



Endogenous adenosine facilitates neurotransmission via A_{2A} adenosine receptors in the rat superior colliculus in vivo

石川, 晶三

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1621

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001621>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	いし かわ しやう ぞう 石 川 晶 三	（長野県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博い第1076号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成9年3月31日	
学位論文題目	Endogenous adenosine facilitates neurotransmission via A_{2A} adenosine receptors in the rat superior colliculus in vivo. （内因性アデノシンの A_{2A} アデノシン受容体を介したラット上丘神経伝達における興奮作用）	
審 査 委 員	主査 教授 岡 田 安 弘 教授 山 村 博 平	教授 岡 村 均

論 文 内 容 の 要 旨

緒言

アデノシンは中枢神経系において、抑制性の神経伝達調節物質（neuromodulator）として作用することが知られ、その作用機序としては、シナプス前終末からの神経伝達物質の放出の抑制、あるいはシナプス後細胞におけるKチャンネルのコンダクタンス増大によることが考えられている。一方、アデノシンは、海馬では低濃度で、上丘では濃度に関らず興奮性作用を持ち、その作用は興奮性アミノ酸伝達物質の一つであるグルタミン酸の放出を増大させることによる可能性が示されている。アデノシンの生理作用を表す受容体は、 P_1 受容体であり、そのサブタイプとしては A_1 、 A_{2A} 、 A_{2B} 、 A_3 などの受容体が存在することが知られている。上記のアデノシンによる神経伝達の抑制作用は A_1 受容体を介していることが明らかにされている。本研究では、中枢神経系におけるアデノシンの興奮作用について、それがアデノシン受容体のどのサブタイプを介しているかを知ることが目的として実験を行った。

対象と方法

ラットを用い、アデノシンが興奮作用のみを示す上丘において、どのアデノシン受容体サブタイプがこの興奮作用に関与しているのか明らかにしようとした。

1. 電気生理学的手法

ラット（体重200-300 g）をウレタンにて全身麻酔し、脳固定装置に頭部を固定し、一側の後頭頭蓋を5x8mm大に開頭した後、上丘を覆っている大脳皮質を吸引除去した。上丘とこれに前外側から入り込む視神経線維束を直視しながら、上丘表面に記録用電極を、視神経上に刺激用電極を設置し、誘発電位を記録した。上丘直前の視神経の電気刺激で上丘表面から得られる場の誘発電位はすでにSeftonらが報告したC2波に相当し、我々が上丘切片で浅灰白層から記録していた電位と同じものであることが確認されているが、このシナプス電位の振幅を指標にして、アデノシン関連物質の神経伝達に対する作用を検討した。刺激の強さは最大反応の得られる振幅の1/2の振幅になる強さで実

験を行った。

2. 髄液中のアデノシン、イノシン濃度の測定

上丘表面（第4脳室）に貯留する脳髄液 $2\ \mu\text{l}$ をピペットにて10分ごとに経時的に採取し、それに含まれるアデノシン、イノシン濃度をHPLCにて測定した。

3. A_1 及び A_{2A} アデノシン受容体mRNAの発現

上丘組織からmRNAを抽出し、 A_1 アデノシン受容体のcDNAを用いて、ノーザンブロッティング法によりそのmRNAが発現していることを確認した。 A_{2A} アデノシン受容体は、RT-PCR法でmRNAの発現を示し、上丘と綿状体における同受容体の発現量を比較した。

結果

1. 上丘シナプス電位と脳脊髄液のアデノシン濃度に対するアデノシンアミナーゼ（ADA）阻害剤（EHNA）の作用

上丘表面から場のシナプス電位を記録しながら、EHNAを腹腔内投与（ 10mg/kg ）すると30分以内に上丘表面（第4脳室）からの脳脊髄液に含まれるアデノシン濃度は $1.5\ \mu\text{M}$ から $4.5\ \mu\text{M}$ に増加した。これに対し、アデノシンの代謝産物であるイノシンの濃度は $9\ \mu\text{M}$ から $2\ \mu\text{M}$ 以下に低下した。またアデノシン濃度の上昇に伴って、上丘表層のシナプス電位の振幅はもとの130%に増大した。したがって、EHNA投与後に誘起されるシナプス電位の増大は、アデノシンの代謝阻害によるアデノシン濃度の増大によることが示唆された。

