

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 てんかんモデル動物海馬におけるニューロペプチド Y
および受容体発現の変化とその役割

指導教官 加藤 進昌 教授

専攻 東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程
脳神経医学専攻 精神医学

入学 平成 12 年 4 月入学

氏名 神出 誠一郎

<背景と研究目的>

ニューロペプチド Y (neuropeptide Y、以下 NPY とする) は、1982 年に Tatemoto らによって同定された 36 個のアミノ酸からなる神経ペプチドである。NPY は中枢神経系で広範な分布を示し、Y1 から y6 までの 6 つの受容体を介して摂食行動やストレス反応等、数多くの機能を調節している。なかでも NPY はてんかん発作についての作用が広く知られており、近年 NPY 遺伝子のノックアウトマウスを用いた研究で自発性発作の出現やけいれん閾値の低下が認められ、海馬スライスを用いた *in vitro* の研究で NPY の興奮性に対する抑制作用が報告されるなど、NPY は内因性の抗てんかん物質として新しい治療法につながる可能性が注目されている。しかしこの NPY の機能については各受容体サブタイプとの関連を含めてまだ十分明らかにされていない。

近年、Noda らによって、自発性てんかんモデルであるノダてんかんラット (Noda epileptic rat、以下 NER とする) が発見された。このラットは 10 週齢前後から特徴的な強直間代性発作を外的刺激なく呈することが知られており、またこれまでの自発性てんかんモデルと異なり、てんかん発作以外の明らかな身

体的、行動学的異常を認めないことから、ヒトの強直間代性発作のモデル動物として非常に有用と考えられている。

本研究では、この自発性てんかんモデルである NER を用いて、NER のてんかん発作が海馬の NPY 神経系に及ぼす影響について明らかにすることを目的として、以下の二点に関する検討を行った。

1. NER の脳内 NPY 分布と発作後の NPYmRNA、NPY 発現の経時的変化について。
2. NER の発作後海馬における NPY 各受容体 mRNA 発現、受容体結合の変化について（海馬に主に存在する Y1、Y2 受容体を中心に行い、さらに Y5 受容体結合についても併せて検討した）。

これらの結果について、さらに現在までに報告された他のてんかんモデルの結果と比較検討することで、NPY とてんかん発作との関連について考察した。

<対象と方法>

1. ラジオイムノアッセイ：強直間代性発作に至らない7週齢 NER と強直間代性発作を繰り返し呈した 14 週齢の NER、およびそれぞれ同週齢の Crj:Wistar ラットを対照として用いた。マイクロウェーブ照射後に取り出した脳を Glowinski & Iversen の方法に基づき線条体、扁桃体、視床下部、前頭葉、海馬、梨状葉から内嗅皮質にかけての 6 部位に切り分け、0.1 規定酢酸中で精製した上清について、抗 NPY ポリクローナル抗体と [¹²⁵I]NPY を用いてラジオイムノアッセイを行い、NPY 様免疫活性を測定した。
2. in situ ハイブリダイゼーション：7 週齢と 14 週齢 NER を強直間代性発作の直後、4 時間後、12 時間後に断頭し、14μm の冠状断脳切片を作成した。 [³⁵S]α-thio-dATP でラベルしたラット preproNPYmRNA および Y1、Y2 受容体 mRNA にそれぞれ相補的な合成オリゴヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。
3. 免疫組織染色：強直間代性発作直後と 12 時間後の 12 週齢 NER、および同週齢の対照ラットをそれぞれ用いて 4%パラフォルムアルデヒドにより還流固定し、20μm の冠状断脳切片を作成した。免疫組織染色は抗 NPY ポリクローナル抗体を用い、ABC 反応の後にジアミノベンジジンにより発色させた。
4. 受容体オートラジオグラフィー：上記 2. と同じ NER と対照サンプルを用い、KHT バッファー中で下記の放射線リガンドと結合させた。
 - i) Y1・Y5 受容体結合：Y1 および Y5 受容体のアナログである 35pM [¹²⁵I][Leu³¹, Pro³⁴] PYY

ii) Y5 受容体結合：上記 35pM [¹²⁵I][Leu³¹, Pro³⁴] PYY に、Y1 受容体のアンタゴニストであり放射線標識されていない BIBP3226 を加えることによって Y1 受容体結合を除去した。

iii) Y2 受容体結合：Y2 受容体に主に結合する 35pM [¹²⁵I]PYY 3-36

<結果>

1. NER 海馬の NPY：対照と比較して、NPY 様免疫活性は全般発作に至る前の 7 週齢では扁桃体、線条体で有意に増加し、強直間代性発作を呈した後の 14 週齢では線条体、海馬、前頭葉、梨状葉から内嗅皮質にかけての領域で有意に増加していた（下表参照）。

