

氏名	たき 瀧	こう 公	すけ 介
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)		
学位記番号	医 博 第 2621 号		
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻	医学研究科脳統御医科学系専攻		
学位論文題目	A group of cortical interneurons expressing $\mu$ -opioid receptor-like immunoreactivity: a double immunofluorescence study in the rat cerebral cortex. (二重蛍光染色法を利用したラット大脳皮質におけるミューオピオイドレセプターを発現する介在ニューロンの一群に関する研究)		
論文調査委員	(主査) 教授 井出千東	教授 中西重忠	教授 金子武嗣

### 論 文 内 容 の 要 旨

中枢神経系に発現するオピオイドレセプターは薬理的にデルタ、カッパ、ミューの3型に分けられているが、その中でもミューオピオイドレセプター (MOR) はモルヒネに対して最も高い親和性があることで知られている。モルヒネは哺乳動物の大脳皮質ではアセチルコリンの分泌を抑制することが知られており、従ってアセチルコリン作動性ニューロンがモルヒネに対するレセプターを持っていることが示唆されていた。組織学的には最初はオートラジオグラフィで大脳皮質に確認されていたミュー型結合部位は、近年 MOR の cDNA クローニングがなされてからは *in situ* ハイブリダイゼーションでその mRNA を発現するニューロンの存在が確認された。

本研究では、MOR のカルボキシル末端を認識する抗体を作成し、ラット大脳皮質内の MOR 様免疫活性の分布を調べた。MOR 免疫陽性細胞は形態的には小型で双極性の細胞体を持ち、主に垂直方向に発達した樹状突起を持つ非錐体ニューロンであったが、VI層に分布しているものには多極性の形態を示すものがあつた。しかし、主として分布が見られるのはI~IV層であり、その中でも浅い層に多い傾向があつた。MOR 免疫活性細胞の個数は前頭・頭頂葉領域における 20 $\mu$ m 厚の前額切片二枚あたり 303 $\pm$ 59 (平均 $\pm$ 標準偏差)であり、大脳皮質の局所間で皮質内の分布様式には本質的な差はなかつた。

GABA に対する抗体との2重染色によって97%に上る MOR 免疫陽性細胞が GABA 陽性であることが確認され、MOR は抑制性の GABA 作動性ニューロンの一部に発現していることが示唆された。さらに、GABA 作動性ニューロンのサブグループのマーカーと考えられている分子との共存性については、MOR 免疫陽性細胞のそれぞれ92%, 79%, 67%, 35%, 35%が、血管作用性小腸ペプチ (VIP), 副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF), コリンアセチルトランスフェラーゼ (CAT), カルレチニン, コレシストキニンなどのマーカー分子の免疫活性を示した。一方で、パルブアルブミンやソマトスタチン, カルビンディン, ニューロペプチド Y, 一酸化窒素合成酵素 (NOS) の免疫活性を示したものは10%以下であつた。

また、大脳皮質内で産生され MOR の内因性基質として作用するエンケファリンの前駆体になっているタンパク質にはプレプロエンケファリン (PPE) やプレプロダイノルフィン (PPD) があるが、これらと MOR の2重蛍光抗体染色の結果、MOR 陽性細胞は PPE と非常に高い共存性を示す一方、PPD との共存はほとんど見られないことが分かつた。

ラットの大脳皮質の GABA 陽性の非錐体ニューロンは化学的には3つのサブグループに分かれることが報告されており、第1の群はパルブアルブミンを発現し、第2の群はソマトスタチン, カルビンディン, ニューロペプチド Y, そして NOS を有し、第3の群は VIP, CRF, CAT, カルレチニン, コレシストキニンなどのうちのひとつあるいは複数で標識される。今回の二重染色の結果から VIP をはじめ CRF, CAT, カルレチニン, コレシストキニンなどで標識される上記第3群の GABA 作動性ニューロンにはほぼ局限して MOR が発現することが示唆された。また、エンケファリンの前駆体である PPE が MOR 免疫陽性ニューロンに発現していたことから、PPE から作られたエンケファリンとその受容体である MOR はア

セチルコリンの分泌に関して単一ニューロンレベルあるいは細胞群レベルでフィードバック抑制を行っていると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では、 $\mu$ オピオイドレセプター (MOR) のカルボキシル末端を認識する抗体を用い、ラット大脳皮質内の MOR 様免疫活性をもつニューロンについてその特徴を解析した。MOR 免疫陽性ニューロンは形態的には主として小型で双極性の細胞体を持ち主に垂直方向に発達した樹状突起を持つ非錐体ニューロンであった。大脳新皮質内では II ~ VI 層に確認されるが主として II ~ IV 層に分布し、その中でも浅い層に多い傾向があった。次に、二重蛍光免疫染色によって MOR 陽性ニューロンのほとんどが GABA 作動性ニューロンに属すること、大多数のコリン作動性かつ GABA 作動性皮質ニューロンが MOR を発現していることが示された。さらに GABA 作動性ニューロンのサブグループのマーカールとの共存性を解析した結果、血管作用性小腸ペプチド、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、カルレチニン、コレシストキニンなどで標識される GABA 作動性ニューロンの一群にはほぼ限局して MOR が発現することが示唆された。また、プレプロエンケファリンと MOR が同一の皮質ニューロンに非常に高い確率で共発現していることが発見され、プレプロエンケファリンから作られたエンケファリンとその受容体である MOR はアセチルコリンの分泌に関して単一ニューロンレベルあるいは細胞群レベルでフィードバック抑制を行っていると考えられた。

以上の研究はオピオイドの中樞神経系における作用機序の解明に貢献するとともに大脳皮質の組織学的特徴を明らかにする上でも寄与するところが多い。したがって本論文は博士 (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15年3月10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。