

博士（人間科学）学位論文

マウス脳におけるガストリン放出ペプチド受容体の  
発現部位に関する免疫組織化学的解析

Immunohistochemical localization of gastrin-releasing  
peptide receptor in the mouse brain

2005 年 1 月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

上地 さり

Kamichi, Sari

研究指導教員： 木村 一郎 教授

## 目次

第1章 序論	P3
1. 免疫組織化学的手法を用いた研究の意義	
2. ボンベシンについて	
3. ボンベシン/GRP と記憶	
4. GRP-R の免疫組織化学的手法を用いた研究の意義と本研究の目的	
第2章 材料と方法	P10
1. ボンベシン受容体タンパク質に対する抗体の作製	
2. GRP-R cDNA 導入細胞の作製と免疫染色	
3. 免疫組織化学的手法によるマウス脳の免疫染色	
4. 組織染色の解析	
第3章 結果	P17
1. 抗 GRP-R 抗体の特異性	
2. マウス脳における GRP-R の発現パターン	
3. マウス脳における GRP-R と GAD67 の発現	
第4章 考察および今後の展望	P22
参考文献	P29
謝辞	P34

## 第 1 章 序論

### 1. 免疫組織化学的手法を用いた研究の意義

免疫組織化学は抗原—抗体反応という高度に特異的な反応を利用して、組織・細胞内の抗原性を持つ物質の局在を明らかにする方法である。1955 年 Coons らが、蛍光色素で標識した抗体を用いて、形質細胞の免疫グロブリン (IgG) の局在を初めて観察した研究によって蛍光抗体法が確立され [4]、その後、フェリチン抗体法や酵素抗体法など、電子顕微鏡を用いた免疫化学的な物質局在観察も可能になった [34]。以来、ホルモン、酵素、免疫グロブリン、アルブミンなどの血清タンパク質、その他様々な分泌タンパク質やレセプターなどの生物活性を持った物質の局在観察に、免疫組織化学的手法は重要な役割を果たしてきた。組織・細胞の構造を保持したままで、そこに存在する物質を特異的に可視化することができるこの免疫組織化学的手法は、組織・細胞の機能と構造の関連を解明する上で、きわめて重要であり不可欠なものとなっている。

## 2. ボンベシンについて

ボンベシン (bombesin) は 1971 年にヨーロッパ産スズガエル (*Bombina bombina*) の皮膚から、平滑筋を収縮させる活性を指標として単離・精製された生理活性ペプチドである [1]。その後、さまざまな種類の両生類の皮膚から 10 種類以上のボンベシン様ペプチド (bombesin-like peptide) が精製された。それらは C 末端のアミノ酸配列の類似性から His-Leu-Met-NH<sub>2</sub> をもつボンベシンサブファミリー (bombesin subfamily)、His-Phe-Met-NH<sub>2</sub> をもつラナテンシンサブファミリー (ranatensin subfamily)、Ser-(Leu または Phe)-Met-NH<sub>2</sub> をもつフィロリトリンサブファミリー (phyllolitorin subfamily) の 3 種類に分類されている [13]。哺乳類では、1979 年にブタの消化管からボンベシンサブファミリーに属するガストリン放出ペプチド (gastrin-releasing peptide:GRP) が精製され [15]、1983 年に南野らによってブタの脊髄からラナテンシンサブファミリーに属するニューロメジン B (neuromedin B:NMB) が精製された [16]。しかし、フィロリトリンサブファミリーに属する哺乳類ボンベシン様ペプチドは現在までのところ報告されていない。

哺乳類のボンベシン様ペプチドの機能は多岐にわたり、平滑筋の収縮以外に、内外分泌の調節やホメオスターシスの調節に関与することが知られている

[13]。例えば、脳内にボンベシン様ペプチドを注入すると消化管ホルモンであるガストリンの分泌が促進され、胃酸、アミラーゼ、インスリンの分泌が抑制されることが報告されている。ホメオスターシスの調節に関しては、脳内投与により摂食抑制、低体温化、毛繕い行動の亢進を生じることが報告されている。また細胞レベルでは、スイス 3T3 細胞、肺小細胞ガン細胞の細胞分裂や DNA 合成を促進するなど、細胞増殖因子として作用することが報告されている。

ボンベシン様ペプチドの発現については、中枢神経の大脳皮質、海馬、視床下部における GRP mRNA の発現が報告され、また嗅球、海馬に NMB mRNA の発現が報告されている [30]。

ボンベシン様ペプチドは受容体を介して作用することが知られており、GRP に高親和性の GRP 受容体 (GRP receptor:GRP-R) [3, 29]、NMB に高親和性の NMB 受容体 (NMB receptor:NMB-R) [31]、さらに、両者に相同性を示すものの内在性の高親和性リガンドがまだ判明していないボンベシン受容体サブタイプ 3 (bombesin receptor subtype 3:BRS-3) [5, 7] が同定されている。いずれも細胞膜に存在し、膜を 7 回貫通する G タンパク質共役型受容体スーパーファミリーに属する。GRP-R と NMB-R は脳の他に消化管等にも広く発現されるのに対し、BRS-3 の発現はほぼ脳内に限局している。

哺乳類においてボンベシン様ペプチドとその受容体がどのような機能を

担っているのか、また内在性のボンベシン受容体のサブタイプが個体レベルでそれぞれどのように機能分担をしているのかを解明するため、遺伝子ノックアウト法によりボンベシン受容体の遺伝子欠損マウスが作製された。ボンベシン受容体の遺伝子欠損マウスを用いた行動学的な研究から、それらが各々異なる表現型を示すことが報告されている。たとえば、GRP-R 遺伝子欠損マウスでは、暗期自発運動量の増加と社会相互作用テストにおける非攻撃性社会行動の増加が観察され、また聴覚性恐怖条件付け試験において恐怖記憶の保持が延長することが報告されている [28, 33]。NMB-R 遺伝子欠損マウスでは、ストレス応答性の変化が認められ [36]、BRS-3 遺伝子欠損マウスでは、中程度の肥満（20～30%）を呈することが観察されている [19]。

### 3. ボンベシン/GRP と記憶

ボンベシンに関する研究は数多く報告されているが、それらの中でマウスやラットを用いた行動薬理的な解析から、ボンベシンが記憶・学習等の高次脳機能に関与することが示唆されている。たとえば、ボンベシン/GRP の末梢投与によって、危険回避試験における記憶保持の延長が報告され [6, 21]、また、スポコラミンと二酸化炭素により誘発された記憶喪失モデルマウスにボンベシン/GRP を末梢投与すると、記憶の保持が改善されること等が報告されて

いる [26]。末梢投与されたボンベシン/GRP が血液脳関門を通過することは実証されてはいないが、迷走神経切断ラットにボンベシン/GRP を末梢投与しても危険回避試験による記憶保持の延長が行われなことが報告されている [6]。このことから、末梢投与されたボンベシン/GRP が迷走神経を刺激し、中枢にその刺激情報が入力されると考えられている。迷走神経は孤束核から中枢に入り、大脳辺縁系の扁桃体に投射される [24]。孤束核にボンベシン/GRP を注入する研究が行われ、その結果、記憶の保持が観察されること [35]、さらに被験ラットの孤束核と扁桃体を破壊すると記憶の保持効果が減弱することが報告されている [21]。また、ボンベシン様ペプチドの拮抗薬の末梢投与によりボンベシン/GRP の機能を抑制する研究では、危険回避試験での学習記憶能力の低下が観察されている [22,27]。これらの行動薬理的解析の結果は、ボンベシン/GRP による記憶の調節において、孤束核と扁桃体が重要な役割を担っている部位であることを強く示唆している。

