性の見られる前シナプス終末の主要な要素となっており、神経細胞外のシグナルに反応する軸索の成長をコントロールしている。

カイニン酸はグルタミン酸類似の物質であり、神経細胞を選択的に破壊するのに使用されてきた。我々は成熟ラットのウイスキー・バレル皮質にカイニン酸を微量注入することによって大脳皮質可塑性研究の動物モデルを開発した。カイニン酸注入に続いてGAP-43の免疫組織染色を行い、明らかな大脳皮質の可塑性を証明できた。

〔材料ならびに方法〕

成熟ラット(Sprague-Dawley rat)を使用した。エンフルレン吸入にて全身麻酔され、頭蓋骨を薄く削った後に内因性信号の光学的イメージングを利用してウイスキー・バレル皮質を詳しく調べた。カイニン酸を注入すべきバレルの一つを選択し、頭蓋骨には小孔が開けられ、そこからシリンジを入れていく。0.1 μ lの生理的食塩水に0.125 μ gのカイニン酸を溶解したものを26ゲージの針をつけたハミルトン・シリンジで注入した。ラットは創部を縫合された後、箱に戻された。カイニン酸注入後2日後、3日後、1週間後、6週間後に過量のペントバルビタールでラットを処置した。生理的食塩水0.5 μ lを注入したラットと針の刺入のみ行ったラットをコントロールとした。

固定は経心臓的にまず低温の生理的食塩水を流し、次いで4%のパラホルムアルデヒドで灌流した。脳は全体を一塊にして摘出し、1～2時間同じ灌流液で固定した。続けて30%ショ糖に4℃で一晩冷凍保存された。できるだけバレル皮質全体が見えるように、クリオトームの歯とバレル皮質が平行となるよう40 μ mの厚さで切片を作成した。

それら切片は抗GAP-43モノクローナル抗体の希釈された溶液の中で、4℃で一晩インキュベートされた。使用した抗体(2G12/C7)は著者の一人(Karina F. Meiri)によって開発されたものであり、リン酸化された活性型GAP-43とのみ反応する。続けて免疫組織染色を行った。

〔結果〕

カイニン酸による病変は4匹のラットに作成され、コントロールとして2匹を使用した。カイニン酸

を注入されたウイスキー・バレル皮質ではGAP-43の増強が示された。

注入後2日目・3日目で既に早期の弱い反応が観察された。1週間後にはより明らかな反応が見られ、6週間後には更にその発現は増強していた。GAP-43はカイニン酸を注入されたバレルとそれに隣接する周囲のバレル、及びバレル間の隔壁に広がっていた。コントロールの生理的食塩水注入と針のみ刺入した例ではGAP-43に明らかな変化は見られなかった。

〔考察〕

GAP-43の脳内レベルはシナプス形成が安定した段階で急激に減少すると考えられているが、脳内のある部分では生物の一生を通して高レベルのGAP-43が存在する。GAP-43はシナプス形成、また成人の神経系では軸索の発芽・大脳皮質可塑性と関連している。我々の実験結果から損傷を受けた成熟ラットのバレル皮質にはGAP-43発現による神経細胞の成長を惹起させる能力が存在することが示された。

我々はバレル皮質の病変作成にカイニン酸を使用した。カイニン酸は神経細胞を壊死させ微小な病変作成に有効であった。0.125 μ gのカイニン酸により1個のバレルが破壊されることが示された。バレルが破壊されて消失すると周囲のバレルやバレル間の隔壁への抑制がなくなり、その結果高レベルのリン酸化されたGAP-43を含む軸索が発芽してくるのであろうと推測される。そしてその変化は脳が損傷されて2日後には始まっている。

