



Differential expression of immediate-early genes, c-fos and zif268 in the visual cortex of young rats : effects of a noradrenergic neurotoxin on their expression

山田, 裕子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1960

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001960>

※ 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）	やま だ ゆう こ 山 田 裕 子	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博い第1204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11年3月31日	
学位論文題目	DIFFERENTIAL EXPRESSION OF IMMEDIATE-EARLY GENES, C-FOS AND ZIF268 IN THE VISUAL CORTEX OF YOUNG RATS: EFFECTS OF A NORADRENERGIC NEUROTOXIN ON THEIR EXPRESSION （幼若ラット大脳視覚野における前初期遺伝子 c-fos, zif 268の発現：視覚環境とノルアドレナリンの及ぼす影響について）	
審 査 委 員	主査 教授 山 本 節 教授 久 野 高 義	教授 前 田 盛

論 文 内 容 の 要 旨

緒言

乳幼児期の視覚環境はその視機能の発達に極めて重要であり、感受性期と呼ばれる期間に、両眼に適切な視覚入力を与えられないと弱視が生じる。弱視の病態は、主に大脳視覚野ニューロンの視覚入力に対する可塑性（眼優位可塑性）に基づく機能構築の異常によると考えられている。この可塑性には、視覚入力に依存した系と、ノルアドレナリンに代表される直接の視覚刺激に依存しない修飾系が関与するとされているが、その分子機構には未だ不明な点が多い。前初期遺伝子（IEG）は、様々な刺激に応じて急速に誘導され、標的遺伝子の転写を制御しているが、近年、視覚野を含む神経可塑性への関与が注目されている。今回、我々は、視覚野での可塑性に関して、視覚刺激に依存した系とノルアドレナリンによる修飾系の分子機構を調べるため、IEGのうち c-fos, zif268 遺伝子について、感受性期にある幼若ラット大脳視覚野を用い、視覚環境による発現変化と、ノルアドレナリン作動性神経に特異的な神経毒である N-（2-chloroethyl）-N-ethyl-2-bromobenzilamine（DSP 4）の影響について検討した。

方法

感受性期にある4週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。通常飼育群、通常飼育後フラッシュ刺激を行った群、暗室飼育群、暗室飼育後フラッシュ刺激を行った群、暗室飼育後白色光刺激を行った群に分けて視覚環境を変化させた。DSP 4 は、50mg/kg を腹腔内投与し、その効果が顕著となる5日後に、視覚環境を操作した。DSP 4 投与の効果の確認には、dopamine- β -hydroxylase（DBH）の免疫組織染色を行った。c-fos, zif268 の mRNA の発現については、視覚野を摘出し、AGPC 法で RNA 抽出、ランダムプライム法により [α^{32} P] dCTP でラベルした cDNA プロンプを用い、ノーザンブロット解析を行った。c-Fos, Zif268 蛋白の発現については、4%パラホルムで経心灌流固定後、ミクロトームで凍結切片を作成し、ABC 法により免疫組織染色を行った。免疫陽性細胞は、コンピューター顕微鏡システム、画像解析ソフト（Mac ASPECT™）を用いて半定量化した。

結果

1) c-fos, zif268 mRNA の視覚環境による発現の変化

ノーザンブロット解析の結果、幼若ラット視覚野において、c-fos mRNA は通常飼育群での発現が低く、さらに暗室飼育飼育群では通常飼育群の1/2と有意にその発現が低下した。暗室飼育後フラッシュ刺激を行うことにより、暗室飼育群の6倍と劇的に発現が増加し、90分後にはすでに低下する傾向にあった。これに対し、zif268 mRNA は、通常飼育群での発現が高く、暗室飼育下で通常飼育群の1/2と有意に減少した。その後の光刺激より通常状態に回復するが、c-fos mRNA のような発現の増加は認められなかった。両遺伝子ともに、刺激光の違いによる発現の差はみられなかった。

2) c-Fos, Zif268蛋白の視覚環境による発現の変化

c-Fos, Zif268蛋白の幼若ラット視覚野での発現、局在について免疫組織染色を行った。c-Fos 蛋白は、通常飼育群での発現は少ないが、各層間を比較するとIV層で発現が強かった。ノーザンブロット解析の結果と一致して、暗室飼育群でc-Fos 蛋白は、通常飼育群より有意に減少し、暗室飼育後フラッシュ刺激を行った群は、暗室飼育群よりもII/III層で20倍、IV層で11倍、V/VI層で7倍と著明な発現の増加を認めた。一方、Zif268蛋白は、通常飼育群において、c-Fos に比して、全層にわたり高い発現を呈していた。暗室飼育群でのその発現は低下する傾向にあり、その後のフラッシュ刺激により、回復する傾向を認めたが、半定量的解析では有意ではなかった。

3) c-Fos, Zif268蛋白の DSP 4 による発現の変化

DSP 4 の効果は、投与群での DBH 免疫陽性細胞が著明に低下していたことで確認された。DSP 4 投与により中枢ノルアドレナリンを低下させた結果、幼若ラット視覚野での c-Fos 蛋白の発現はコントロールに比して19%と有意に低下していた。Zif268蛋白は、わずかに低下する傾向を認めたが有意ではなかった。

4) c-fos, zif268 mRNA の DSP 4 による発現の変化

DAP 4 投与群では、暗室飼育後フラッシュ刺激を行った際の c-fos mRNA の発現が、コントロールに対して75.7%にとどまり、有意に低下していた。通常飼育群においても、上述の c-Fos 蛋白の結果と一致し、DSP 4 投与群での c-fos mRNA の発現はコントロールに対して62.9%と有意な低下を認めた。一方、zif268 mRNA には、どの視覚環境においても DSP 4 投与による影響は認めなかった。