近年、GRP-R 遺伝子欠損マウスが聴覚性恐怖条件付け試験において、恐怖記憶の保持の延長を呈することが観察され、同遺伝子欠損マウスの扁桃体における記憶形成の素過程とされるシナプス伝達の長期増強の亢進が確認された。その現象が扁桃体外側核においてガンマーアミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid:GABA) 作動性インターニューロンに GRP-R が発現し、GABA の分泌を調節していることに起因することが、行動学や電気生理学的な研究によって示されている [28]。さらに、GABA の作動薬を扁桃体基底外側核へ注入すると、

ボンベシン/GRP の拮抗薬投与による記憶の低下が改善されることから、扁桃  
体基底外側核がボンベシン/GRP による記憶の形成に関与していること、さら  
にボンベシン/GRP による記憶保持効果は GABA 作動性ニューロンが調節さ  
れることにより行われている可能性が示唆されている [23]。

#### 4.GRP-R の免疫組織化学的手法を用いた研究の意義と本研究の目的

ボンベシン/GRP が孤束核や扁桃体における記憶形成の調節に関与して  
いることは、これまでの行動実験の結果から明らかであるが、孤束核や扁桃体  
に GRP-R が発現し、機能しているかは組織化学的には明らかにされていない。  
孤束核や扁桃体だけではなく、脳内における GRP-R の発現パターンを明らか  
にすることは、GRP-R の記憶や情動などの機能のメカニズムを解明する上で  
重要な手掛かりとなる。これまでに、ウェスタンブロッティングに使用が可能  
なマウス・ヒト GRP-R の第三細胞内ループを含む 247-262 番目のアミノ酸  
配列 (VEGNIHVKKQIESRKR) を認識するポリクロナール抗体の報告はあるが  
[10]、免疫組織化学的手法に使用可能なマウス GRP-R に対する特異的な抗体  
が作製されていなかったことから、生体内における GRP-R の発現パターンは  
明らかにされていなかった。また GABA と GRP/GRP-R システムとの関係性  
についても行動実験や電気生理学的には報告されてはいるが [28]、組織化学的



な報告はない。そこで本研究においては、免疫組織化学的手法に適した抗 GRP-R 抗体を作製し、マウス脳における GRP-R タンパク質の発現パターンについて、特にこれまで、記憶の形成と保持などへの関与が示唆されている脳の各部位に注目して解析を試みた。

## 第 2 章 材料と方法

### 1. ポンベシン受容体タンパク質に対する抗体の作製

抗原性検索と抗体作製は IWAKI 社に依頼した。作製するポリクロナール抗 GRP-R 抗体の抗原認識部位として、マウス GRP-R の第二細胞外ループである 179-190 番目のアミノ酸配列 (FSDLHPFHVKDT) が選ばれた。マウスポンベシン受容体には GRP-R、NMB-R、BRS-3 の 3 種類があるが、これらはアミノ酸配列の相同性が高いため、抗原性が高い配列のうち、他のポンベシン受容体と相同性が低い領域を抗原認識部位として上記配列を選んだ。また、タンパク質の相同性を検索するサイトである Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) において、この配列に相同性の高いタンパク質の報告がされていないかを確認し、抗体作製を行った。免疫にはウサギ 2 羽を用い、合成抗原ポリペプチド 0.2mg を 3 回皮下投与し、さらに 0.05mg を 3 回静脈内投与し、40 日後に全採血を行った (IWAKI 社)。免疫したウサギから得られた抗血清はアフィニティーカラム (Pierce 社) を用いて精製した。

なお、抗原性検索により抗原性の高い領域として選ばれたマウス GRP-R の C 末端細胞内ドメイン 361-372 番目のアミノ酸配列 (SFKSTNPSATFS) を認識する抗体と、マウス BRS-3 の C 末端細胞内ドメイン 364-375 番目の

アミノ酸配列 (NLTVMGRVPATG) を認識する抗体を上記と同様の方法で作製し、精製した。しかし GRP-R 遺伝子欠損マウスと BRS-3 遺伝子欠損マウスについての免疫染色の解析の結果、GRP-R や BRS-3 以外の非特異的タンパク質を認識することが認められたので、再度抗原性が高く他のポンベシン受容体と相同性が低い領域を選び、マウス GRP-R の第二細胞外ループである 179-190 番目のアミノ酸配列 (FSDLHPFHVKDT) を認識する抗 GRP-R 抗体を作製した。

## 2. GRP-R cDNA 導入細胞の作製と免疫染色

COS-7 細胞にマウス GRP-R の cDNA を導入するにあたり、マウス GRP-R cDNA は J.F.Batthey 氏 (米国国立衛生研究所 聴覚コミュニケーション障害研究部門) より供与して頂いた。マウス NMB-R と BRS-3 cDNA はポリメラーゼ連鎖反応法を用いて、マウス脳 mRNA より単離した。プライマーは以下の 4 種類を用いた。

NMB-R forward primer : 5'-CAA GAA AAC TCC TGC GAG TTC CCT-3'

NMB-R reverse primer : 5'-GGT GAA TTC CAA GAG TGA ATT AGA TCG-3'

BRS-3 forward primer : 5'-AGC ACT GCA GAG GTA GTG AAG GCA GA

BRS-3 reverse primer : 5'-TGC AAA GCT TAA AGC TGG ATA CA-3'.

GRP-R、NMB-R、BRS-3 cDNA は Internal Ribosome Entry Site (IRES)の下流に Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) 遺伝子を組み込んだ pIRES-EGFP プラスミド DNA (Clontech 社) に挿入した。各々の受容体 cDNA を挿入した pIRES-EGFP プラスミド DNA (GRP-R/pIRES-EGFP、NMB-R/pIRES-EGFP、BRS-3/pIRES-EGFP) を Lipofectamine (Invitrogen 社) を用いて COS-7 細胞へ導入し、48 時間後に EGFP の発光により各々の cDNA の導入を確認した。ネガティブコントロールとして、cDNA が挿入されていないプラスミド DNA (pIRES-EGFP) も同様の方法でトランスフェクションした。COS-7 細胞の免疫染色は tyramide signal amplification (TSA) kit (Molecular Probes 社) を用い、以下のマウス脳切片についての免疫組織化学的手法と同様の方法で行ったが、トランスフェクションを確認するための EGFP の緑色の発光と区別するために、赤色発光の Alexa Fluor 568 tyramide fluorescent dye を使用した。

### 3. 免疫組織化学的手法によるマウス脳の免疫染色

免疫染色には、12~16 週齢の GRP-R 遺伝子欠損マウスとその同腹の野生型マウスの雄を使用した。使用した GRP-R 遺伝子欠損マウスはエクソン 2 を不活化することにより、GRP-R 機能を失ったマウスで、国立精神・神経セン

ター 神経研究所 疾病研究第四部において作製され、系統維持されているものである [33]。20%抱水クロラルを用いて麻酔したマウスに 4%パラホルムアルデヒド 50ml を 30 分間灌流し固定を行った。固定後、脳組織を取り出し、クリオスタット (Leica 社) を使用し、20 $\mu$ m の厚さの脳切片 (冠状断面) を作製した。

蛍光免疫染色は間接蛍光抗体法を行い、蛍光抗体反応にはチラミドシグナル増幅システム (TSA system; TSA kit Molecular Probes 社) を使用した。TSA system とは、一次抗体を西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase:HRP) 標識の二次抗体と反応させた後、蛍光標識されたチラミドを加えてペルオキシダーゼによりチラミドをラジカル化し、近傍の組織と反応させ、蛍光シグナルの増強を図る方法である。染色方法について、以下に簡単に述べる。