〔結論〕

カイニン酸注入と活性型GAP-43の免疫染色を用いて新しい大脳皮質損傷モデルを開発した。脳内への微量のカイニン酸注入は成熟ラットのウイスキー・バレル皮質において活性型GAP-43を増強させた。このモデルは作成しやすくかつ信頼性があり、大脳皮質可塑性の研究における理想的な手段になるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ラットのバレル皮質(barrel cortex)を利用した大脳皮質可塑性の研究は、従来、末梢からの知覚を遮断することで行われてきた。即ち生後7日に至る前であれば、頬髯を切ったり、抜いたり、または毛根を処理することで、バレル皮質の著明な再構築を見ることができる。しかし、成熟ラットにおけるバレル皮質の一次的損傷後に起こるバレル皮質の可塑性を研究するためのモデルはこれまで存在しなかった。そこで、申請者はカイニン酸が神経細胞を選択的に破壊することに着目し、成熟ラットのウイスキー・バレル皮質にカイニン酸を微量注入することによって大脳皮質の可塑性を誘導することを試みた。本研究では、カイニン酸注入に続いてGAP-43の免疫組織染色を行うことによって、大脳皮質の可塑性を確認し、大脳皮質可塑性研究に有用な動物モデルを開発した。

成熟ラット(Sprague-Dawley rat)に対して、エンフルレン吸入にて全身麻酔し、頭蓋骨を薄く削った後に内因性信号の光学的イメージングを利用してウイスキー・バレル皮質を詳しく調べた。カイニン酸を注入すべきバレルの一つを選択し、頭蓋骨に小孔を開け、そこからシリンジを刺入した。0.1 μ lの生理的食塩水に0.125 μ gのカイニン酸を溶解したものを26ゲージの針をつけたハミルトン・シリンジで注入した。ラットは創部を縫合した後、箱に戻した。カイニン酸注入後2日後、3日後、1週間後、6週間後に、過量のペントバルビタールでラットを処置した。生理的食塩水0.5 μ lを注入したラットと針の刺入のみ行っ

たラットをコントロールとした。4%のパラホルムアルデヒドで灌流固定した後、脳を摘出し、1～2時間同じ灌流液で固定した。続いて30%ショ糖に4℃で一晩冷所保存した。できるだけバレル皮質全体が見えるように、クリオトームの歯とバレル皮質が平行となるよう40 μ mの厚さで切片を作成した。それらの切片は抗GAP-43モノクローナル抗体の希釈された溶液の中で、4℃で一晩インキュベートした。使用した抗体(2G12/C7)はリン酸化された活性型GAP-43とのみ反応するものである。続けて免疫組織染色を行った。

カイニン酸を注入したウイスキー・バレル皮質ではGAP-43の増強が示された。注入後2日目・3日目で既に早期の弱い反応が観察された。1週間後にはより明らかな反応が見られ、6週間後には更にその発現は増強していた。GAP-43はカイニン酸を注入されたバレルとそれに隣接する周囲のバレル、及びバレル間の隔壁に広がっていた。コントロールの生理的食塩水注入と針のみ刺入した例ではGAP-43に明らかな変化は見られなかった。

GAP-43はシナプス形成、軸索の発芽、大脳皮質可塑性等と関連していると考えられている。従って、損傷を受けた成熟ラットのバレル皮質におけるGAP-43発現増強は、この領域に神経細胞の成長を惹起させる能力が存在することを強く示唆するものである。また、申請者はバレル皮質の病変作成にカイニン酸を使用した。0.125 μ gのカイニン酸により1個のバレルが破壊されることが明らかにされた。バレルが破壊されて消失すると周囲のバレルやバレル間の隔壁への何等かの抑制がなくなり、その結果高レベルのリン酸化されたGAP-43を含む軸索が発芽してくるのであろうと推測された。

審査委員会では、カイニン酸注入と活性型GAP-43の免疫染色を用いて新しい大脳皮質損傷モデルを開発した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) cytochrome c oxidaseの細胞内局在について
- 2) GAP-43のリン酸化について
- 3) カイニン酸受容体について
- 4) グルタミン酸による細胞死の機序について
- 5) この研究の臨床的意義について
- 6) シナプスレベルで何が起きているのか

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	佐藤 康 二	
	副査	福田 敦 夫	副査 山 本 清 二