



## N- (2-CHLOROETHYL) -N-ETHYL-2-BROMOBENZYLAMINE REDUCES INTRACELLULAR CALCIUM RESPONSE TO NORADRENALINE IN RAT VISUAL CORTEX

山本, 正朗

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2514

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002514>

※ 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。

## 【109】

氏名・(本籍) 山本 正朗 (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1431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14年3月31日

### 【学位論文題目】

**N-(2-CHLOROETHYL)-N-ETHYL-2-BROMOBENZYLAMINE REDUCES INTRACELLULAR CALCIUM RESPONSE TO NORADRENALINE IN RAT VISUAL CORTEX**

(DSP-4投与によるラットの大脳皮質視覚野における  
細胞内カルシウム応答の変化)

### 審査委員

主査 教授 根木 昭

教授 久野 高義 教授 真鍋 俊也

発達期の神経可塑性を制御するメカニズムを探求することは、神経科学の分野における中心的な研究テーマのひとつである。特に大脳皮質視覚野の生後発達及び可塑性に関する研究は、単にシナプス可塑性の細胞・分子機構のみならず、ヒト弱視病態について動物モデルを用いて検討するという立場からも、これまで精力的に進められてきている。(Wiesel, 1982; von Noden, 1988)。発達期動物の片眼を数日間遮蔽しただけで、大脳皮質視覚野の両眼性細胞は消失し、機能的な連携は片側に偏り、单眼視に陥る現象が知られている(眼優位可塑性)。この現象は視覚刺激による神経活動に依存するものと、選択的な制御機構としての神経化学的要因の二つが重要なメカニズムとして挙げられている(Reiter et al., 1986; Reiter and Stryker, 1988; Imamura and Kasamatsu, 1991; Kasamatsu, 1994)。我々は、ノルアドレナリン系を賦活すると眼優位可塑性が増強される、あるいはノルアドレナリン・ベータ受容体を遮断すると眼優位性が阻害されるという過去の報告から、後者のメカニズムの中でもノルアドレナリン系が特に重要な制御因子の一つと考えている。しかし、一方で内因性ノルアドレナリンレベルを低下させても、眼優位可塑性は常に減弱するわけではないという報告もなされている(Adrien et al., 1985; Daw et al., 1985; Daw et al., 1985)。

発達期動物から作製した大脳皮質視覚野の脳スライスは、シナプス可塑性や発達の研究に広く用いられてきた。シナプス刺激後長期増強(LTP)・抑制(LTD)の閾値決定に細胞内カルシウムが特に重要な働きをしている事は脳スライスを用いて証明されており(Artola et al., 1990; Yoshimura et al., 1991)、LTP や LTD は *in vivo* での单眼遮蔽後の大脳皮質の変化の素過程であると考えられている(Tsumoto, 1992)。さらに、電気生理学的手法を用いた、神経活動依存性の細胞内カルシウム動態の観察

では、シナプス可塑性に重要な役割を担っていることが示されている(Isomura and Kato, 1999; Kato et al., 1999; Nishiyama et al., 2000)。従って、神経伝達物質受容体の活性化により生じる細胞内カルシウム濃度の動態を解析することは、発達可塑性のメカニズムを探求するうえで必要不可欠である。しかしながら、眼優位可塑性の調節機構として提唱されている神経活動依存的メカニズム、神経化学的基盤それぞれの中心的担い手である、グルタミン酸-NMDA 受容体系、ノルアドレナリン系による視覚野神経細胞内カルシウムの制御機構については、未知の部分が多く、特に、これらの系の相互作用や反応調節機構に関しては、ほとんど何も知られていなかった。そこで、本研究では、発達期動物の脳スライス標本を用いて、ノルアドレナリン神経系を破壊した際のノルアドレナリン自体に対する細胞内カルシウム応答の変化を、グルタミン酸及びアセチルコリン受容体に対する細胞内カルシウム応答の変化と比較検討した(Kasamatsu et al., 1979; Imamura and Kasamatsu, 1988; 1989; Bear et al., 1990; Gu and Singer, 1993; Liu et al., 1994)。

実験は眼優位可塑性のレベルが最も高いとされる生後3週のLong-Evansラットを用いて行った。選択的ノルアドレナリン神経毒であるN-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine(DSP-4)を腹腔内投与し、モデル動物を作製した(N=6)。また、同様に基剤のみを腹腔内投与して対照群とした(N=6)。まず、DSP-4 によるノルアドレナリン神経阻害の効果の選択性を確認するため、抗dopamine- $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H) 抗体を用いた染色を行い、正常動物との比較を行った。並行して、ノルアドレナリン含有量を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて計測した。次に、新鮮脳スライスを用い、蛍光指示薬の Fura-2 を細胞内に取り込ませ、ノルアドレナリン、N-methyl-D-aspartate (NMDA)、及びカルバコールに対する細