脳組織切片は 4%パラホルムアルデヒドを用いて 20 分間 (室温) 固定し、その後、切片を phosphate-buffered saline (PBS pH7.4) で洗浄し、次に 0.1% (w/v) トライトン X-100 処理を 10 分間 (室温) 施し、PBS で洗浄した。さらに内在性のペルオキシダーゼを不活化するために 1%過酸化水素処理を 1 時間 (室温) 行い、その後 1%ブロッキング試薬 (Molecular Probes 社) による処理を 1 時間 (室温) 行った。一次抗体反応は、抗 GRP-R 抗体 (1 $\mu$ g/ml) を用いて一晩 (4 $^{\circ}$ C) 行った。一次抗体反応後、PBS で 3 回洗浄した切片に、HRP を結合させたヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (Molecular Probes 社, 1 $\mu$ g/ml) を 1 時間 (室温) 反応させ、再び PBS を用いて 3 回洗浄した。最後に、蛍光標識されたチラミド (Alexa Fluor 488 tyramide fluorescent dye 1:100) を

10 分間（室温）反応させ発色を行った後、さらに propidium iodide (Sigma 社 0.5 $\mu$ g/ml) を 5 分間（室温）反応させ核染色を行った。蛍光染色を施した脳組織切片は、Slowfade light antifade mounting reagent (Molecular Probe 社) を用いて封入した。

抗原による抗体の吸収は、抗 GRP-R 抗体（1 $\mu$ g/ml）と 100 倍のモル濃度に相当する 0.9 $\mu$ g/ml の GRP-R 抗原合成ペプチドを一晩（4 $^{\circ}$ C）反応させて行い、吸収された抗体を用いて、上記に記載した方法と同様に蛍光染色を行った。またネガティブコントロールとして、抗 GRP-R 抗体と同じ濃度の非免疫ウサギ IgG (Dako cytotation 社) を一次抗体の代わりに使用し、さらに一次抗体と二次抗体を各々省略した染色も行った。

二重免疫染色では上記のように 1%過酸化水素処理を 1 時間行った後に、マウスモノクロナール抗体における非特異的反応を減少させるために、Mouse to Mouse Block (Scy Tek 社) によるブロッキング処理をさらに 1 時間(室温) 行った（この他は上記方法と同様に染色を行った）。抗 GRP-R 抗体による染色を蛍光顕微鏡により確認した後、いずれもモノクロナール抗体である、抗 glutamate decarboxylase 67-kDa isoform (Chemicon 社 抗 GAD67 抗体 1:1000)、抗 glutamate decarboxylase 65-kDa isoform (AFFINITI 社 抗 GAD65 抗体 1:5000)、抗 calretinin 抗体 (Chemicon 社 1:100)、抗 microtubule-associated protein-2 (Leinco Technologies 社 抗 MAP-2 抗体 1:500)、抗 NeuN 抗体 (Chemicon 社 1:200)、抗 OX42 抗体 (Serotec 社 1:100)、抗 glial fibrillary acidic protein (Chemicon 社 抗 GFAP 抗体 1:400) をそれぞれ一晩（4 $^{\circ}$ C）反応させた。TSA kit の指定の

使用方法に準じ、HRP を結合させたヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (Molecular Probes 社, 1 $\mu$ g/ml)を 1 時間 (室温) 反応させ、最後に Alexa Fluor 568 tyramide fluorescent dye (1:100) を 10 分間 (室温) 反応させ発色を行った。

Diaminobenzidine (DAB) を用いた組織染色は、上記の蛍光染色と同様に準備した切片を用い、一次抗体反応前までの操作を行った。一次抗体反応からは、DAB histochemistry kit (Molecular Probes 社) を使用し、その指定の使用方法に準じて行った。一次抗体反応として抗 GRP-R 抗体 (1 $\mu$ g/ml) を一晩 (4 $^{\circ}$ C) 反応させた後、HRP を結合させたヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (Molecular Probes 社 1 $\mu$ g/ml) を 1 時間 (室温) 反応させた。その後、0.1%DAB で 4 分間反応させて発色を行い、ヘマトキシリン溶液 (WAKO 社) を用いて核染色を行った。DAB 染色を施した脳組織切片はマウントクイック (DAIDO SANGYO 社) を使用して封入した。

#### 4. 組織染色の解析

免疫染色を施した脳組織切片の解析は、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus 社 Fluoview) を使用し、免疫染色解析を行う脳組織切片の領域を確認するため、それに隣接する切片にチオニン染色を施した。また解析にはそれぞれ 3 匹以上のマウスを使用した。免疫組織像の判定は 2 人以上の研究者により行い、弱い GRP-R 免疫陽性反応を (+)、強い反応を (+++)、これらの中間の反応を

(++) と示した。



## 第 3 章 結果

### 1. 抗 GRP-R 抗体の特異性

本研究ではマウス GRP-R に対するポリクロナール抗体を作製した。最初に作製した抗 GRP-R 抗体の特異性を検討するため、マウス GRP-R cDNA を挿入した pIRES-EGFP プラスミド DNA (GRP-R/pIRES-EGFP) をトランスフェクションした COS-7 細胞について免疫染色を行ったところ、細胞質に免疫陽性反応が検出された (図 1-a、赤色)。また GRP-R 免疫陽性細胞は EGFP 発現細胞 (緑色) と一致した。同様にボンベシン受容体のサブタイプであるマウス NMB-R、BRS-3 cDNA を挿入した pIRES-EGFP プラスミド DNA (NMB-R/pIRES-EGFP、BRS-3/pIRES-EGFP) を COS-7 細胞にトランスフェクションした。これらの細胞を用いて抗 GRP-R 抗体による免疫染色を行ったところ、GRP-R 免疫陽性反応は観察されなかった (図 1-b、c)。またネガティブコントロールとして pIRES-EGFP プラスミド DNA のみをトランスフェクションした細胞においても、抗 GRP-R 抗体による免疫陽性反応は観察されなかった (掲載データなし)。したがって、本研究において作製した抗 GRP-R 抗体は GRP-R に特異的な抗体であり、また他のボンベシン受容体との交差性を持たないことが確認された。

抗 GRP-R 抗体が GRP-R に特異的な抗体であることが COS-7 細胞の免疫染色で確認されたことから、さらに組織レベルにおける抗 GRP-R 抗体の特異性

を検討するため、野生型マウスと GRP-R 遺伝子欠損マウスの脳組織を用いた DAB 色素と蛍光色素を用いた免疫染色を行った。その結果、野生型マウスの脳組織において GRP-R 免疫陽性反応が検出されたが（図 2-a）、GRP-R 遺伝子欠損マウスにおいて GRP-R 免疫陽性細胞は観察されなかった（図 2-b）。

これらの結果から、抗 GRP-R 抗体が免疫組織化学的手法に使用が可能であることが確認されたので、GRP-R 免疫陽性反応を示した細胞の染色特異性を検討するために、抗 GRP-R 抗体と各種神経マーカーの抗体との二重染色を野生型マウスの脳組織について行った。神経マーカーの抗体として、ニューロンに特異的な抗 MAP-2 抗体とニューロンの核に特異的な抗 NeuN 抗体、およびアストロサイトに特異的な抗 GFAP 抗体とマイクログリアに特異的な抗 OX42 抗体を使用した。その結果、GRP-R 免疫陽性細胞は MAP-2 及び NeuN については免疫陽性であったが、GFAP（図 3）と OX42（掲載データなし）については免疫陽性ではなかった。GRP-R 免疫陽性反応は主としてニューロンの細胞体で観察され、また軸索において弱い陽性反応が検出されたことから、GRP-R の発現は主にニューロンの細胞体であることが明らかとなった。またアストロサイトとマイクログリアにおいては、GRP-R 免疫陽性反応は観察されなかった。