考按

幼若ラット大脳視覚皮質を用いて、その視覚環境の変化に対する c-fos, zif268 mRNA 及び蛋白の発現を検討した。両遺伝子は、視覚刺激に依存して各々特徴的な発現パターンを呈することが明らかとなった。さらに、両遺伝子の発現に、中枢ノルアドレナリン系の及ぼす影響を検討した。ノルアドレナリン作動性神経に特異的な神経毒である DSP 4 を投与した後、視覚入力を操作し、両遺伝子の発現を調べると、DSP 4 投与により、視覚刺激に依存した c-fos mRNA, 蛋白の発現が抑制された。

幼若ラット視覚野において、転写因子をコードする IEG である c-fos, zif268 遺伝子の発現は、通常状態及び視覚野刺激への反応について明らかな差を認めた。通常状態での c-fos の発現は低く、zif268 では高い発現を認めた。さらに暗室飼育により視覚入力を低下させると、両者の発現は有意に低下した。さらに暗室飼育に続く光刺激による反応は、c-fos では、劇的な上昇を認め、連続する刺激に対してはすでに低下する傾向を示した。これに対して、zif268 では暗室飼育後光刺激により速やかに通常状態に回復するが、その後は変化を認めなかった。このような両遺伝子の発現パターンの差は、視覚入力に依存した神経機能の変化に関して両者が異なる役割を担っていることを表していると考えられた。

中枢ノルアドレナリン系は、これまでの研究から、視覚野のニューロンが、片眼を遮蔽することで

遮蔽眼に対する反応性を失う眼優位可塑性の調節に関与することや、局所あるいは皮質間の神経回路網に働き、視覚皮質ニューロンの反応性を変化させることが知られている。また、大脳皮質でのノルアドレナリンの分泌は、視覚刺激や NMDA 受容体、NO を介して制御されと考えられている。今回、ノルアドレナリン作動性神経を変性させた視覚野で、c-fos の発現は、視覚刺激に対する反応性が低下していた。このことは、中枢ノルアドレナリン系が、逆に、NMDA 受容体や NO を介して、視覚入力に依存した系をコントロールしている可能性を示唆している。

前初期遺伝子 c-fos, zif268 は、視覚入力に対して異なる発現パターンをとり、その標的遺伝子の転写を制御することで、感受性期にある大脳視覚野の機能構築の変化に関与するものと思われた。また、中枢ノルアドレナリン系は、c-fos を介して、視覚入力に依存した可塑性に影響を及ぼしていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

審査の要旨

弱視の病態は、主に大脳視覚野ニューロンの視覚入力に対する可塑性（眼優位可塑性）に基づいており、これには、視覚入力に依存した系と、ノルアドレナリンをはじめとする修飾系とが関与するとされている。従来、多くの生理学的検討がなされてきたが、この2つの系を結ぶ分子機構についての報告は未だない。本研究者は、感受性期のラット大脳視覚野において、前初期遺伝子 (IEG) c-fos, zif268 遺伝子の、視覚環境による発現変化と、ノルアドレナリン作動性神経に特異的な神経毒である N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP 4) の影響を検討した。それにより、両遺伝子は、各々視覚刺激に依存した特徴的な発現パターンを呈し、DSP 4 投与により、c-fos 遺伝子は、通常状態と光刺激に対する反応性が低下することが明らかとなった。

方法

4 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。1) 通常飼育群、2) 通常飼育後フラッシュ刺激を行った群、3) 暗室飼育群、4) 暗室飼育後フラッシュ刺激を行った群、5) 暗室飼育後白色光刺激を行った群に分け視覚環境を操作した。DSP 4 は、50mg/kg を腹腔内投与し、投与後 5 日目に、視覚環境を操作した。視覚野を摘出し、ノーザンブロット解析により、c-fos, zif268 の mRNA の発現を検討した。c-fos, zif268 蛋白の発現については、4 % パラホルムで経心灌流固定後、凍結切片を作成し、ABC 法を用いて免疫組織染色を行った。

結果

幼若ラット視覚野において、c-fos mRNA 及び蛋白は、通常飼育群での発現が低く、暗室飼育群では、さらに低下した。その後、光刺激を行うことにより劇的に発現が増加した。一方、zif268 mRNA 及び蛋白は、通常飼育群で高い発現を認め、暗室飼育下で、有意に減少したが、その後の光刺激に対しては、通常状態に回復する程度であった。DSP 4 投与により、幼若ラット視覚野での c-Fos 蛋白の発現は、有意に低下していた。さらに、暗室飼育後フラッシュ刺激を行った際の c-fos mRNA の発現は、コントロールに比べて、有意に低下していた。一方、zif268 mRNA 及び蛋白の発現には、DSP 4 投与の影響を認めなかった。

結論

弱視治療は、現時点においては、片眼遮蔽を基本とした視覚入力の操作にあり、この治療は、感受性期とよばれる一定の期間に限られたものである。視覚野における可塑性の機構を解明することは、

感受性期のコントロールあるいは、視覚入力 of 操作のみに依存しない他の治療法の開発へとつながる点でも望まれる。本研究は、感受性にある幼若ラット視覚野において、視覚刺激に依存する系と、修飾する系を代表するノルアドレナリン系は、互いに独立したものではなく、相互に影響を及ぼしている可能性があり、その分子機構に c-fos 遺伝子が関与していることを示した最初のものである。本研究は、弱視の病態解明における重要な知見を得たものとして価値ある研究と認める。よって、本研究は博士（医学）として学位を得る資格がある。