胞内カルシウム濃度の変化を、340nm 及び 380nm を励起光とする 2 波長の蛍光比を用いて経時に記録し、細胞内カルシウム応答の解析を行った。このスライス標本全体について細胞内カルシウムの変動をイメージングすることは、これまで不可能であったが、高感度カメラの採用、励起光の光ファイバーによる誘導法の開発等によって初めて可能になったものである。さらに、ノルアドレナリンに対する細胞内カルシウム応答にもっとも関与するレセプターは  $\alpha_1$  レセプターであることが知られていることから、脳スライスをさらに薄切り、組織切片を作製し、DSP-4 投与によるアドレナリン・ $\alpha_1$  レセプターの変化を、金コロイドを用いた免疫染色法と Western blot 法を用いて解析した。

第一に、D $\beta$ H 染色の結果、DSP-4 投与動物の視覚野ノルアドレナリン神経線維は、正常動物と比較すると小粒子状に変性し、神経毒の効果が十分であることが分かった。また、HPLC によるノルアドレナリン含有量の測定では、対照群の含有量の 6.4%まで有意に低下していることが分かった。参考のために比較したドバミンとセロトニン(5-HT)の含有量は、正常及び投与群の両者間で有意な変動は認められず、DSP-4 の効果が選択的であることが確認された。次に、Fura-2 を蛍光指示薬として、ノルアドレナリンに対する細胞内カルシウム応答を測定比較したところ、ノルアドレナリンに対する細胞内カルシウム応答は、正常動物で見られる反応量の 63.2%まで有意に低下していることが分かった(Unpaired t-test,  $P < 0.0001$ )。大変興味深いことに NMDA に対するカルシウム応答の反応量も有意に減少していた (Mann-Whitney U-test,  $P < 0.047$ )。一方、カルバコールに対する反応量に関しては、有意な変動は見られなかった。最後に、ノルアドレナリン・ $\alpha_1$  レセプターの蛋白量を Western blot 法を用いて測定したところ、DSP-4 投与群、非投与群の間に明らかな差は認められず、また、金コロイドを用いた免疫染色法でも、投与群・非投与群とも同等

に染色され、明らかなレセプター数の増減は認められなかった。これらの実験から、DSP-4 投与により、大脳皮質視覚野のノルアドレナリン神経は選択的に障害され、その含有量は減少するが、細胞内カルシウム応答は、ノルアドレナリンのみならず NMDA に対しての反応も有意に減弱することが分かった。その一方で、細胞内伝達系を共有するカルバコールに対する応答はほとんど変化が見られず、またノルアドレナリン  $\alpha_1$  レセプターはノルアドレナリン神経の障害によっても変化が見られなかった。

シナプス前神経からの入力が途絶えると、シナプス後神経の受容体は過剰発現し、その伝達を維持しようとする代償機能が働くことはよく知られた現象である (U'prichard et al., 1980)。しかし発達期において、この denervation supersensitivity が発現しない現象が報告されている (Dunwiddie et al., 1983)。我々の実験結果から、発達期大脳皮質視覚野においても、シナプス前ノルアドレナリン神経の入力が減弱した状態でもノルアドレナリン  $\alpha_1$  レセプターの supersensitivity は、惹起されないことが初めて証明された。また、この条件下で細胞内カルシウム応答が減弱することが証明されたが、レセプター蛋白は減少していないことと、新しく考案した金コロイドによるノルアドレナリン  $\alpha_1$  レセプターの免疫染色法を用いて、その数も減少していないことを発見した。これらの新知見から、ノルアドレナリン神経系のシナプス前神経の入力が途絶えた条件下では、レセプターそのものではなく細胞内での何らかの情報伝達系が修飾された可能性が示唆される。また、中枢ノルアドレナリン系を選択的に破壊することにより、直接関連のない NMDA に対する応答も減弱していることから、グルタミン酸伝達系のうち、大脳皮質可塑性調節に重要であると考えられる NMDA 受容体の機能が、ノルアドレナリン神経系によって制御されている可能性を初めて明らかにすることができた。これまで、概念的に峻別されてきた NMDA 受容体活性化を伴う神経活動依存性メカ

ニズムとノルアドレナリン系を中心とした神経化学的メカニズムが、細胞内カルシウム調節という可塑性発現に重要な情報伝達プロセスにおいて、相互作用しているものと考えられた。以上の成果は、これまでの発達可塑性に纏る過去の研究報告を有機的に関連付ける上で、極めて重要なものである。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1425号	氏名	山本正朗
論文題目	N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine reduces intracellular calcium response to noradrenaline in rat visual cortex (DSP-4投与によるラットの大脳皮質視覚野における細胞内カルシウム応答の変化)		
審査委員	主査 根木昭 副査 真鍋俊也 副査 久野高義、		
審査終了日	平成 14年 2月 26日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

