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

Region-specific effects of Scrapper on the abundance of glutamate and gamma-aminobutyric acid in the mouse brain

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2021-04-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 衛藤, 史博 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003825

博士（医学）　衞藤　史博
論文題目
Region-specific effects of Scrapper on the abundance of glutamate and gamma-aminobutyric acid in the mouse brain
（マウス脳におけるグルタミン酸及び γ-アミノ酪酸量に対する Scrapper の領域特異的な効果）

論文の内容の要旨
［はじめに］
神経細胞は興奮性や抑制性のシナプス伝達を介して互いに通信し、脳内で複雑なネットワークを形成する。グルタミン酸や γ−アミノ酪酸(GABA)のような神経伝達物質は脳機能に密接に関与し、神経伝達の異常はさまざまな中枢神経疾患を引き起こす。脳は解剖学的に特徴的なさまざまな領域で構成されており、プロトン核磁気共鳴分光法を用いた報告では、統合失調症や強迫性障害患者の脳内における前帯状皮質でグルタミン−グルタミン酸量の増加が観察される。しかし、これらの脳領域で神経伝達物質量の増加の根底にあるメカニズムはわかっていない。
神経細胞に発現するユビキチンリガーゼである Scrapper は、Rab3-interacting molecule1 (RIM1)に結合して分解を調節する。RIM1 はシナプス前終末のアクティブゾーンで Munc13 に結合して、神経伝達物質の放出を制御する。*Scrapper* 欠損 (SCR-KO) マウスの脳において RIM1 は増加している。以前の生理学的研究において、Scrapper の欠損は海馬 CA1 及び前帯状皮質において微小興奮性シナプス後電流 (EPSC)の頻度を促進させ、前帯状皮質では自発及び誘発性 EPSCs の減衰時間を延長させることが示されている。さらに行動試験において、ヘテロ接合体の SCR-KO マウスは恐怖記憶や社会的行動の異常を示す。
Scrapper はウエスタンブロッティングによる検討では脳全体に一様な発現を示す一方で、組織学的観察において *Scrapper* mRNA 及びタンパク質は海馬、小脳や嗅球などの比較的神経細胞が高密度に存在する領域に高発現を示す。SCR-KO マウスの海馬や大脳皮質領域では興奮性グルタミン酸作動性伝達が増強されているが、Scrapper が脳全体のグルタミン酸量にどのような影響を与えるのか、その詳細は不明である。本研究では、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量顕微鏡法 (MALDI-IMS)を用いて、脳の各領域における Scrapper のグルタミン酸や GABA 量に対する影響を調べた。
［材料ならびに方法］
本実験では 8-16 週齢の SCR-KO マウス及び野生型 (WT)マウスを使用した。本実験は浜松医科大学の動物実験委員会のガイドラインに従い、動物実験委員会の承認 (2017003) および遺伝子組換え実験安全委員会の承認 (28-16)を得て実

施した。MALDI-IMS では、脳切片上で 2,4-diphenyl-pyranylium tetrafluoroborate (DPP-TFB)を用いてグルタミン酸及び GABA を誘導体化した。マトリックスとして2,5-dihydroxybenzoic acidを塗布し、誘導体化されたグルタミン酸及びGABAをフーリエ変換型イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置で検出、可視化した。LC-MS/MS では、脳のグルタミン酸及び GABA を Acquity UPLC システム、4000 QTRAP リニアイオントラップ四重極質量分析システムを用いた。免疫組織化学染色において、一次抗体は抗 GFAP 抗体を用いた。

［結果］

MALDI-IMS では脳矢状断から主嗅球、前嗅核、大脳新皮質、脳梁、海馬、尾状核被殻、腹側線条体、淡蒼球、視床、視床下部、中脳及び小脳皮質の 12 領域に分けた。WT と比べて SCR-KO マウスにおいて、グルタミン酸は大脳新皮質、脳梁、視床、中脳、小脳皮質、及び尾状核被殻で増加し ($p<0.05$)、GABA は大脳新皮質、脳梁、視床、中脳、小脳皮質及び視床下部で増加した ($p<0.05$)。一方、海馬ではグルタミン酸や GABA 量は有意な増加を示さなかった。また LC-MS/MS を用いた定量分析において、WT と比べて SCR-KO マウスで、脳のグルタミン酸 (WT: 1.85±0.37 mmol/L, SCR-KO: 2.50±0.42 mmol/L, $p=0.0308$)及び GABA (WT: 0.25±0.04 mmol/L, SCR-KO: 0.33±0.06 mmol/L, $p=0.0493$)はそれぞれ増加した。さらに免疫組織化学染色では、MALDI-IMS でグルタミン酸量が多く観察された大脳新皮質、海馬及び視床において、GFAP 陽性細胞数は WT と比べて SCR-KO マウスの大脳新皮質でのみ増加した (CTX: $p=0.0418$, Cohen’s d=1.22; HPF: $p=0.7517$, Cohen’s d=0.17; TH: $p=0.5595$, Cohen’s d=−0.32)。

［考察］

脳において特異的な領域でグルタミン酸と GABA 量が増加したことから、Scrapper のグルタミン酸及び GABA 量への影響は脳領域によって異なることが示唆される。また大脳新皮質、脳梁、視床、中脳、小脳皮質において、グルタミン酸及び GABA 量がともに SCR-KO マウスで増加したことから、Scrapper のグルタミン酸量に対する効果が GABA 量と密接に関係していることが示唆される。

GFAP は、アストロサイトや神経細胞のグルタミン酸トランスポーターの輸送に重要な役割を果たし、グルタミン産生を制御する。実際、GFAP は細胞表面上のグルタミン酸/アスパラギン酸トランスポーターの調節に関与する。本研究において SCR-KO マウスの大脳新皮質でグルタミン酸クリアランスが増加しており、大脳新皮質において Scrapper は GFAP の発現に影響を与えると予想される。以前の報告における SCR-KO マウスの大脳新皮質での自発及び誘発性 EPSCs の減衰時間の延長はこの仮説を支持する。また別の報告で、マウスの帯状皮質において活性化アストロサイトが不安様行動の発現を悪化させることが示されている。ヘテロ接合体の SCR-KO マウスが恐怖記憶の低下や異常な社会行動を示

すことを考えると、Scrapper は前帯状皮質で神経伝達物質量の増加がみられる精神疾患において重要な役割を果たしている可能性がある。

［結論］

本研究では、Scrapper の欠乏が特異的な脳領域におけるグルタミン酸と GABA レベルの増加に影響することを示している。さらに、Scrapper 関連のシグナリングが大脳新皮質のアストロサイト発現を変化させることも明らかにした。これらの結果は、神経伝達物質量のバランスが崩れたマウスの行動異常の原因となるメカニズム解明に寄与する可能性がある。