抗 GRP-R 抗体の特異性をさらに検討するため、抗原ペプチドによる抗体の吸収実験を行ったところ、GRP-R 免疫陽性反応は観察されず（図 2-c）、またネガティブコントロールとして一次抗体の代わりに用いた非免疫ウサギ IgG や、一次抗体、二次抗体を省略した免疫染色においても GRP-R 免疫陽性反応は検出されなかった（掲載データなし）。

以上の結果から、作製した抗 GRP-R 抗体は GRP-R に特異的であり、かつ免疫組織化学的手法に有効なものであることが明らかになった。

## 2. マウス脳における GRP-R の発現パターン

作製した抗 GRP-R 抗体が免疫組織化学的手法に使用可能なことが確認されたので、マウス脳における GRP-R の発現パターンについて検討を行った。その結果、GRP-R 免疫陽性反応は大脳皮質、海馬、扁桃体、視床下部、脳幹と広範囲に観察された（図 4）。視床下部の弓状核、周傍核、室傍核、視索上核、視交叉上核において強い GRP-R 免疫陽性反応が観察され、視床においては大変弱い GRP-R 免疫陽性反応が観察された（掲載データなし）。本研究では GRP と記憶の関係が示唆されている大脳辺縁系を中心に解析を進めた。その結果を表 1 にまとめた。

GRP-R 免疫陽性反応は、大脳皮質の全ての層において観察された（図 4-A）。また海馬の CA1・CA2・CA3 領域の錐体細胞層と歯状回の顆粒細胞層において GRP-R 免疫陽性反応が観察され（図 4-B）、梨状皮質と背側内梨状皮質においては強い GRP-R 免疫陽性反応が観察された（図 4-C）。扁桃体では多くの神経核 [25]において GRP-R 免疫陽性反応が広範囲に観察された。そこで扁桃体の各々の神経核について詳しく解析を行ったところ、中程度の免疫陽性反応が基底外側核と基底内側核、内側核において観察され（図 4-D）、その他、外側核、中心核、皮質核、介在核、外側嗅索核、海馬領域等の扁桃体の大部分の神

経核においても弱い免疫陽性反応が観察された。脳幹においても孤束核（図 4-E）や網様核、楔状束核、迷走神経背側核などを含む広い範囲で GRP-R 免疫陽性反応が観察された。

以上のことから、これまでの行動学的な研究によって記憶の形成に関与すると報告されている海馬や扁桃体などに GRP-R が発現していることが免疫組織学的に明らかになった。

### 3. マウス脳における GRP-R と GAD67 の発現

これまで GABA と GRP-R の関係性が示唆されていることから、GABA 作動性ニューロンに特異的な抗 GAD67 抗体と抗 GRP-R 抗体との二重免疫染色をマウス脳組織について行った（図 5）。その結果、海馬や扁桃体において、GRP-R 免疫陽性細胞の一部が GAD67 免疫陽性であった。特に扁桃体では、外側核、基底外側核、内側核、中心核などを含む全域にわたり、GRP-R 免疫陽性反応を示す細胞の一部が GAD67 免疫陽性であった。扁桃体各神経核での GRP-R 免疫陽性細胞の数には差があったが、GRP-R 免疫陽性細胞のうち 10～16% が GAD67 免疫陽性であった。抗 GAD67 抗体以外の GABA 作動性ニューロンに特異的な抗 GAD65 抗体と抗カルレチニン抗体を用いて抗 GRP-R 抗体との二重免疫染色を行ったところ、同様に GRP-R 免疫陽性反応を示す細胞の一部がこ

これらの抗体に反応した（掲載データなし）。

これらの結果により、扁桃体全域にわたり、GRP-R を発現する細胞の一部が GABA 作動性ニューロンであることが明らかとなった。

## 第4章 考察および今後の展望

GRP/GRP-R システムは扁桃体や孤束核において記憶の形成や保持に関わっていることが、マウスとラットを用いた行動学的な研究から示唆されてきた [21, 35]。しかし免疫組織化学的手法に使用できる GRP-R に特異的な抗体がなかったため、脳における GRP-R タンパク質の発現パターンは報告されていなかった。そこで本研究では、マウス脳について、特に GRP-R が記憶調節を担っている扁桃体を中心に、GRP-R タンパク質の発現パターンを明らかにすることを目的として、まず抗 GRP-R 抗体の作製を試みた。マウスにおいて GRP-R と他のボンベシン受容体のサブタイプの相同性が高く、アミノ酸配列では、GRP-R と NMB-R が 54%、GRP-R と NMB-R は 47%一致している。本研究で抗 GRP-R 抗体作製のために選定したマウス GRP-R の第二細胞外ループ 179-190 番目のアミノ酸配列 (FSDLHPFHVKDT) [3] は、上記サブタイプとは相同性の低い領域である。その結果、作製された抗 GRP-R 抗体は *in vitro* と *in vivo* の両方において、GRP-R に特異的であることが確認された。すなわち、GRP-R/pIRES-EGFP、NMB-R/pIRES-EGFP、BRS-3/pIRES-EGFP をそれぞれトランスフェクションした COS-7 細胞では、GRP-R/pIRES-EGFP 導入細胞 (GRP-R 発現細胞) のみで GRP-R 免疫陽性反応が観察された。また、GRP-R 遺伝子欠損マウスを用いた解析において、GRP-R 免疫陽性反応は観察されなかった。本研究に用いたエクソン 2 を不活化した遺伝子欠損マウス

[33] だけでなく、J.F.Batthey 氏により供与されたエクソン 1 にネオマイシン耐性遺伝子を挿入して GRP-R 遺伝子を不活化した遺伝子欠損マウス [8]においても、GRP-R 免疫陽性反応は観察されなかった（掲載データなし）。このように 2 種類の GRP-R 遺伝子欠損マウスにおいて GRP-R 免疫陽性反応が観察されなかったことは、作製した抗 GRP-R 抗体が GRP-R に特異的であることを強く支持するものと考えられる。免疫組織化学的研究に使用可能である GRP-R に特異的な抗 GRP-R 抗体の作製に成功したのは、本研究が世界で初めてである。

これまでに *in situ* ハイブリダイゼーション法によりラットの大脳皮質、海馬、扁桃体、脳幹において GRP-R mRNA の発現が認められることが報告されていた [32]。本研究においても、マウスの大脳皮質、海馬、扁桃体、脳幹に GRP-R タンパク質の発現が確認された。したがって、本研究におけるマウス脳 of GRP-R タンパク質の発現パターンの解析結果は、ラット脳 of GRP-R mRNA の発現パターンとほぼ一致しているといえる。しかしながら、詳細に比較すると、わずかながら一致しない点がある。例えば、GRP-R mRNA の発現は大脳皮質の第 II 層と第 III 層にのみ観察されているが、GRP-R 免疫陽性反応は大脳皮質の全層に検出された（図 4-A）。また GRP-R mRNA の発現は梨状皮質においては大変弱かったが、GRP-R 免疫陽性反応においては強いシグナルが検出された（図 4-C）。このような不一致は、*in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学的手法の感度の違い、あるいは GRP-R の発現にお

ける動物種間の違いによるものと考えられる。このように、細かな点で多少の相違はあるものの、GRP-R の mRNA とタンパク質の発現パターンがほぼ一致していることから、GRP-R mRNA はそれぞれの発現部位で GRP-R タンパク質に翻訳されていることが考えられる。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法では明らかにされなかったが、GRP-R 免疫陽性細胞が MAP2 および NeuN 免疫陽性であり、GFAP 免疫陽性ではなかったことから、GRP-R は主としてニューロンに発現していることが確認された。また、GRP-R 免疫陽性細胞の一部が GABA 作動性ニューロンであったことから、GRP-R が抑制ニューロンの働きに関与している可能性が、免疫組織化学的に本研究によって示唆された。

