

氏名	中道 範隆
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	博甲第 719 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	NMDA 受容体の脱感作現象に関する分子薬理学的研究
論文審査委員(主査)	米田 幸雄 (自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	横井 毅 (医学系研究科・教授), 山田 清文 (自然科学研究科・教授), 田熊 一徹 (自然科学研究科・助教授), 谷浦 秀夫 (自然科学研究科・助教授)

学 位 論 文 要 旨

Western blotting analysis revealed that *in vitro* maturation led to marked increases in α -adaptin, clathrin, dynamin I, in addition to NeuN, NSE and synapsin I, in cultured rat cortical neurons. Brief exposure to NMDA at 50 μ M rapidly increased the number of neurons with high fluorescence for increased intracellular free Ca^{2+} levels in a reversible manner, with a persistent constant increase throughout the sustained exposure. Irrespective of the cellular maturity, the second brief exposure resulted in a less potent increase in the number of fluorescent cells than that found after the first brief exposure in a manner dependent on intervals between the 2 repetitive exposures. Brief exposure to NMDA led to a significant decrease in biotinylated membranous proteins immunoreactive to NR1, NR2A and NR2B subunits in proportion to the time after washing. A marked decrease was seen in immunoreactivity to extracellular loop of NR1 subunit after brief exposure to NMDA when determined in cultured neurons not permeabilized on immunocytochemical detection. These results suggest a novel concept that desensitization would undergo with NMDA receptor channels through the internalization triggered by dissociation, but not by association, of the agonist NMDA for each heteromeric receptor subunit in cultured rat cortical neurons.

Key words: NMDA receptors, intracellular Ca^{2+} , desensitization, internalization, *in vitro* maturation

【緒言】

酸性アミノ酸であるグルタミン酸 (Glu) は、哺乳動物中枢神経系において興奮性ニューロトランスミッター、および内因性エキサイトトキシンとしての特

異的機能を有する。これらの細胞外興奮性シグナルは、細胞膜上に存在する興奮性アミノ酸受容体により細胞内シグナルに変換される。興奮性アミノ酸受容体サブタイプの中でも、*N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体は、学習や記憶形成等中枢神経系の可塑性形成プロセスばかりでなく、アルツハイマー病やパーキンソン病など、神経細胞機能障害に起因する各種神経精神疾患の発症メカニズム等、長期的な細胞機能変動を招来すると考えられている。また、未成熟な神経細胞と成熟神経細胞では、細胞の NMDA 応答性が変動することが知られている。そこで本研究では、神経細胞の成熟に伴い NMDA シグナル伝達系が変化する可能性に着目して、NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度変化を、ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞を用いて検討すると同時に、神経細胞における NMDA シグナル伝達系の基礎となる細胞内メカニズム解明を指向した。

【方法】

・ イムノブロットイング：大脳皮質由来神経細胞を妊娠 18 日目のラット胎児脳から単離し、無血清培養液中で培養した。3、9 あるいは 15 日間培養した細胞をホモジナイズし、SDS 電気泳動後、各種抗体を 1 次抗体としてウェスタンブロット解析を行った。

・ 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度測定：異なる期間培養した大脳皮質由来神経細胞あるいはアストロサイトに、 Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬である fluo-3 を 50 分間前処理したのち、共焦点レーザー顕微鏡を用いてその蛍光強度変化を観察した。

・ 細胞生存率測定：大脳皮質由来神経細胞を異なる期間培養し、NMDA による反復刺激を行った。NMDA 刺激前後の細胞を、1.5% trypan blue で 10 分間染色してから、4% paraformaldehyde 中で 20 分間固定した。その後、倒立顕微鏡を用いて trypan blue 陽性および陰性細胞数を計測した。

・ 細胞膜表面蛋白質の検出：9 日間培養した大脳皮質由来神経細胞に NMDA 刺激を短時間行ったのち、異なる時間経過後に細胞膜表面に発現する蛋白質をビオチン標識した。その後細胞を溶解して、アビジンビーズを用いてビオチン化された蛋白質を精製した。SDS 電気泳動後、NR1、NR2A および NR2B 抗体を 1 次抗体としてウェスタンブロット解析を行った。さらに、膜透過処理を行わない細胞を用いて、NR1 の細胞外領域を認識する 1 次抗体を用いた免疫染色を行うことにより、細胞膜上の NMDA 受容体を検出した。

