

2005年1月11日

人間科学研究科委員長殿

上地さり氏 博士学位申請論文審査報告書

上地さり氏の学位申請論文について、下記の審査委員会は人間科学研究科の委嘱を受け審査してまいりましたが、2004年12月14日に審査を終了しましたので、ここにその結果をご報告いたします。

記

1. 申請者氏名 上地さり
2. 論文題目名 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
3. 本論文の要旨

本研究は、これまで多くの努力にもかかわらず成功するに至っていなかった、免疫組織化学的手法に適した抗ガストリン放出ペプチド受容体(GRP-R)抗体の作製を試み、これまで記憶に関わると報告されている海馬・扁桃体を中心にマウス脳における GRP-R タンパク質の発現パターンについて解析を行うことを目的としたものである。

第1章「序論」では、まず免疫組織化学的手法を用いた研究が細胞・組織の構造と機能の関連を解明する上で、極めて重要であり不可欠な手法である点について解説している。また従来の行動学的解析によって明らかとなったボンベシン/ガストリン放出ペプチド(GRP)が有する記憶保持効果について述べ、これまで免疫組織染色に使用可能な抗体がなかったため、生体内における GRP-R タンパク質の発現パターンが未だ明らかにされていないことを指摘し、免疫組織化学的手法に適した抗 GRP-R 抗体の作製が持つ意義と位置付けについて述べている。

第2章「材料と方法」では、抗 GRP-R 抗体の作製方法と、抗体の特異性の証明や脳組織における GRP-R の発現パターンの解明のために用いた免疫染色法を含む、本研究で用いられた様々な手技について述べている。

第3章「結果」では、作製した抗体の特異性を細胞レベル・組織レベルで明確にし、脳組織、特に大脳辺縁系における GRP-R タンパク質の発現パターンについて述べている。まず GRP-R 遺伝子導入により GRP-R を強制発現させた COS-7 細胞を作製した抗 GRP-R 抗体で免疫染色し、免疫陽性反応を観察した。またこれらの免疫陽性反応は GRP-R とアミノ酸レベルで高い相同性を示すニューロメジン B 受容体(NMB-R)およびボンベシン受容体サブタイプ3(BRS-3)を強制発現させた COS-7 細胞では認められないことを明確に示した。さらに GRP-R 遺

伝子欠損マウスと野生型マウスの脳組織を用いて免疫染色性を検討し、GRP-R 免疫陽性反応が野生型マウス脳組織でのみ認められることを示した。以上のことから、作製した抗 GRP-R 抗体が免疫組織染色に使用可能な GRP-R に特異的なものであることを確認した。さらに GRP-R 免疫陽性細胞がニューロンに特異的な抗 MAP-2 抗体およびニューロンの核に特異的な抗 NeuN 抗体に対しては免疫陽性であるが、アストロサイトに特異的な抗 GFAP 抗体に対しては陰性であったことから、GRP-R は主としてニューロンに発現していることを確認した。

次に抗 GRP-R 抗体を用いて、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検討を行い、GRP-R 免疫陽性反応が大腦皮質、海馬、扁桃体、視床下部、脳幹と広範囲に観察されることを示し、大腦皮質においては全層で、また海馬においては CA1・CA2・CA3 領域の錐体細胞層と歯状回の顆粒細胞層で観察されることを明らかにした。さらに梨状皮質と背側内梨状皮質において強い GRP-R 免疫陽性反応が観察され、扁桃体では多くの神経核において広範囲に GRP-R 免疫陽性細胞が認められることを示し、また扁桃体の各神経核についての詳細な解析により、GRP-R 免疫陽性反応が基底外側、基底内側核、内側核、外側核、中心核や、皮質核等の大部分の神経核で観察されることを明らかにした。脳幹においても孤束核や網様核、楔状束核、迷走神経背側核などを含む広い範囲で GRP-R 免疫陽性反応を観察し、これらの結果により、従来の行動学的な研究により、記憶調節に関与すると報告されている海馬や扁桃体を含む多くの領域で GRP-R タンパク質が発現していることを明らかにした。