強直間代性発作を呈した NER の海馬では、発作後に歯状回顆粒細胞層で NPYmRNA の一過性増加が見られ、苔状繊維で持続的な NPY 発現の亢進を認めた。

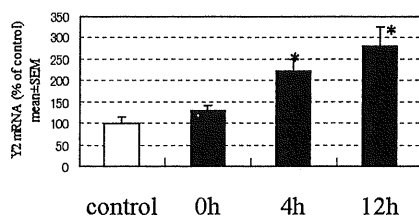
表：NPY 様免疫活性 (*P<0.05)

	線条体	扁桃体	視床下部	前頭葉	海馬	内嗅皮質等
7 週齢 NER	271.87±28.60*	1533.99±250.46*	1565.65±420.24	544.43±86.60	366.75±30.61	1167.07±234.79
7 週齢対照	173.80±40.31	823.17±141.90	1947.88±638.52	409.81±225.66	353.78±180.59	867.99±640.62
14 週齢 NER	381.28±29.55*	1254.03±152.39	1758.35±248.99	764.23±92.28*	640.94±25.36*	1522.23±97.15*
14 週齢対照	134.58±37.44	919.39±533.47	2017.97±245.34	447.55±43.95	437.01±17.44	888.69±342.77

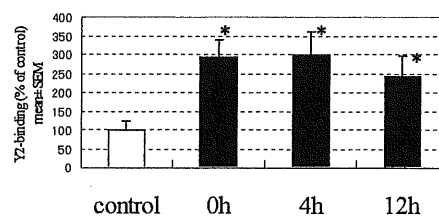
2. NER 発作後の NPY 受容体：

・Y2 受容体：歯状回顆粒細胞層で mRNA の一過性増加と歯状回門部で受容体結合の持続的増加が見られた（下図参照、*P<0.05）。

Y2 受容体 mRNA(歯状回顆粒細胞層)



Y2 受容体結合(歯状回門部)



・Y1 受容体：カイニン酸モデルやキンドリングモデルなど、他のてんかんモデルの結果とは異なり mRNA、受容体結合ともに発作後に対照と比較して有意な

変化が見られなかった。

・Y5 受容体：受容体結合は発作 12 時間後に CA1 の stratum radiatum で対照と比較して減少していた。

<考察>

1. 強直間代性発作を呈した NER では辺縁系で広範に NPY の増加が認められた。この結果は他の機序の異なるてんかんモデル動物とも類似しており、強直間代性発作に対する共通の反応であることが示唆された。また NER 海馬での増加は、発作後に歯状回顆粒細胞層で生じた NPYmRNA 発現の一過性増加に伴う、苔状繊維での NPY 合成の亢進によるものであると考えられた。NER で見られた一過性増加を呈する NPYmRNA 発現の経時的変化は扁桃体キンドリングの結果に類似しており、持続的に増加するカイニン酸発作とは大きく異なったことが特徴的であった。

2. Y2 受容体は強直間代性発作後に歯状回顆粒細胞層での mRNA 発現の一過性増加と、歯状回門部での受容体結合の亢進を認めた。これらの結果はいずれも上記 NPY に似た変化を示したことが特徴である。先行研究の結果と合わせ、発作後に増加した Y2 受容体は NPY とともに抑制作用に関連することが示唆された。

3. 多くの他のてんかんモデル動物では全般発作後に Y1 受容体の mRNA、受容体結合のいずれも減少することが知られているが、本研究において NER ではこの反応が生じなかったことが特徴的である。近年、Y1 受容体アンタゴニストを用いた研究から、この受容体が発作促進作用と関連するという仮説が示されている。この説に依拠すると、発作後にダウンレギュレーションが生じない NER の Y1 受容体は何らかの発作抑制機構の障害に関連すると考えられた。

4. てんかん発作に対する Y5 受容体の機能は現在まで十分に明らかにされていないが、本研究で NER の強直間代性発作後に生じた変化は、NER のてんかん発作との何らかの関連を示していると考えられた。