オートラジオグラフィによる  $^{125}\text{I}$ -ボンベシンを使用した研究により、視床下部、海馬、扁桃体にボンベシン結合部位、すなわち GRP-R が発現していることが報告されているが [17, 20]、これらの領域では GRP-R 免疫陽性反応が確認された。一方、 $^{125}\text{I}$ -ボンベシンは視床にも結合することが報告されている。しかし、本研究では視床における GRP-R 免疫陽性反応は大変微弱であった。このような相違は、NMB をラベルした  $^{125}\text{I}$ -NMB を用いたレセプターオートラジオグラフィの研究により、 $^{125}\text{I}$ -NMB が視床に結合することが報告されていることから [11]、高濃度の  $^{125}\text{I}$ -ボンベシンが GRP-R だけではなく、NMB-R にも結合したためと考えられる。

*in situ* ハイブリダイゼーション法により GRP mRNA が大脳皮質、海馬、



扁桃体、視床下部に発現していることが報告されている [30]。また、扁桃体においては内側核、外側核及び基底外側核などの多くの神経核で GRP mRNA の発現が観察されているが、本研究ではこれらの神経核が GRP-R 免疫陽性であることが観察された。これらのことから、GRP-R のリガンド (GRP) は扁桃体において、局所的ネットワークの中で供給されていると考えられる。

聴覚性恐怖条件付け試験によって、恐怖記憶の情報伝達は、聴覚野視床や聴覚野皮質から扁桃体の外側核に入力される刺激情報と、海馬から扁桃体の基底内側核へ入力される刺激情報が、扁桃体の中心核において統合され、統合された情報が脳幹へ伝わり、その結果、恐怖反応たとえば不動反応（フリージング）が起こると考えられている [14]。聴覚性恐怖条件付けにおける情報伝達回路のうち、扁桃体外側核において GRP-R mRNA が GABA 作動性インターニューロンで発現することが報告されている [28]。本研究において、扁桃体の外側核以外にも多くの神経核において GRP-R が発現し、その一部が GABA 作動性ニューロンであることが確認された。したがって、扁桃体の外側核、中心核、基底外側核、基底内側核を含む多くの領域が、聴覚性恐怖条件付け試験による恐怖記憶の保持に関与し、それらが GABA 作動性ニューロンの調節を介して行われている可能性が考えられた。

GRP-R 遺伝子欠損マウスは社会相互作用テストにおける非攻撃性社会行動の増加を示し [33]、また生後 45 週齢に達すると有意な体重増加を認めることが報告されている [12]。しかし、このような社会行動の異常や体重増

加のメカニズムは未だ解明されていない。一方、視交叉上核や海馬において GRP/GRP-R システムと GABA 作動性システムとの関係性が報告されているが [2, 18]、本研究においても、扁桃体における GRP-R 免疫陽性細胞の一部が GABA 作動性ニューロンであることが確認されたことから、中枢神経における GRP/GRP-R システムと GABA 作動性システムとは、記憶だけではなく、社会行動や摂食行動等を含む様々な機能を調節している可能性が考えられる。いずれにせよ、抗 GRP-R 抗体を用いた免疫組織化学的研究は、様々な身体機能における GRP/GRP-R システムの役割を解明するのに重要かつ有意義であると考えられる。

最近、BRS-3 に特異的な抗体を用いたラット脳における BRS-3 の発現パターンが報告された [9]。強い BRS-3 免疫陽性反応は、大脳皮質、海馬、視床下部、視床で観察され、これらの領域では BRS-3 免疫陽性反応はニューロンの細胞体や軸索、グリア細胞においても観察された。しかし、本研究においては GRP-R 免疫陽性細胞は MAP-2 免疫陽性ではあったが、GFAP および OX42 免疫陽性ではなかった。また、各々の遺伝子欠損マウスの行動学的な表現型に相違があることから、GRP-R と BRS-3 が脳内において各々異なる機能を果たしていることが考えられるが、それは GRP-R と BRS-3 の発現パターンの違いからも示唆される。

本研究で我々は、記憶に関わると考えられている脳の領域における GRP-R の発現パターンを明らかにしたが、今後、生体内でのさらに詳しい GRP-R

の発現パターンを明らかにし、その機能について解明していくことが必要であると考えられる。例えば、GRP-R 遺伝子欠損マウスが 45 週齢を過ぎると有意な体重増加を示すことから、摂食中枢のある視床下部を中心に、GRP-R 発現パターンや共発現する肥満関連因子の存在を明らかにしていかなければならない。さらに、これまでラットを用いた研究報告が多いことから、本研究で得られた抗 GRP-R 抗体のラットでの有用性についても検討しなければならない。

本研究によって、組織化学的に GRP-R 免疫陽性細胞の一部が GABA 作動性ニューロンであることが確認されたが、さらに、GABA 以外の神経伝達物質（グルタミン、セロトニン等）の関与について検討し、電気生理学的手法を用いて、機能的にも両者の関係を明らかにする必要がある。

さらにヒトへの応用として、GRP-R 遺伝子欠損マウスにおいて、恐怖記憶の保持の延長が観察されることから、心的外傷後ストレス障害 (Posttraumatic stress disorder:PTSD) の原因解明に繋がる可能性が期待できる。GRP の作動薬や拮抗薬を、GRP-R 遺伝子欠損マウス以外のマウスについて、特に恐怖条件付け試験において異常を呈するマウスに投与することにより、PTSD の治療薬としての有用性を検討し、さらには治療に有用な投与方法、より強力な作動薬や拮抗薬ペプチドの探索・設計などをバイオインフォマティクスによるアプローチを含めて検討していかなければならない

と考えている。

## 参考文献

- [1] A. Anastasi, V. Erspamer and M. Bucci, Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*, *Experientia* 27 (1971) 166-7.
- [2] N. Andrews, B. Davis, M.I. Gonzalez, R. Oles, L. Singh and A.T. McKnight, Effect of gastrin-releasing peptide on rat hippocampal extracellular GABA levels and seizures in the audiogenic seizure-prone DBA/2 mouse, *Brain Res* 859 (2000) 386-9.
- [3] J.F. Battey, J.M. Way, M.H. Corjay, H. Shapira, K. Kusano, R. Harkins, J.M. Wu, T. Slattery, E. Mann and R.I. Feldman, Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 395-9.
- [4] A.H. Coons, E.H. Leduc and J.M. Connolly, Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit, *J Exp Med* 102 (1955) 49-60.
- [5] Z. Fathi, M.H. Corjay, H. Shapira, E. Wada, R. Benya, R. Jensen, J. Viallet, E.A. Sausville and J.F. Battey, BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells, *J Biol Chem* 268 (1993) 5979-84.
- [6] J.F. Flood and J.E. Morley, Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing, *Brain Res* 460 (1988) 314-22.
- [7] V. Gorbulev, A. Akhundova, H. Buchner and F. Fahrenholz, Molecular cloning of a new bombesin receptor subtype expressed in uterus during pregnancy, *Eur J Biochem* 208 (1992) 405-10.
- [8] L.L. Hampton, E.E. Ladenheim, M. Akeson, J.M. Way, H.C. Weber, V.E. Sutliff, R.T. Jensen, L.J. Wine, H. Arnheiter and J.F. Battey, Loss of bombesin-induced feeding suppression in gastrin-releasing