【結果・考察】

神経細胞のマーカーである MAP-2 抗体陽性蛋白質の発現量は、培養 3 日目から 9 日目にかけては著明な変化が見られなかったが、培養 15 日目では 3 日目よりもその発現量は減少した。一方、アストロサイトのマーカーである GFAP

抗体陽性蛋白質は、培養日数を追うごとにその発現量は増加した。NR1、NR2A および NR2B 抗体陽性蛋白質の発現量は、培養 3 日目から 9 日目にかけては顕著に増加した。しかしながら、NR1 の発現量は培養 9 日目から 15 日目にかけても有意に増加したのに対して、NR2A、NR2B の場合は、培養 9 日目と 15 日目の間でその発現量に有意な変化は見られなかった。シナプスマーカーである synapsin I、神経細胞特異的な酵素 NSE および神経細胞核特異的な NeuN の発現量は、3 日目から 9 日目、さらに 9 日目から 15 日目と培養日数を追うごとに、それぞれ有意に増加した。また、軸索伸張マーカー蛋白質である GAP-43 の場合では、培養 3 日目から 9 日目にかけて増加したが、9 日目から 15 日目にかけては減少した。したがって、培養 3 日目では未成熟であった大脳皮質由来神経細胞は、培養日数経過に伴って、シナプス形成、軸索伸張等の神経細胞の成熟過程が進行するものと推察される。

培養 3 日目の神経細胞に 50 μ M NMDA を暴露したところ、1 mM $MgCl_2$ 添加条件下では、蛍光強度上昇を示す細胞はほとんど見られなかったが、 $MgCl_2$ 非添加条件下では、NMDA 暴露に伴い多数の神経細胞において蛍光強度上昇が観察された。このことは NMDA 受容体チャネルが生理的濃度の Mg^{2+} イオンで遮断されるという、電気生理学的な実験事実と合致する。この NMDA による蛍光強度上昇は、NMDA アンタゴニストの MK-801 の前処理により完全に阻止された。一方、50 μ M Glu の場合はいずれの条件下でも、蛍光強度上昇を示す細胞が観察されたが、 $MgCl_2$ 非添加条件下の方が添加条件下よりもその数が多いことは明らかであった。このことは Glu による細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の上昇が、NMDA 受容体だけではなく、他のイオトロピック型受容体やあるいはメタボトロピック型受容体を介しても誘導されるためと考えられる。以上のように、NMDA 受容体チャネルが生理的濃度の Mg^{2+} イオンで遮断されることが確認されたので、以下の NMDA 刺激実験はすべて Mg^{2+} イオンを添加しない条件下で行った。

3、9 あるいは 15 日間培養した成熟度の異なる大脳皮質由来神経細胞に、50 μ M NMDA を適用すると、いずれの培養日数においても著明な蛍光強度上昇を示す細胞が多数観察された。培養日数を追うにしたがい、培養標品中に GFAP 陽性蛋白質の増加が確認されたので、アストロサイトの NMDA に対する応答性についても検討した。培養アストロサイトに高濃度 KCl を適用すると、蛍光強度上昇を示す細胞が多数観察されたのに対して、NMDA 適用の場合には蛍光強度上昇を示す細胞はまったく検出出来なかった。したがって、本実験条件下において検出される NMDA 応答性の細胞は、神経細胞のみに由来するものと推察される。次に、異なる日数培養した細胞に NMDA 1 ~ 100 μ M を累積的に適用したところ、NMDA 適用に伴う細胞の蛍光強度上昇は、培養 3 日目の細胞では 50 μ M でほぼ最大になったが、培養 9 日目の細胞では 20 μ M、および培養 15 日目の細胞では 10 μ M でそれぞれほぼ最大になった。したがって、大脳皮質由来初代培養神経細胞のインビトロ成熟に伴い、神経細胞の NMDA に対する感受性は増強されるものと類推される。

培養 3 日あるいは 9 日目の大脳皮質由来神経細胞に、L 型膜電位感受性 Ca^{2+} チャネル阻害薬である nifedipine を前処理すると、いずれの場合も 50 μ M

