

|         |  |
|---------|--|
| 氏名(本籍)  | やまぐちみか<br>山口美佳(東京都)  |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |
| 学位記番号   | 博甲第3438号   |
| 学位授与年月日 | 平成16年3月25日   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当   |
| 審査研究科   | 医学研究科  |
| 学位論文題目  | <b>Effects of Cocaine Administration on GABAA, B and NMDA Receptor Subunit Expression and Hippocampal Adult Neurogenesis</b><br>(コカイン投与による GABAA, B 受容体及び NMDA 受容体サブユニット発現と海馬成体神経新生への影響) |
| 主査      | 筑波大学教授 理学博士 久野節二   |
| 副査      | 筑波大学助教授 理学博士 志賀隆   |
| 副査      | 筑波大学助教授 博士(医学) 櫻井武   |
| 副査      | 筑波大学講師 医学博士 大越教夫   |

## 論文の内容の要旨

### (目的)

コカインを動物に反復投与すると薬物に対する感受性が次第に高まり、以前何の効果も認められなかった少量を投与しても自発運動が増加したり、繰り返し立ち上がったたり旋回するなどの異常行動が生じ易くなる。この現象は行動感作と呼ばれ、行動感作を形成した動物はコカイン依存患者における精神病症状のフラッシュバックだけでなく、統合失調症の再発機序を探る上でのモデルになると考えられている。行動感作のメカニズムはいまだ解明されておらず、このモデルが表す病態の有効な治療法も未だ見出されていない。このためモデル動物脳を用いた病態解明の研究が現在進められている。本研究では、行動感作のメカニズムを神経伝達物質受容体の遺伝子発現動態と細胞新生の観点から解析した。

### (対象と方法)

実験1 行動感作の形成と出現に関与するとされる GABA 神経系とグルタミン酸神経系へのコカインの影響を検討した。コカイン単回投与ラット及び2週間反復投与した後1日または1週間の休薬期間を置いたラットについてそれぞれ、GABA<sub>A</sub> 受容体、GABA<sub>B</sub> 受容体、及び NMDA 受容体サブユニット mRNA 発現を定量的 in situ hybridization により解析した。また GABA<sub>A</sub> 受容体に関しては、<sup>35</sup>S でラベルしたアゴニスト t-[<sup>35</sup>S] butylbicyclopentylthionate を用いて受容体結合量をオートラジオグラフィにて測定した。ラットは一群につき6-8匹とし、一匹につき bregma - 4.6mm から2枚、- 7.6mm から2枚の水平断脳切片を用いた。なお、反復投与動物については、行動解析により移所行動と常同行動を測定し、行動感作の形成を確認した。

実験2 歯状回顆粒細胞の破壊により行動感作形成同様のドーパミン作動性薬物に対する感受性の亢進と異常行動の増加が起こること、また成体顆粒細胞層では神経新生が持続することが知られている。これらの報告から、神経新生に対するコカインの影響が行動感作の形成に関与する可能性が疑われた。そこで実験1と同じ要領でコカイン投与を受けたラット脳の神経新生率を BrdU ラベリング法により調べた。海馬を取り

出し、septotemporal 軸に垂直に中心点から 1 - 2mm 厚のブロックを切り出し、28  $\mu$  m おきに 7  $\mu$  m 厚の切片を切り出し免疫染色を行った。一群につき 6 - 8 匹のラットを用い、光学顕微鏡下で一匹につき 50 枚の脳切片上の BrdU 陽性細胞を数えた。さらに、歯状回の断面積及び細胞密度を計測する目的で、細胞骨格蛋白  $\beta$  - actin の in situ hybridization を行い、画像解析にて歯状回の断面積と mRNA を測定した。BrdU 投与 4 週間後の脳についてカルビンディン（神経細胞マーカー）、GFAP（グリアマーカー）及び BrdU の 3 重染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

#### (結果)

実験 1 単回投与後、脳の広範な領域で GABA<sub>A</sub> 受容体各サブユニット及び NR1 サブユニット mRNA 量の一過性的変化が見られた。反復投与終了一日後、線条体で GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta$  3 サブユニット mRNA が約 20% 減り、NR1 サブユニット mRNA が 55% の減少、歯状回で後者は 40% 増加した。

実験 2 反復投与一日後、BrdU 陽性細胞が有意に 26% 減少した。また、単回投与及び反復投与一週間後では、変化は見られなかった。顆粒細胞層断面積と  $\beta$  - actin mRNA 量が変化しないことから、新生細胞の減少は歯状回自体の縮小が原因ではないことが示された。ほとんどの新生細胞は神経細胞に分化し、全 BrdU 陽性細胞に対するその割合に有意な変化はなく、コカインは新生細胞の分化には影響しないことが示された。

#### (考察)

実験 1 で示された反復投与終了一日後の、線条体と歯状回での GABA<sub>A</sub> 受容体  $\beta$  3、及び NMDA 受容体 NR1 サブユニット mRNA 発現の変化が行動感作形成や認知障害などコカイン誘導性の異常に関与している可能性がある。また、この時期に海馬歯状回成体神経新生が抑制されていることが明らかである。コカイン誘導性異常運動調節という顆粒細胞の役割と合わせて考えると、本実験で見られた新生細胞の減少が行動感作形成に関与している可能性が示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、コカインによる行動感作形成の脳内メカニズムをモデル動物を用いて定量形態学的に解析した研究である。コカインを単回及び反復投与された脳内での GABA 受容体及びグルタミン酸受容体サブユニット遺伝子発現の変動、並びに歯状回細胞新生に及ぼす影響を解析し、線条体と歯状回で上記遺伝子発現が変化すること、さらに歯状回細胞新生が抑制されることを発見している。本モデル実験で得られた成績が行動感作の形成機序に直接関わる事象か否かについては、今後更なる検証を必要とするが、将来の研究への端緒となる実験的新事実を明らかにしており、学位論文として高く評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。