- peptide receptor-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 3188-92.
- [9] C.A. Jennings, D.C. Harrison, P.R. Maycox, B. Crook, D. Smart and G.J. Hervieu, The distribution of the orphan bombesin receptor subtype-3 in the rat CNS, *Neuroscience* 120 (2003) 309-24.
- [10] G.S. Kroog, E. Sainz, P.J. Worland, M.A. Akeson, R.V. Benya, R.T. Jensen and J.F. Battey, The gastrin-releasing peptide receptor is rapidly phosphorylated by a kinase other than protein kinase C after exposure to agonist, *J Biol Chem* 270 (1995) 8217-24.
- [11] E.E. Ladenheim, R.T. Jensen, S.A. Mantey and T.H. Moran, Distinct distributions of two bombesin receptor subtypes in the rat central nervous system, *Brain Res* 593 (1992) 168-78.
- [12] E.E. Ladenheim, L.L. Hampton, A.C. Whitney, W.O. White, J.F. Battey and T.H. Moran, Disruptions in feeding and body weight control in gastrin-releasing peptide receptor deficient mice, *J Endocrinol* 174 (2002) 273-81.
- [13] A.M. Lebacqz-Verheyden, J. Trepel, E.A. Sausville and J.F. Battey, *Bombesin and gastrin-releasing peptide: Neuropeptides, secretagogues, and growth factors.*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990, 71-124 pp.
- [14] J.E. LeDoux, Emotion circuits in the brain, *Annu Rev Neurosci* 23 (2000) 155-84.
- [15] T.J. McDonald, H. Jornvall, G. Nilsson, M. Vagne, M. Ghatei, S.R. Bloom and V. Mutt, Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue, *Biochem Biophys Res Commun* 90 (1979) 227-33.
- [16] N. Minamino, K. Kangawa and H. Matsuo, Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord, *Biochem Biophys Res Commun* 114 (1983) 541-8.
- [17] T.W. Moody, R. Getz, T.L. O'Donohue and J.M. Rosenstein, Localization of receptors for bombesin-like peptides in the rat brain,

- Ann N Y Acad Sci 547 (1988) 114-30.
- [18] R.Y. Moore, J.C. Speh and R.K. Leak, Suprachiasmatic nucleus organization, *Cell Tissue Res* 309 (2002) 89-98.
- [19] H. Ohki-Hamazaki, K. Watase, K. Yamamoto, H. Ogura, M. Yamano, K. Yamada, H. Maeno, J. Imaki, S. Kikuyama, E. Wada and K. Wada, Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity, *Nature* 390 (1997) 165-9.
- [20] A. Pert, T.W. Moody, C.B. Pert, L.A. Dewald and J. Rivier, Bombesin: receptor distribution in brain and effects on nociception and locomotor activity, *Brain Res* 193 (1980) 209-20.
- [21] A. Rashidy-Pour and M.E. Razvani, Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage, *Brain Res* 814 (1998) 127-32.
- [22] R. Roesler, M.I. Kopschina, R.M. Rosa, J.A. Henriques, D.O. Souza and G. Schwartzmann, RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats, *Eur J Pharmacol* 486 (2004) 35-41.
- [23] R. Roesler, D. Lessa, R. Venturella, M.R. Vianna, T. Luft, J.A. Henriques, I. Izquierdo and G. Schwartzmann, Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation, *Eur J Neurosci* 19 (2004) 1041-5.
- [24] R.C. Rogers and D.L. Fryman, Direct connections between the central nucleus of the amygdala and the nucleus of the solitary tract: an electrophysiological study in the rat, *J Auton Nerv Syst* 22 (1988) 83-7.
- [25] P. Sah, E.S. Faber, M. Lopez De Armentia and J. Power, The amygdaloid complex: anatomy and physiology, *Physiol Rev* 83 (2003) 803-34.
- [26] Y. Santo-Yamada, K. Yamada and K. Wada, Posttraining

- administration of gastrin-releasing peptide improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice, *Physiol Behav* 74 (2001) 139-43.
- [27] Y. Santo-Yamada, K. Yamada, E. Wada, Y. Goto and K. Wada, Blockade of bombesin-like peptide receptors impairs inhibitory avoidance learning in mice, *Neurosci Lett* 340 (2003) 65-8.
- [28] G.P. Shumyatsky, E. Tsvetkov, G. Malleret, S. Vronskaya, M. Hatton, L. Hampton, J.F. Battey, C. Dulac, E.R. Kandel and V.Y. Bolshakov, Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear, *Cell* 111 (2002) 905-18.
- [29] E.R. Spindel, E. Giladi, P. Brehm, R.H. Goodman and T.P. Segerson, Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor, *Mol Endocrinol* 4 (1990) 1956-63.
- [30] E. Wada, J. Way, A.M. Lebacqz-Verheyden and J.F. Battey, Neuromedin B and gastrin-releasing peptide mRNAs are differentially distributed in the rat nervous system, *J Neurosci* 10 (1990) 2917-30.
- [31] E. Wada, J. Way, H. Shapira, K. Kusano, A.M. Lebacqz-Verheyden, D. Coy, R. Jensen and J. Battey, cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor, *Neuron* 6 (1991) 421-30.
- [32] E. Wada, S. Wray, S. Key and J. Battey, Comparison of gene expression for two distinct bombesin receptor subtypes in postnatal rat central nervous system, *Molecular and Cellular Neurosciences* 3 (1992) 446-460.
- [33] E. Wada, K. Watase, K. Yamada, H. Ogura, M. Yamano, Y. Inomata, J. Eguchi, K. Yamamoto, M.E. Sunday, H. Maeno, K. Mikoshiba, H. Ohki-Hamazaki and K. Wada, Generation and characterization of mice lacking gastrin-releasing peptide receptor, *Biochem Biophys*



Res Commun 239 (1997) 28-33.

- [34] 渡辺慶一、中根一穂、改訂三版 酵素抗体法 一卷、学際企画
- [35] C.L. Williams and J.L. McGaugh, Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius, *Brain Res* 654 (1994) 251-6.
- [36] K. Yamada, E. Wada, M. Yamano, Y.J. Sun, M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu and K. Wada, Decreased marble burying behavior in female mice lacking neuromedin-B receptor (NMB-R) implies the involvement of NMB/NMB-R in 5-HT neuron function, *Brain Res* 942 (2002) 71-8.

## 謝辞

本学位論文作成のため、研究指導を下さった木村一郎先生、そして快く副査を引き受けて下さった、小室輝晶先生、山内兄人先生に感謝致します。また、国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部において、実験指導を下さった和田圭司先生、和田恵津子先生、関口正幸先生、青木俊介先生、いろいろと教えて下さった古田晶子先生、鮎川幸一先生、王玉来先生、山田祐子先生、西川香里先生、青木公三子先生、佐野野衣先生、実験の補助を下さった菊地寿枝先生、佐藤栄一先生、いつも励まして下さった吉田瑞子先生、原洋子先生、権仲基先生に心から御礼申し上げます。そして、国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部の皆様、早稲田大学 木村研究室の皆様には大変お世話になりました。本当にありがとうございました。

表 1. マウス脳における GRP-R の発現パターン

部位	GRP-R 免疫陽性反応
大脳皮質( I 層-VI 層)	+
<b>海馬</b>	
CA1 領域	+
CA2 領域	++
CA3 領域	+
歯状回	+
<b>梨状皮質</b>	+++
<b>扁桃核</b>	
内側核	++
海馬領域	+
皮質核	+
外側嗅索核	+
中心核	+
外側核	+
基底外側核	++
基底内側核	++
介在核	+
<b>脳幹</b>	
弧束核	++