NMDAによる蛍光強度上昇は濃度依存的に抑制された。一方、リアノジン受容体を阻害して細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離を阻害する dantrolene、および小胞体膜 Ca^{2+} ポンプを阻害して細胞内ストアの Ca^{2+} を枯渇させる thapsigargin の前処理は、いずれも培養 3 日目の神経細胞では NMDA 適用に伴う細胞の蛍光強度上昇を有意に抑制したのに対して、培養 9 日目の神経細胞の場合には著明な影響を与えなかった。したがって、未成熟な神経細胞においてのみ、NMDA 受容体活性化後の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度増加に細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が寄与する可能性が示唆される。

3、9あるいは15日間培養した大脳皮質由来神経細胞に $50\ \mu\text{M}$ NMDA を適用したところ、いずれの培養日数の細胞においても、NMDA 適用に伴い一度上昇した蛍光強度は NMDA 暴露を継続する限り、NMDA 適用 5 分後とほぼ変わらない強さで少なくとも 1 時間は持続した。これにより、継続的な暴露に対して NMDA 受容体は、脱感作を起こしにくい受容体であると推察される。次に、 $50\ \mu\text{M}$ NMDA 刺激を 1 度行ったのち、細胞を洗浄してから異なる期間静置し、再び同濃度の NMDA 刺激を行った。その結果、1 回目の刺激終了後、細胞を 5 分間静置した場合には、いずれの培養日数においても、1 回目の NMDA 刺激時と同程度の蛍光強度上昇が、2 回目の刺激時にも観察された。しかしながら、25 分間静置した場合には、培養 3 日目の細胞では 1 回目の NMDA 刺激と同程度の蛍光強度上昇が 2 回目の刺激時にも観察されたのに対して、培養 9 日目および 15 日目の細胞では 2 回目の刺激による蛍光強度上昇は、1 回目の刺激時よりも著明に減弱された。さらに、1 回目の NMDA 刺激終了後、45 分間細胞を静置した場合には、いずれの培養日数においても、2 回目の刺激時に見られる蛍光強度の上昇は、1 回目の刺激時よりも顕著に減弱された。したがって、大脳皮質由来初代培養神経細胞のインビトロ成熟に伴い、NMDA 受容体の脱感作現象出現までの所要時間が変動する可能性が示唆される。

NMDA 反復刺激によって、NMDA に対する応答性が低下する可能性が示されたが、この応答性低下を引き起こす一因として、神経細胞に対する NMDA 毒性発揮の可能性は否定できない。すなわち、1 回目の NMDA 刺激により神経細胞死が誘導されて、次の NMDA 刺激前までに細胞数が減少するために、2 回目の NMDA 刺激への応答性が低下する可能性が考えられる。そこで次に、この応答性低下に神経細胞死が関与するかどうかを検討するために、1 回目の刺激終了後細胞を 25 分間静置する条件下で、NMDA 刺激前後において、trypan blue 染色による細胞生存率の算出を行った。しかしながら、いずれの日数培養した細胞でも、1 回目の NMDA 刺激前と刺激 5 分後、および 2 回目の NMDA 刺激 5 分後において、いずれも細胞生存率に著明な変化は見られなかった。したがって、今回観察された NMDA の繰り返し適用に伴う応答性の低下は、NMDA 毒性に起因するのではないものと推察される。

細胞死以外に NMDA 応答性を低下させる一因としては、インターナライゼーションによる細胞膜上からの NMDA 受容体数減少の可能性を挙げることが出きる。したがって、インターナライゼーション関連蛋白質である α -adaptin、clathrin および dynamin I の発現量を、ウェスタンブロッティング法により測定したところ、3 日目から 15 日目へと培養日数を追うごとにいずれの発現量も

