

京都大学	博士（医学）	氏名	木村 健介
論文題目	Pathway-specific engagement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses (コカイン誘発行動における黒質網様部での ephrinA5-EphA4/EphA5 システムの回路特異的な働き)		
(論文内容の要旨)			
<p>側坐核は報酬行動や薬物依存に関わる重要な神経核であり、側坐核からの入力には直接路、間接路と呼ばれる2つの経路を介して黒質網様部へ到達する。これらの入力は黒質網様部で統合され、大脳基底核-視床-大脳皮質を結ぶ神経回路の調節に関わる。</p> <p>しかし、統合された情報の処理に関わる分子メカニズムはこれまで明らかにされていなかった。</p> <p>本研究では可逆的かつ特異的に神経伝達を遮断する技術（reversible neurotransmission blocking: RNB法）を用いて、黒質網様部における神経回路特異的な情報処理機構の解析を行った。</p> <p>1) RNB法を用いて直接路を特異的に遮断したD-RNBマウス、間接路を特異的に遮断したI-RNBマウスを作成し、黒質網様部での遺伝子発現の変化を観察した。</p> <p>コカイン投与1時間後（コカイン急性期）の野生型マウス、D-RNBマウス、I-RNBマウスのそれぞれの黒質網様部をマイクロアレイで解析、D-RNBマウス特異的に発現が上昇する遺伝子として、ephrin-Eph受容体シグナルに関わる分子を同定した（ephrinA5、EphA4、EphA5）。これらの3つの遺伝子発現は、コカイン急性期、コカインの連日投与後（コカイン慢性期）の両方で、D-RNBマウス特異的に上昇していることを定量的PCRで確認した。生理食塩水を投与したマウスでは遺伝子発現の変化は観察されなかった。これらの結果から、ephrin-Eph受容体シグナル分子の発現がコカイン急性期、慢性期の両方でD-RNBマウス特異的に上昇していることが分かった。</p> <p>2) 次にephrinA5、EphA4、EphA5の黒質網様部における発現を免疫組織染色で調べた。黒質網様部のGABA作動性抑制性ニューロンではephrinA5、EphA4、EphA5の全てが発現していた。またアストロサイトにはEphA4とEphA5が発現していた。さらに黒質網様部ニューロンの80%以上で、これら3つの分子が共発現していた。</p> <p>3) D-RNBマウスではコカイン依存形成に関わる適応反応が抑制される。そこでephrinA5、EphA4、EphA5のシグナル経路を活性化したときのコカインによる適応反応の抑制の有無を調べた。ヒトIgGのFc領域とephrinA5、EphA4、EphA5の細胞外ドメインを融合させたイムノアドヘジンを、野生型マウスの両側黒質網様部に投与し、コカイン連日投与における移所行動量を測定した。対照としてヒトIgGを投与したマウスではコカイン連日投与により、</p>			

移所行動量が上昇する逆耐性現象が観察されたが、ephrinA5-Fc、EphA4-Fc、EphA5-Fcを投与したマウスでは、コカイン投与による移所行動量の上昇が抑制された。この結果、ephrin-Eph受容体シグナルがコカイン依存形成に関わる適応反応に拮抗的な働きをしていることが分かった。

4) ephrinA5はEph受容体からの刺激により、下流のMAPキナーゼであるErk1/2をリン酸化する。そこでコカインを投与したマウスの黒質網様部に対してephrinA5抗体とリン酸化Erk1/2抗体の二重免疫染色を行った。その結果、コカイン急性期、慢性期のD-RNBマウス特異的にephrinA5陽性細胞におけるリン酸化Erk1/2陽性細胞の割合が約2倍に増加していた。生理食塩水を投与したマウスではリン酸化Erk1/2陽性細胞の増加は見られなかった。この結果から、Erk1/2のリン酸化がephrinA5の下流で関与していることを示した。

以上の結果から、黒質網様部における直接路特異的かつコカイン投与依存的なephrin-Eph受容体シグナル分子の発現上昇及びErk1/2の活性化、またこのシグナル経路がコカインによる行動変化に対して拮抗的に作用していることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は黒質網様部での情報処理に関わる分子メカニズムを解明する目的で、線条体直接路ニューロン、間接路ニューロンのそれぞれの神経伝達を選択的に遮断する系を用いて、行動実験及び分子生物学的解析を行ったものである。

申請者は直接路遮断マウス、間接路遮断マウス、野生型マウスのそれぞれの黒質網様部で、コカイン投与時の遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。その結果、コカイン誘発行動が抑制される直接路遮断マウスの黒質網様部でのみ、コカイン投与時にephrinA5、EphA4、EphA5の遺伝子発現が上昇していることを示した。また黒質網様部においてEphA4、EphA5による刺激がコカイン誘発行動を抑制することを示した。さらに直接路遮断マウスの黒質網様部ephrinA5陽性細胞では、コカイン投与によりephrinA5の下流にあるErk1/2のリン酸化陽性細胞の割合が増加することを示した。

以上の研究はコカイン誘発行動における直接路特異的なephrinA5-EphA4/EphA5システムの神経回路特異的な働きを示すことにより、コカイン投与時における黒質網様部での情報処理に関わる分子メカニズムの解明に貢献し、薬物依存症の病態解明、治療法の開発に寄与するところが多い。

従って本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は平成23年8月12日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降