2. 上丘神経伝達に対する A_1 、 A_{2A} アデノシン受容体アンタゴニストの効果

A_1 アンタゴニストであるDPCPXを腹腔内に投与すると、 0.01mg/kg の投与量では上丘の電位に変化は無く、EHNAによる興奮性作用にも拮抗的作用を示さなかった。投与量を 0.1mg/kg に増量すると、上丘で記録される電位の振幅は112%に増大したが、EHNAによる興奮作用には全く影響が無かった。次に A_{2A} アンタゴニストであるKF17837を腹腔内に投与すると、 0.001mg/kg ではDPCPX同様EHNAの作用を抑制することはできなかったが、 0.01mg/kg に増量すると、抑制することはできなかったが、 0.01mg/kg に増量すると、EHNAの興奮作用が完全に抑制された。さらにKF17837の投与量を 0.1mg/kg に増やすと、高濃度のDPCPXで見られたように、それ自身で興奮作用が認められ、電位の振幅が115%増大したが、EHNAによる興奮性作用は完全に抑制されたままであった。

3. 上丘における A_1 及び A_{2A} アデノシン受容体mRNAの発現

上丘には線状体と同程度の A_1 アデノシン受容体mRNAが発現し、これに対し、上丘の A_{2A} アデノシン受容体mRNAは、線状体の10分の1程度ではあるがその発現が確認された。

考察

生体内において、アデノシンは主に二つの経路で代謝される。一つはADAによる、イノシンへの分解、もう一つは、アデノシンキナーゼによる5-AMPへの代謝である。通常の生理的条件下ではアデノシンキナーゼがアデノシン代謝の中心的役割を示し、ATPが分解されてアデノシンに変換しても直ちに他のヌクレオチドに合成される。しかし、虚血などの条件下では、ATPのようなヌクレオチドの合成が不可能となり、アデノシンをイノシンへと分解するADAが重要な役割を担うと言われている。ラット上丘はADAの活性が非常に高い部位として知られるが、本実験でも、EHNAでADAを阻害すると、脳脊髄液のアデノシン濃度が三倍に増加することが確認された。ADAは細胞質と細胞膜の両方に存在が確認されており、神経伝達の調節に関与する細胞外液のアデノシン濃度の調節に

は、細胞膜のADAが重要であると考えられている。おそらく、腹腔内に投与されたEHNAは脳血管バリアーを通過し、細胞膜のADA作用を阻害することによって細胞外液のアデノシン濃度を増加させ、上丘神経伝達における興奮作用をもたらしたと考えられる。

一般にアデノシンは中枢神経の神経伝達に対して抑制性の調節物質とされているが、脳の中でADAの活性が非常に高い上丘においては、*in vivo*, *in vitro*の系でアデノシンは興奮作用しか示さないことが報告されてきた。上丘におけるADAのはたす役割はなお不明であるが、アデノシンが神経細胞の過剰興奮を起こさないために、ADAによるアデノシンの速やかな代謝が重要な役割を担っている可能性が考えられる。

上丘での興奮作用に関与するアデノシン受容体のサブタイプを決定するため、 A_1 、 A_{2A} アンタゴニストを用いてEHNAの興奮作用への影響を考察し、 A_{2A} アンタゴニストであるKF17837をあらかじめ投与しておくと、EHNAの興奮作用が起こらないことが証明された。この際、 A_1 、 A_{2A} アンタゴニスト共に高濃度ではそれ自身に興奮作用があることが示されたが、同様の結果は上丘のスライスを用いた実験ですでに報告されており、投与されたキサンチン誘導体すべてに興奮作用を認めている。今回用いたDPCPX、KF17837も共にキサンチン誘導体である。キサンチン誘導体はフォスホジエステラーゼ阻害作用、あるいは Cl チャンネルのコンダクタンスを変えることで、アデノシンを介さない興奮作用を示すといわれている。今回投与したKF17837はキサンチン誘導体としての興奮作用が見られない低濃度で、EHNAの興奮作用を抑制した。