さらに、近年 GRP-R が GABA 作動性ニューロンを調節することによって記憶に関わっている可能性が薬理的・電気生理学的手法により示唆されていることに注目して、GABA 作動性ニューロンに特異的な抗 GAD67 抗体と抗 GRP-R 抗体による二重染色を行い、海馬や扁桃体外側核、基底外側核、内側核、中心核などを含む多くの神経核において、GRP-R 免疫陽性細胞の一部が GAD67 免疫陽性の、つまり GABA 作動性のニューロンであることを明らかにした。

第 4 章「考察」では、第 2 章と第 3 章の「方法」と「結果」について考察し、今後の研究の展開、および本研究の成果が持つ意義について展望している。

まず作製した抗 GRP-R 抗体の特異性が *in vitro* と *in vivo* の両方で確認され、特に *in vivo* では違った領域を不活化した 2 種類の GRP-R 遺伝子欠損マウスの脳組織を用いて検証した点が、その特異性を強く証明するものであると結論づけている。

次に、本研究で明らかにされた GRP-R タンパク質の発現パターンを、*in situ* hybridization 法により既に報告されている GRP-R mRNA や GRP mRNA の発現パターン、さらにはオートラジオグラフィ法によって示されている ¹²⁵I-ボンベシン結合部位と比較して考察を加えている。その結果、それらは概ね一致しているが、一部の神経核、領域におけるわずかな不一致を認め、これが動物種や実験手技の違いによるものである可能性を考察している。さらに発現細胞の特異性を二重染色法によって解明できる免疫組織化学的手法の利点について触れている。

また本研究は、従来の研究により報告されてきた聴覚性恐怖条件付け学習試験における

扁桃体外側核での GRP-R の発現の重要性について、外側核以外の、恐怖条件付け学習に関わる扁桃体の多くの神経核で GRP-R が発現し、GRP-R 発現細胞の一部が GABA 作動性ニューロンであることを示した。このことから、扁桃体の多くの神経核において、外側核と同様に GRP-R が GABA のリリースを調整することによって、恐怖条件付けにおける恐怖記憶の増強・保持に関与している可能性を示唆した。

今後の研究の展望として、GRP-R KO マウス以外の、恐怖条件付け試験において異常を呈するマウスにおいて、GRP-R の発現量に変化があるのか、また GRP の作動薬や拮抗薬などをマウスに投与したとき、異常行動が改善されるのか、といった点を検討することにより、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の治療法の開発につながる可能性も示唆した。

さらに、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や非攻撃性社会行動の増加を呈することなどの報告と関連して、本研究で作製した抗体を用いた解析が摂食行動や社会行動などを含む様々な機能を解析する上でも、重要なものであると示唆している。

本研究の成果がもつ意義については、抗 GRP-R 抗体を用いた免疫組織化学的解析が、記憶だけでなく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上で重要かつ有望な手段の一つであると展望している。

以上の諸点から、本研究は世界で初めて作製された抗 GRP-R 抗体の有用性を示し、免疫組織化学的手法を用いて従来解明できなかった内在性 GRP-R タンパク質の発現部位を明らかにしたのものとして高く評価できるものである。よって博士 (人間科学) の学位論文として価値あるものと認める。

以 上

上地さり氏博士学位申請論文審査委員会

審査委員

(主査)	早稲田大学人間科学部 教授 理学博士 (東京大学)	木村一郎
	早稲田大学人間科学部 教授 医学博士 (九州大学)	小室輝昌
	早稲田大学人間科学部 教授 医学博士 (順天堂大学)	山内兄人
	国立精神・神経センター 神経研究所	
	疾病研究第四部 部長 医学博士 (大阪大学)	和田圭司