

氏名・(本籍)	黒川 清 (兵庫県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士(論)第222号		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位授与年月日	平成9年12月25日		
学位論文題目	Topographical Distribution of Neurons Containing Endothelin Type A Receptor in the Rat Brain (エンドセリンA型受容体含有ニューロンの脳内分布)		
	審査委員	主査 教授	加藤 進 昌
		副査 教授	戸田 昇
		副査 教授	木村 宏

論文内容の要旨

【目的】

エンドセリン(ET)は、21アミノ酸からなる血管収縮作用をもつペプチドとして発見されたが、3つのイソペプチド(ET-1、ET-2、ET-3)と2つのイソリセプター(ET-AR、ET-BR)の組み合わせにより複雑な生理活性を示す「脳脈管ペプチド」のひとつとして知られるようになった。脳内におけるETの作用機序、作用部位を検索する目的で、ラット脳内にETを投与した後のc-Fos発現の分布をみたところ、特定のニューロンにETが作用していることが示唆された(参考論文)。その結果をふまえ、脳内でのETの生理学的意義についてより詳細な情報を得るため、特にET-1に強い親和性をもつET-ARに対する抗体を作成し、免疫組織化学的にラット脳内における分布を検索した。

【方法】

ラットET-ARcDNAの既知の塩基配列をもとに、RT-PCR法を用いてC末端64アミノ酸に相当するDNAフラグメントを得た。これをプラスミドpMAL-p2にクローニングし、マルトース結合タンパク質とET-ARとの融合タンパク質を大腸菌TB1に作らせた。この融合タンパク質をアミロースレジンをういたアフィニティークロマトグラフィーで精製し、ウサギに免疫することによりポリクローナル抗体を得た。

ラット心臓の膜分画とETを反応させた二価架橋剤をもちいてリガンド・リセプター複合体を形成させたところ、ETに対する抗体と作成したET-ARの抗体は電気泳動的に同一の複合体を認識したことから、免疫組織化学的吸収試験に合格したことから、得られた抗体はきわめて特異性が高いと判断された。

ウイスター系の雄性ラットを深麻酔下で4%ホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で灌流固定した。クリオスタットで厚さ20 μ mの切片を得、作成した抗ET-AR抗体と反応させたのち、ABC-ペルオキシダーゼ法を用いた浮遊切片法で免疫反応をおこなった。切片をスライドガラスに貼付、透徹、封入したのち、PaxinosとWatsonの図譜にしたがって光学顕微鏡観察を行なった。

【結果】

ラット脳の、ET-AR抗体による染色で、特定のニューロンの細胞体と神経線維が陽性を示した。神経線維は遠位よりは近位が強く染まった。陽性を示すニューロンは強陽性と弱陽性の二群に分類された。強陽性を示す時は尾側から吻側に、A1ノルアドレナリン細胞群に相当する被蓋外側部、A2ノルアドレナリン細胞群に相当する弧束核、A3ノルアドレナリン細胞群に相当する延髄網様体、C3アドレナリン細胞群に相当する内側縦束の正中背側部、A4ノルアドレナリン細胞群に相当する第4脳室の天蓋部、A5ノルアドレナリン細胞群に相当する橋の腹外側部、A6ノルアドレナリン細胞群に相当する青斑核、A7ノルアドレナリン細胞群に相当する橋網様体部、A8ドーパミン細胞群に相当するretrorubral nucleus、A9ドーパミン細胞群に相当する黒質、A10ドーパ

ミン細胞群に相当する腹側被蓋野、A11ドーパミン細胞群に相当する中脳中心灰白質、A12ドーパミン細胞群に相当する弓状核、A13ドーパミン細胞群に相当する不確帯、A14ドーパミン細胞群に相当する視床下部室周囲核および室傍核（小細胞部）、A16ドーパミン細胞群に相当する嗅球（傍糸球細胞）に分布していた。一方、弱陽性を示す群は三叉神経中脳路核、小脳（プルキンエ細胞）、視床下部室傍核（大細胞部）、視床下部視索上核に存在した。また陽性神経線維は内側前脳束、最後野、脳弓下器官、正中隆起、尾状核-被殻、側坐核などにみとめられた。

【考 察】

得られた所見とこれまでの報告を比較したところ、c-Fos発現解析の結果（参考論文）や、¹²⁵I標識ET-Iの強結合領域は、ET-ARの分布に基本的に一致していたほか、電気生理学的また薬理学的実験による報告も今回の結果を裏付けていた。さらに、本研究によりET-ARそのもののより詳細な分布が判明したことになる。この分布は、カテコールアミンニューロンの分布とは酷似するにもかかわらず完全一致ではない。得られた知見から判断すると、ETがET-ARを介して中枢性血圧調節をはじめとする各種生理作用に重要な役割を担うと考えられる。またET-ARの分布が広範囲なことから、ET-AR含有ニューロンがニューロン以外のグリア細胞や血管内皮などからのETによる液性情報の伝達も受けている可能性が示唆された。

【結 論】

哺乳類脳内に広範にET-ARの分布がみとめられ、その分布はカテコールアミンニューロンの分布にほぼ一致していた。

論文審査の結果の要旨

エンドセリンは、血管収縮作用をもつ21個のアミノ酸からなるペプチドであるが、最近中枢神経系にも存在することが示された。しかし、脳内エンドセリンの作用機序や標的は不明である。本研究は、エンドセリン-1に親和性をもつA型受容体の抗体を作成し、免疫組織化学的にラット脳内における分布図を作成したものである。

結果として、

- 1) 遺伝子発現させたA型受容体に対するポリクローナル抗体を作成し、高い特異性を確認した。
- 2) この抗体を用いた免疫染色により、脳内の広範な領域に陽性神経細胞とその突起が観察された。
- 3) とくにカテコラミン含有細胞の多くにA型受容体が局在することが特色として挙げられた。
- 4) A型受容体をもつ神経細胞の分布は、従来の研究で明らかにされているエンドセリン含有神経よりも広範であり、カテコラミンニューロンの分布との共通性が示唆された。

本研究は脳内エンドセリンの作用機構を解明するにあたり、形態学的基盤をはじめ提供したものと、博士（医学）授与に値するものと認める。