GRP-R 免疫陽性反応について、弱い反応は (+)、中程度の反応は (++)、強い反応は (+++) である。

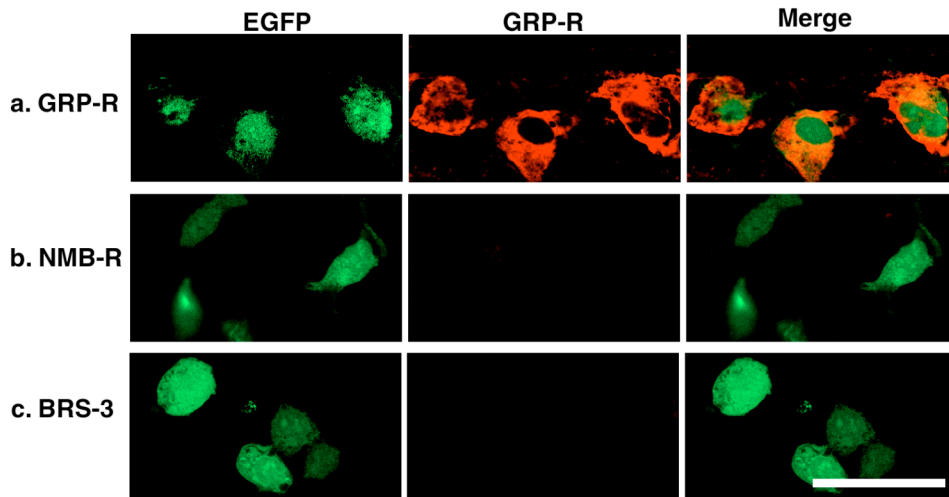
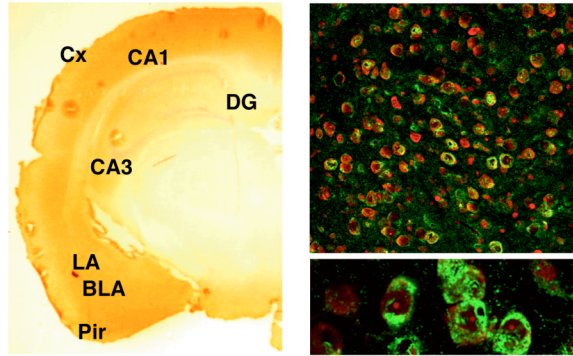


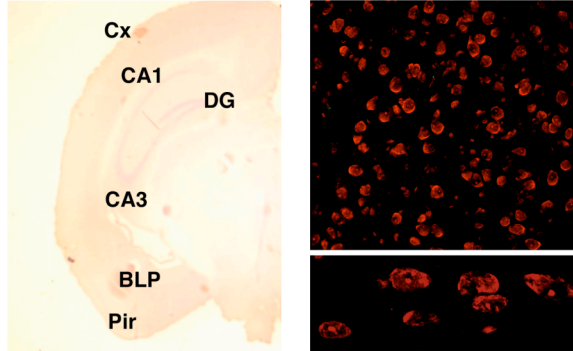
図 1. 細胞の免疫染色による抗 GRP-R 抗体の特異性の確認

抗 GRP-R 抗体の特異性と他のポンペシン受容体との交差性を確認するために、GRP-R、NMB-R、BRS-3 の cDNA をそれぞれ pIRES-EGFP プラスミド DNA に挿入し、COS-7 細胞にトランスフェクションして免疫染色を行った。(a) は GRP-R/pIRES-EGFP、(b) は NMB-R/pIRES-EGFP、(c) は BRS-3/pIRES-EGFP を導入した細胞である。左は緑色の EGFP を発現している細胞像、中央は抗 GRP-R 抗体による免疫染色像、右はそれらの像を重ねたものである。この結果、GRP-R/pIRES-EGFP が導入された EGFP 陽性細胞の細胞でのみ GRP-R 免疫陽性反応（赤色）が観察された。スケールバーは、50 $\mu$ m である。

a. 野生型マウス



b. GRP-R遺伝子欠損マウス



c. 抗原ペプチドによる抗体吸収

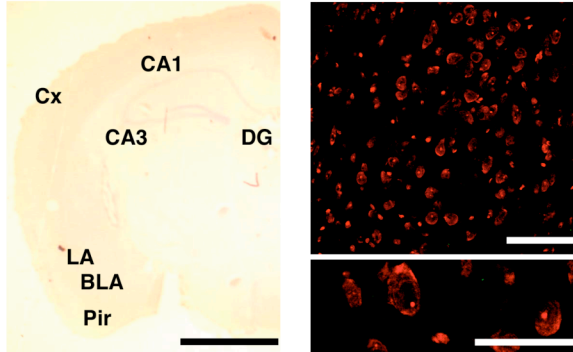


図2. マウス脳組織の免疫染色による抗GRP-R抗体の特異性の確認

組織レベルでの抗GRP-R抗体の特異性を確認するために、マウス脳を用いた免疫染色を行った。左がDAB染色像、右が蛍光染色像である。各蛍光染色像の上段は扁桃体基底外側核の像、下段はその一部を拡大したものである。抗GRP-R抗体による免疫染色は緑色、核染色は赤色で示されている。上から、(a)は野生型マウス、(b)はGRP-R遺伝子欠損マウス、(c)は抗原ペプチドによる抗体吸収実験についての結果である。DAB染色、蛍光染色ともにGRP-R遺伝子欠損マウスにおいてはGRP-R免疫陽性反応は観察されなかった。また、抗原ペプチドによる抗体吸収実験においても、GRP-R免疫陽性反応は観察されなかった。略語は BLA: 扁桃体基底外側核の前域、BLP: 扁桃体基底外側核の後域、CA1: 海馬CA1領域、CA3: 海馬CA3領域、Cx: 大脳皮質、DG: 歯状回、LA: 扁桃体外側核、Pir: 梨状皮質である。スケールバーは、それぞれ2mm (DAB染色)、100 $\mu$ m (蛍光染色の上段)、50 $\mu$ m (蛍光染色の下段) である。

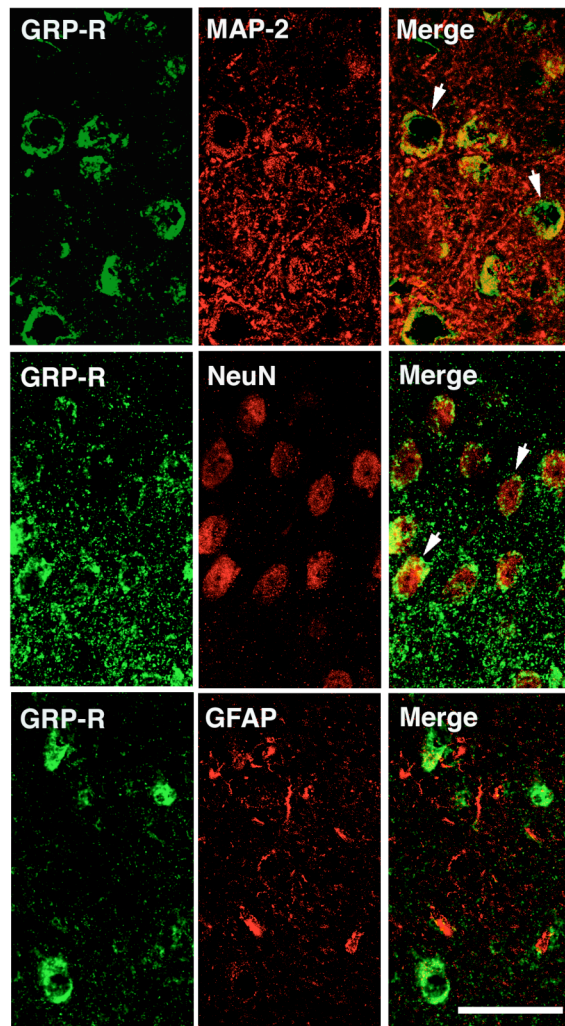
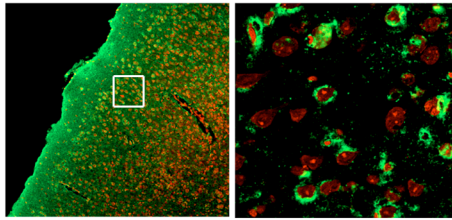