このように、上丘に A_{2A} アデノシン受容体を介してアデノシンの興奮作用が現れることが示されたが、上丘に A_{2A} アデノシン受容体が存在しているかどうかは十分な証明がなかった。 A_{2A} アデノシン受容体の選択的アゴニストであるCGS21680は上丘にわずかに結合するものの、cDNAを用いたノーザンブロッティングでは線状体以外にmRNAは検出されなかった。今回RT-PCRを用いて、 A_{2A} アデノシン受容体mRNAが上丘に存在していることが証明されたが、眼球摘出によって選択的 A_{2A} アデノシン受容体アゴニストであるCGS21680結合部位の減少が無いことから、微量に発現している A_{2A} アデノシン受容体が、視神経終末に存在しているとは考えにくい。もし内因性アデノシンの興奮作用が視神経終末からのグルタミン酸の放出増加によるものとするならば、アデノシンは他の神経伝達物質の作用に影響することで、二次的に神経活動を調節している可能性が考えられる。たとえば、すでに我々が報告したように、上丘浅灰白層にはGABA含有介在神経細胞が豊富に存在しており、こうしたGABA含有神経細胞に A_{2A} アデノシン受容体が発現しているとすれば、視神経終末からグルタミン酸とともに細胞間隙に放出されたATPが代謝され、細胞外液に蓄積したアデノシンがGABA含有神経細胞神経終末の A_{2A} アデノシン受容体を活性化し、GABAの放出を抑制する。結果として視神経終末からのグルタミン酸の放出が増加し、上丘の神経伝達に興奮をもたらす可能性がある。線状体においてはアデノシンが A_{2A} アデノシン受容体を介してGABAの放出を抑制することが報告されているが、上丘におけるアデノシンの興奮作用にGABAが関与しているかどうか今後の研究が必要である。

結論

アデノシンデアミナーゼ阻害剤であるEHNAをラット腹腔内に注射すると、ラット上丘表面の脳脊髄液中のアデノシン濃度は三倍に上昇した。この際、視神経を電気刺激して上丘で記録されるシナプス電位の振幅も120-160%増大した。あらかじめ A_1 アデノシン受容体の選択的阻害剤であるDPCPXを投与していても、EHNA投与による興奮作用は抑制されないが、 A_{2A} アデノシン受容体の選択

的阻害剤であるKF17837を投与しておく、EHNAによる興奮作用は完全に抑制された。ノーザンブロッティング法によって、 A_1 アデノシン受容体mRNAが丘上に大量に発現していることが確認され、また上丘 A_{2A} アデノシン受容体mRNAも、線状体の1/10以下という微量であるが、その発現がRT-PCR法で確認された。したがって、上丘におけるアデノシンの興奮作用は、豊富に発現している A_1 アデノシン受容体を介するのではなく、微量に存在する A_{2A} アデノシン受容体を介して起きていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

アデノシンは中枢神経系において、抑制性及び興奮性の神経伝達調節物質 (neuromodulator) として作用することが知られており、抑制性の作用機序についてはアデノシンの A_1 受容体を介してシナプス前性、シナプス後性に作用することが明らかにされている。しかし興奮性機序については全く不明である。

本研究においては、アデノシンによる興奮作用がアデノシンのどの受容体を介してなされているのかを明らかにするために、脳内で興奮性作用のみをもつラット上丘において、アデノシンデアミナーゼ阻害剤であるEHNAを作用させ、内因性アデノシンを上昇させた時におこる神経伝達の興奮作用に対するアデノシン受容体アンタゴニストの効果を追求した。

アデノシンデアミナーゼ阻害剤の投与で、ラット上丘から脳脊髄液に遊離されたアデノシンの量は3倍にも増大し、上丘での神経伝達の指標としてのシナプス電位の振幅は150%にも増大した。 A_1 受容体アンタゴニストであるDPCPXを投与させてもEHNAによる興奮作用に拮抗しないが、 A_{2A} 受容体アンタゴニストであるKF17837を前処置しておく、EHNAによる興奮作用は完全に抑制された。ノーザンブロッティング法によって上丘に A_1 アデノシン受容体mRNAの存在することがRT-PCR法で認められた。従って、上丘におけるアデノシンの神経伝達興奮作用は A_{2A} 受容体を介して発現することが明らかとなった。

本研究は、中枢神経伝達に対するアデノシンの興奮作用が、アデノシン A_{2A} 受容体を介することを明らかにしたものであるが、従来ほとんど行なわれなかったアデノシンの中枢神経伝達調節作用機序の解明に重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。