HamaMed-Repository

浜松医科大学学術機関リポジトリ

浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Insertion of α7 nicotinic receptors at neocortical layer V GABAergic synapses is induced by a benzodiazepine, midazolam

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, 純偉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/329

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　４７２号	学位授与年月日	平成１８年　６月１７日
氏　　名	山　本　純　偉		
論文題目	Insertion of α7 nicotinic receptors at neocortical layer V GABAergic synapses is induced by a benzodiazepine, midazolam (ベンゾジアゼピンのミダゾラムによる大脳皮質第 V 層の GABA 作動性シナプスにおけるα7 ニコチン受容体の誘導)		

博士(医学)　　山　本　純　偉

論文題目

Insertion of α7 nicotinic receptors at neocortical layer V GABAergic synapses is induced by a benzodiazepine, midazolam

(ベンゾジアゼピンのミダゾラムによる大脳皮質第V層のGABA作動性シナプスにおけるα7ニコチン受容体の誘導)

論　文　の　内　容　の　要　旨

〔はじめに〕

ベンゾジアゼピンはシナプス後膜$GABA_A$受容体に作用し、GABAの親和性を上げGABA作動性抑制性シナプス伝達を増強することで鎮静作用をもたらしていると考えられている。しかしながらその詳細なメカニズムは未だに明らかになっていない。ベンゾジアゼピン系静脈麻酔薬ミダゾラムは他のベンゾジアゼピン系薬物にはみられない以下のような特徴を持っている。すなわち、脳波所見上も比較的覚醒のパターンを示すこと、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の投与により効果の一部がリバースされること等である。中枢神経系においてα7ニコチン性アセチルコリン(nACh)受容体が主にシナプス前に存在し、神経伝達物質の遊離を調節していることから、ミダゾラムがシナプス前 α7 nACh 受容体に関与しているのではないかと考え以下の実験を行った。

〔材料ならびに方法〕

生後約 2 週のラットの脳スライス標本を作成し、大脳皮質体性感覚野の錐体細胞にホールセルパッチクランプを行いミダゾラムのシナプス前作用を調べた。人工脳脊髄液にはテトロドトキシンとグルタメート受容体拮抗薬を加え灌流し、微小シナプス後電流(mIPSC)を記録した。また、顕微鏡下で大脳皮質第V層のスライス標本表面でガラス管を振動させニューロンを機械的に急性単離した。これら錐体細胞表面の α7 nAChr受容体を蛍光色素でラベルし、共焦点顕微鏡で観察を行った。

[結果]

大脳皮質第V層ではミダゾラム1 μMの灌流投与によりmIPSCの頻度が増加した。しかし、他のベンゾジアゼピン系薬物ではmIPSCの頻度は増加しなかった。ミダゾラムによる増加作用はベンゾジアゼピンの拮抗薬の投与によっても抑制されなかったことからシナプス前の$GABA_A$受容体以外を介した機序であることが示唆された。ミダゾラムによるmIPSC頻度増加作用はα7 nAChr受容体阻害剤methyllycaconitineにより抑えられた。しかし、ニコチン単独ではmIPSCの頻度は増加しなかったことから、ミダゾラムによりα7 nAChr受容体が細胞膜へ誘導され、内因性アセチルコリンによりGABAの放出頻度が増加したのではないかと考えた。それを確かめるため、機械的に急性単離した錐体細胞にα7 nAChr受容体に特異的に結合する蛍光色素でラベルしたAlexa488 αブンガロトキシンを用いて調べた。その結果、ミダゾラムにより有意に細胞表面の α7 nAChr受容体が増加するのが観察された。また、シナプス終末に特異的に取り込まれる色素FM1-43で共染色したところその増加した α7 nAChr受容体の多くがシナプス終末に存在することが推測された。また、ミダゾラムによるmIPSCの頻度増加作用はPKC阻害薬によって抑制され、機械的に急性単離した細胞を用いた実験でもα7 nAChr受容体増加がPKC阻害薬によって抑えられたことから、

α7 nAChr受容体の誘導にはPKCが関与していることが示唆された。また、更にミダゾラムによるこの作用はGlutamate作動性神経や大脳皮質の他の層のGABA作動性神経では認められず、GABAニューロンのシナプス後nAChr受容体にも作用しなかったことから、大脳皮質第V層のGABA作動性神経のシナプス終末に特異的に見られる現象であることが明らかになった。

〔考察〕

ミダゾラムに特異的なアセチルコリン受容体との関係が今回初めて明らかになった。その作用は第V層の錐体細胞に入力するGABA作動性神経のシナプス前終末に特異的であったが、他の層にはα7 nAChr受容体がない可能性や、存在したとしても局在部位による何らかの調節系の違いが存在するのかもしれない。これまで錐体細胞に入力するGABA作動性神経終末にα7 nAChr受容体があるという報告はなかったが、α7 nAChr受容体が通常は完全に細胞膜に出た状態ではなかったことが今回の結果から考えられた。睡眠-覚醒のサイクルにアセチルコリンが重要であることが知られており、GABA作動性介在神経にあるnAChr受容体が脳波の活動にも影響を与えている。今回の結果からミダゾラムが大脳皮質第V層のGABA作動性神経終末でnAChr受容体を誘導することでこのサイクルに関与していることも示唆される。α7 nAChr受容体の細胞膜への移動のメカニズムにPKCが関っていることが明らかになったが、ミダゾラムがPKCを活性化する経路やPKCのリン酸化標的分子に関しては更なる研究が必要である。