有意に増加することが明らかとなった。そこで次に、NMDA 適用に伴う細胞膜上の NMDA 受容体数の変動を、脱感作を生じやすい培養 9 日目の細胞を用いて検討した。9 日間培養した細胞を用いて、50 μ M NMDA による刺激前、刺激終了直後、刺激終了 25 分後、および刺激終了 45 分後にそれぞれ細胞を回収して、ビオチン標識された NR1、NR2A および NR2B 抗体陽性蛋白質の発現量を解析した。その結果、ビオチン標識された NR1、NR2A および NR2B 抗体陽性蛋白質の発現量は、NMDA 刺激前と比較して NMDA 刺激終了直後では有意な変化は見られなかったが、NMDA 刺激終了 25 分後および 45 分後では、いずれのビオチン化 NR サブユニットも有意に減少することが判明した。さらに、膜透過処理を行わない細胞を用いた免疫染色解析によっても、NMDA 刺激終了後の時間経過に伴って、抗 NR1 サブユニット細胞外ループ抗体に対する細胞の陽性反応は減弱された。したがって、NMDA 刺激終了後、細胞を NMDA 非存在下に静置すると、細胞膜上の NMDA 受容体数が減少する可能性が示唆される。

【結論】

本研究成績から、大脳皮質由来初代培養神経細胞のインビトロ成熟に伴い、NMDA 受容体チャネルが細胞膜上から細胞質内ヘインターナライゼーションされたのち、細胞膜表面上の受容体数減少に起因する脱感作出現の可能性が亢進するものと推察される。また、NMDA 受容体の脱感作誘起メカニズムは、現時点では不明な点が多いが、本研究結果はアゴニストが結合することではなく、アゴニストが解離することによって脱感作が開始される可能性を示唆する。NMDA 受容体チャネルを介する大量の Ca^{2+} イオン流入が、多くの神経細胞死出現に深く関与する事実を考慮すると、この脱感作出現メカニズムの解明により、脳内神経細胞死防御を指向する創薬戦略の展開が期待される。

学位論文審査結果の要旨

本研究では、NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度変化を、無血清条件下で培養したラット大脳皮質由来神経細胞を用いて検討した。

培養細胞に 50 μ M NMDA を適用すると、著明な蛍光強度上昇を示す細胞が多数観察されたが、NMDA 曝露を継続するかぎり、1 時間後でも細胞の蛍光強度上昇は継続した。NMDA 1 ~ 100 μ M を累積的に適用したところ、細胞の蛍光強度上昇は培養 3 日目の細胞では 50 μ M でほぼ最大になったが、培養 9 日目の細胞では 20 μ M、および培養 15 日目の細胞では 10 μ M でそれぞれほぼ最大になった。次に、50 μ M NMDA 刺激を 1 度行ったのち、細胞を洗浄してから異なる期間静置して、再び同濃度の NMDA 刺激を行った。その結果、細胞を 5 分間静置した場合では、いずれの細胞においても 1 回目の NMDA 刺激時と同程度の蛍光強度上昇が 2 回目の刺激時にも観察された。25 分間静置した場合では、培養 3 日目の細胞では 1 回目の NMDA 刺激と同程度の蛍光強度上昇が、2 回目の刺激時にも観察されたのに対して、培養 9 日目および 15 日目の細胞では 2 回目の刺激による蛍光強度上昇は、1 回目の刺激時よりも著明に減弱された。しかしながら、45 分間細胞を静置した場合では、いずれの細胞においても、2 回目の刺激時に見られる蛍光強度の上昇は、1 回目の刺激時よりも顕著に減弱された。したがって、神経細胞のインビトロ成熟に伴い、NMDA 受容体の脱感作現象出現までの所要時間が短縮される可能性が示唆される。次に、脱感作を生じやすい培養 9 日目の細胞を用いて細胞膜上の蛋白質をビオチン標識したところ、50 μ M NMDA 刺激終了 25 分後および 45 分後では、ビオチン標識された NR1、NR2A および NR2B サブユニット量は有意に減少することが判明した。したがって、成熟神経細胞ではアゴニストの解離に伴い、細胞膜上 NR サブユニットの細胞質内移行が亢進して、細胞膜表面上の受容体数減少に起因する脱感作が出現すると推察される。

以上の研究成績は、レセプター脱感作出現メカニズムに関する先駆的報告であるのみならず、脳内神経細胞死防御を指向する創薬戦略の展開が期待される点で高く評価されるので、論文審査委員会は本論文が博士(薬学)に値すると判断する。