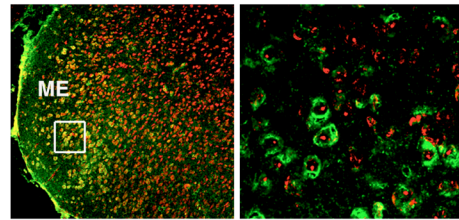
図3.二重免疫染色によるGRP-R免疫陽性細胞の染色特異性についての検討

GRP-R免疫陽性細胞の染色特異性を調べるために、各種神経マーカーの抗体を用いて二重染色を行った。左の緑色に染まっている細胞がGRP-R免疫陽性細胞像、中央の赤色に染まっている細胞が各種神経マーカー免疫陽性細胞像、右はそれらを重ねた像である。中央のものについては、上段はニューロンに特異的な抗MAP-2抗体、中段はニューロンの核に特異的な抗NeuN抗体、下段はアストロサイトに特異的な抗GFAP抗体を使用した免疫染色像である。この図では扁桃体基底外側核の染色像を示している。GRP-R免疫陽性細胞はMAP-2およびNeuNについては免疫陽性であったが（矢印）、GFAPについては免疫陽性ではなかった。スケールバーは、50 $\mu$ mである。

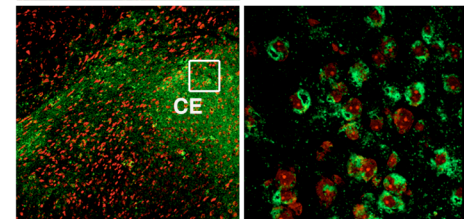
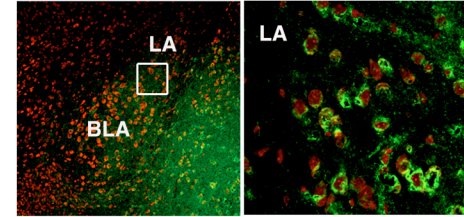
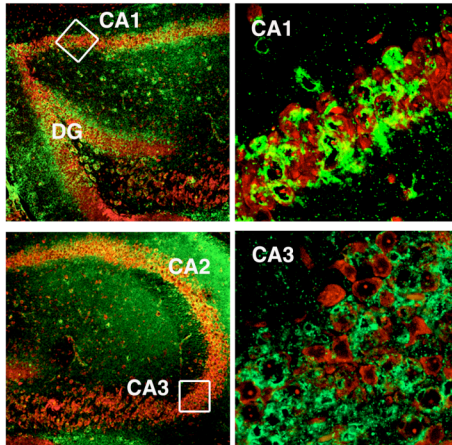
### A. 大脳皮質



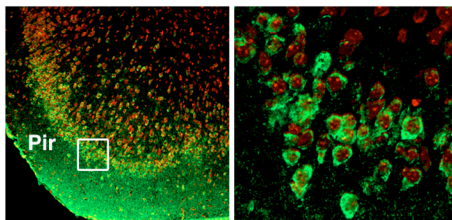
### D. 扁桃体



### B. 海馬



### C. 梨状皮質



### E. 脳幹

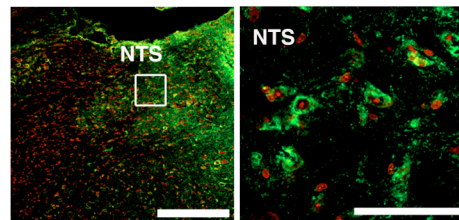


図4. マウス脳におけるGRP-Rの発現パターン

マウス脳におけるGRP-Rの発現パターンを調べたところ、広範囲にその発現が観察された。A~Eのそれぞれの右の写真は、左の写真の四角で囲んだ部分を拡大したものである。緑色に染まっているのはGRP-R免疫陽性細胞像、赤色に染まっているのは細胞核である。GRP-R免疫陽性細胞は、大脳皮質の全層 (A)、海馬のCA1、CA2、CA3領域と歯状回 (B)、梨状皮質 (C)、扁桃体の内側核、外側核および中心核 (D)、脳幹の孤束核 (E)においてそれぞれ観察された。略語はBLA: 扁桃体基底外側核、CA1: 海馬CA1領域、CA2: 海馬CA2領域、CA3: 海馬CA3領域、CE: 扁桃体中心核、DG: 歯状回、LA: 扁桃体外側核、ME: 扁桃体内側核、NTS: 孤束核、Pir: 梨状皮質である。スケールバーは、それぞれ200 $\mu$ m (右側)、50 $\mu$ m (左側) である。

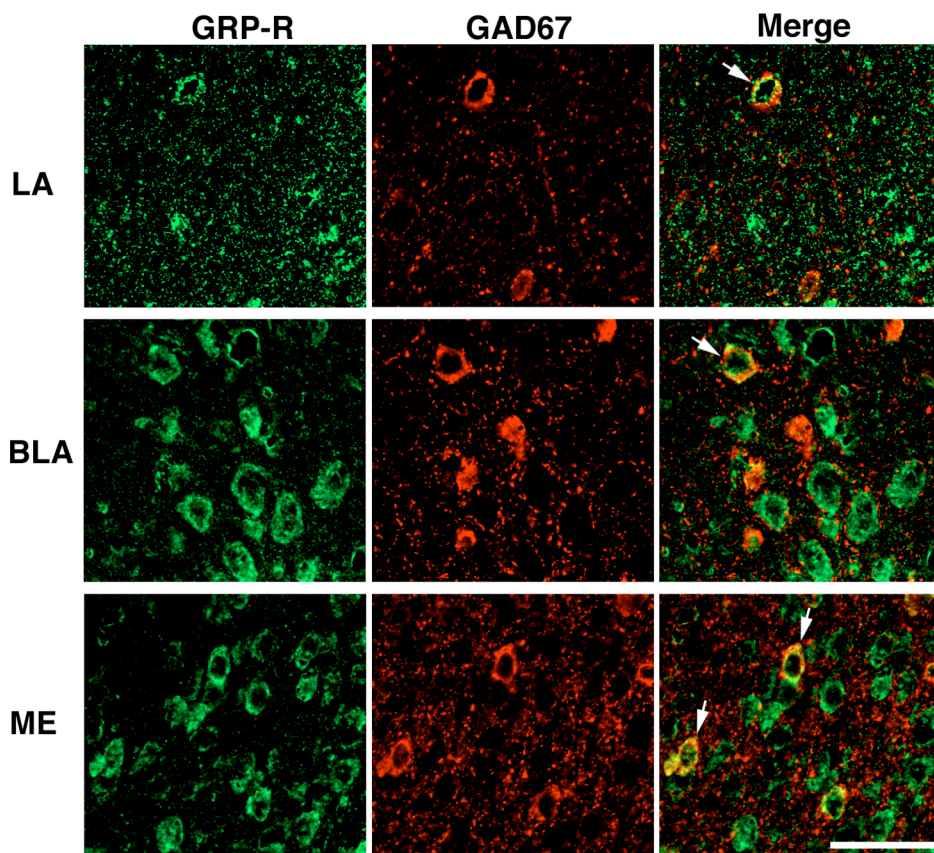


図5.GRP-R免疫陽性細胞のGABA免疫反応性

GRP-R免疫陽性細胞におけるGABA免疫反応性を調べるために、抗GRP-R抗体とGABA作動性ニューロンに特異的な抗GAD67抗体とを用いた二重免疫染色を行った。ここでは、扁桃体についての結果を示す。左の緑色に染まっているものがGRP-R免疫陽性細胞、中央の赤色に染まっているものはGAD67免疫陽性細胞、右はそれらの像を重ねたものである。上段は外側核 (LA)、中段は基底外側核 (BLA)、下段は内側核 (ME) についてのものである。GRP-R免疫陽性細胞の一部はGAD67免疫陽性であった (矢印)。スケールバーは、50 $\mu$ mである。