〔結論〕

ミダゾラムは大脳皮質第V層のGABA作動性シナプス前終末においてα7 nAChr受容体の膜移行を誘導することによりGABAの放出頻度を増加させた。これはミダゾラムの鎮静作用に関する新しい機序の発見にとどまらず、GABA-コリン系を介した睡眠-覚醒サイクルを含む大脳皮質回路機能発現への全く新しいメカニズムの提案である。

論文審査の結果の要旨

ベンゾジアゼピン（BZ）はシナプス後膜$GABA_A$受容体に作用し、GABAの親和性を上げGABA作動性抑制性シナプス伝達を増強することで鎮静作用をもたらすとされているが、詳細なメカニズムは明らかでない。BZ系のミダゾラムは、脳波所見上も比較的覚醒のパターンを示し、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の投与で効果が一部リバースされる特徴を有する。申請者は中枢神経系のα7ニコチン性アセチルコリン（nACh）受容体が主にシナプス前に存在することから、ミダゾラムはシナプス前nAChに関与しているのではないかと考え、以下の実験を行った。

ラットの脳スライス標本を作成し、大脳皮質体性感覚野の錐体細胞にホールセルパッチクランプを行いミダゾラムのシナプス前作用を調べた。人工脳脊髄液にはテトロドトキシンとグルタメート受容体拮抗薬を加え灌流し、微小シナプス後電流（mIPSC）を記録した。また、顕微鏡下で大脳皮質第V層のスライス標本を機械的に急性単離した。これら錐体細胞表面のα7nAChr受容体を蛍光色素でラベルし、共焦点顕微鏡で観察を行った。

結果は大脳皮質第V層ではミダゾラム1μMの灌流投与でmIPSCの頻度が増加したが、他のBZ系薬物では増加しなかった。増加作用はBZ拮抗薬の投与でも抑制されなかったことからシナプス前の$GABA_A$受容体以外を介した機序であることが示唆された。ミダゾラムのmIPSC頻度増加作用はα7 nAChr受容体阻害剤

で抑えられたが、ニコチン単独ではmIPSCの頻度は増加しなかったことから、申請者はミダゾラムによりα7nACh受容体が細胞膜へ誘導され、内因性AChによりGABAの放出頻度が増加したのではないかと考えた。検証のためにα7 nACh受容体に特異的に結合するAlexa488 ブンガロトキシンを用いて調べたところ、ミダゾラムで有意に細胞表面のα7 nACh受容体が増加することが観察された。また、シナプス終末に特異的に取り込まれる色素FM1-43を用いて調べたところ、α7 nACh受容体の多くがシナプス終末に存在することが観察された。また、ミダゾラムによるmIPSCの頻度増加作用はPKC阻害薬によって抑制されたことから、この受容体の誘導にはPKCが関与しているとした。ミダゾラムによるこの作用はグルタメート作動性神経や大脳皮質の他の層のGABA作動性神経では認められず、GABAニューロンのシナプス後nACh受容体にも作用しなかったことから、大脳皮質第V層のGABA作動性神経のシナプス終末に特異的に見られる現象であることを明らかにした。

このようにミダゾラムに特異的なACh受容体の存在が明らかになった。ミダゾラムの作用は第V層の錐体細胞に入力するGABA作動性神経のシナプス前終末に特異的であった。α7 nACh受容体が通常は完全に細胞膜に出た状態ではないことがこれまでの報告との違いであると申請者は考察した。睡眠-覚醒のサイクルにAChが重要であるが、今回の結果からミダゾラムがα7 nACh受容体を誘導し、このサイクルに関与していることも示唆された。α7 nACh受容体が細胞膜へ移行するメカニズムにPKCの関与が判明したが、PKC活性化の経路やPKCのリン酸化標的分子に関しては更なる研究が必要であると考察した。

以上から申請者は、ミダゾラムはGABA作動性シナプス前終末においてα7 nACh受容体の膜移行を誘導し、GABAの放出頻度を増加させるとし、ミダゾラムの鎮静作用の機序の発見にとどまらず、GABA-コリン系を介した睡眠-覚醒サイクルへの新しいメカニズムの提案でもあると結論した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

1）ミタゾラムはケタミンのように解離性麻酔作用を持つのか
2）抗Ch-E阻害薬投与でミタゾラムの効果が増強されるのか
3）ムスカリン作用に関してはどんな関与をするのか
4）ミタゾラムの効果は数分で出現、α7 nACh受容体も短時間で誘導されるのか
5）α7 nACh受容体が細胞膜に誘導されるメカニズムはどのようなものか
6）phorbol 12,13-dibutyrateの結果はミダゾラムの効果が有意であることを示しているか
7）ミダゾラムのみが作用する$GABA_A$受容体が存在し、同時に細胞内Cl^-濃度が高いため、GABAの放出に伴ってシナプス終末が脱分極するという可能性はないか
8）フルマゼニル投与でミダゾラムのmIPSCの振幅はどう変化したか

これらの質問に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　佐藤重仁
副査　寺川進　副査　中原大一郎