大脑皮質視覚野の生後発達及び可塑性に関する研究は、単にシナプス可塑性の細胞・分子機構のみならず、ヒト弱視病態について動物モデルを用いて検討するという立場からもこれまで精力的に進められてきている。発達期動物の片眼遮蔽により、大脑皮質視覚野の両眼性細胞は消失し、单眼視に陥る現象が知られている（眼優位可塑性）が、この現象は視覚刺激による神経活動に依存するものと、選択的な制御機構としての神経化学的要因の二つが重要なメカニズムとして挙げられている。また、シナプス可塑性に重要な役割を担っているとされるシナプス刺激後長期増強（LTP）・抑制（LTD）の閾値決定に細胞内カルシウムが特に重要な働きをしている事が証明されている。従って、神経伝達物質受容体の活性化により生じる細胞内カルシウム濃度の動態を解析することは、発達可塑性のメカニズムを探求するうえで必要不可欠である。しかしながら、眼優位可塑性の調節機構として提唱されている神経活動依存的メカニズム、神経化学的基盤それぞれの中心的担い手であるグルタミン酸-NMDA受容体系、ノルアドレナリン系による視覚野神経細胞内カルシウムの制御機構については、未知の部分が多く、特にこれらの系の相互作用や反応調節機構に関してはほとんど何も知られていない。そこで、本研究では、発達期動物の新鮮脳スライス標本を用いて、ノルアドレナリン神経系を破壊した際のノルアドレナリン自体に対する細胞内カルシウム応答の変化を、グルタミン酸及びアセチルコリン受容体に対する細胞内カルシウム応答の変化と比較検討した。実験は生後3週のLong-Evansラットを用いて選択的ノルアドレナリン神経毒であるN-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) を腹腔内投与してモデル動物を作製、また同胞に基剤のみを腹腔内投与して対照群とした。まず、DSP-4に阻害効果の選択性を確認するため、抗dopamine-b-hydroxylase (D $\beta$ H) 抗体を用いた染色を行い、正常動物との比較を行った。並行して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてノルアドレナリン含有量を計測した。次に、蛍光指示薬のFura-2を用いてノルアドレナリン、NMDA、及びカルバコールに対する細胞内カルシウム濃度の変化を経時的に記録し、細胞内カルシウム応答の解析を行った。さらに、細胞内カルシウム応答にもっとも関与するアドレナリン $\alpha$ 1レセプターのDSP-4投与による変化を、金コロイドを用いた免疫染色法とWestern blot法を用いて解析した。

それらの結果、DSP-4投与動物の視覚野ノルアドレナリン神経線維は十分障害され、ノルアドレナリン含有量は、対照群の含有量の6.4%まで有意に低下していることが分かった。またノルアドレナリンに対する細胞内カルシウム応答は、正常動物の63.2%まで有意に低下し (Unpaired t-test, P < 0.0001)、興味深いことにNMDAに対するカルシウム応答の反応量も有意に減少していた (Mann-Whitney U-test, P < 0.047)。一方、カルバコールに対する反応は、有意な変動は見られなかった。最後に、ノルアドレナリン $\alpha$ 1レセプターの蛋白量は、DSP-4投与群、非投与群の間に明らかな差は認められず、また免疫染色法でも、明らかなレセプター数の増減は認められなかった。

シナプス前神経からの入力遮断が、シナプス後神経の受容体の過剰発現を惹起することはよく知られた現象であるが (denervation supersensitivity)、この実験結果から、発達期大脑皮質視覚野においてはシナプス前ノルアドレナリン神経の入力が減弱した状態でもノルアドレナリン $\alpha$ 1レセプターのsupersensitivityは、惹起されないことが初めて証明された。また、この条件下で細胞内カルシウム応答が減弱することが証明されたが、ノルアドレナリン $\alpha$ 1レセプターの数および蛋白量は減少していないことを発見した。これらの新知見から、ノルアドレナリン神経系のシナプス前神経の入力が途絶えた条件下では、レセプターそのものではなく細胞内での何らかの情報伝達系が修飾された可能性が示唆される。また、中枢ノルアドレナリン系を選択的に破壊することにより、直接関連のないNMDAに対する応答も減弱していることから、NMDA受容体の機能が、ノルアドレナリン神経系によって制御されている可能性を初めて明らかにすることができた。

本研究はNMDA受容体およびノルアドレナリン受容体に対する細胞内カルシウム調節を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった、概念的に峻別されてきた神経活動依存性メカニズムと神経化学的メカニズムという、可塑性発現に重要な2つの情報伝達プロセスの相互作用を検証し、その関連を示唆する結論を見いだしたことは、これまでの発達可塑性に纏る過去の研究報告を有機的に関連付ける上で、極めて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。