

研究要旨 脳に特異的な神経調節機構の存在を明らかにすることは脳疾患に対する特異的治療法の確立にも繋がる。昨年度の本研究実施中、尾状核におけるドパミン神経終末に L 型の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの存在と生理意義を示唆した。本研究は神経終末が付着した脳の単離神経を切片から摘出可能な新たな方法を駆使して、Mynert 神経系における神経終末の「脳型」の L 型の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを見出し、生理学的機能として GABA の自発放出への関与、更には特異性を明らかにした。

A. 研究目的

神経終末では神経伝達物質の放出に関連する Ca^{2+} チャンネルが存在することは周知であるが、一般的に L 型の存在は否定的であった。近年、L 型 Ca^{2+} チャンネルの刺激薬である BAYK8644 (BAYK) を尾状核内に投与すると、用量依存的な行動量の増加と異常な DA 量の増量が認められた。さらに、尾状核における DA 量の変動を蛍光組織化学法で検索すると、DA 量が異常放出される BAYK 適用 20 分後には DA 蛍光が認められなかった。

B. 研究方法

実体顕微鏡下でスライス脳の目的の部位を振幅幅 0.3-0.5 mm で 50-60Hz の機械的刺激を加えて摘出した単離神経標本に神経終末がついていることを synaptophysin の蛍光抗体法、あるいは電子顕微鏡で確認した。 3×10^{-7} M tetrodotoxin, glutamatergic response の抑制薬である 3×10^{-6} M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) と 10^{-5} M DL-2-amino-5-phosphovaleric acid (DL-APV) を含んだ溶液中で GABA 神経系の自発性 miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSC) を nystatin perforated patch recording 法で記録した。

C. 研究結果

BAYK は自発性 mIPSC の発火頻度を反復性に増強させた。しかも、この増強は適用後 30 秒以内で安定した。BAYK によって amplitude は増強するが、Komogorov-Sminov 法から mIPSC 電流の分布は BAYK 処置で有意な差が認められなかった。更に、BAYK による神経終末からの GABA 遊離は用量依存性であり、しかも、この遊離は amplitude を変化させないことから、シナプス後神経細胞の GABA_A 受容体にはなんらの影響を及ぼさないことも示唆された。付記する

に、N-, P-, Q-型 Ca^{2+} チャンネルの特異的拮抗薬は BAYK による弧束核 GABA 神経系の自発性 mIPSC の発火頻度を部分的に抑制するが完全ではなかった。ところが、L 型 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬のうち、nicardipine と nimodipine は著名に BAYK による弧束核 GABA 神経系の自発性 mIPSC の発火頻度を抑制したが、nifedipine や nilvadipine はなんら影響を及ぼさなかった。

D. 考察

本成績と先の成績を総括すると、脳内での神経終末に存在する L 型 Ca^{2+} チャンネルは、GABA や DA の自発的放出に関与し、神経調節失調時には伝達物質の異常放出を誘発させ重篤な脳疾患を誘発させる。しかも、この L 型 Ca^{2+} チャンネルは「抹消型」と異なり、拮抗薬の親和性に相違を有することが明らかになった。

E. 結論

「脳型」 Ca^{2+} チャンネルに対する特異的薬物の脳組織移行性の研究は新たな脳疾患治療法の確立の礎となると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mirua I, Miyamoto K, Nakamura K, Watanabe Y. Hydrogen peroxide induced chemokine production in the glia-rich cultured cerebellar granule cells under acidosis. *Life Sci* 2002 70: 821-31.

Watanabe Y, Wang ZM, Rhee JS, Lawlor GF, Ishibashi H, Akaie N. Inhibitory effects of 1,4-DHP antagonists on synaptic GABA release modulated by BAY-K8644 in Mechanically dissociated rat substantia innominata. *Life Sci*.

in press, 2002

Yamada Y, Watanabe Y, Zhang J, Haraoka J, and Ito H. Changes in cortical and cerebellar bcl-2 mRNA levels in the developing hydrocephalic rat (LEW-HYR) as measured by a real time quantified RT-PCR. *Neuroscience*,

in press, 2002.

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|---|---|-----|-------------|------|
| Nagata Y., Kusuvara H., Endou H., Sugiyama Y. | Expression and functional characterization of rat organic anion transporter3 (rOat3) in the choroid plexus | Mol Pharmacol | | in press | |
| Sugiyama D.,Kusuvara H.,Shitara Y.,Abe T., Sugiyama Y. | Effect of 17 beta-estradiol-D-17beta-glucuronide on the rat organic anion transporting polypeptide 2-mediated transport differs depending on substrates | Drug Metab Dispos | 30 | 220-223 | 2002 |
| Shitara Y., Sugiyama D., Kusuvara H., Kato Y., Abe T., Meier PJ, Itoh T. Sugiyama Y. | Comparative inhibitory effects of different compounds on rat oat1 (slc21a1)- and Oatp2 (Slc21a5)-mediated transport | Pharm Res | 19 | 147-153 | 2002 |
| Hasegawa M., Kusuvara H., Sugiyama D., Ito K., Ueda S., Endou H., Sugiyama Y. | Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOat3; Slc22a8) in the renal uptake of organic anions | J Pharmacol Exp Ther | 300 | 746-753 | 2002 |
| Kusuvara H., Sugiyama Y. | Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney | J Control Release | 78 | 43-54 | 2002 |
| Radwan A.A., Gouda H., Yamaotsu N., Torigoe H., Hirono S. | Rational procedure for 3D-QSAR analysis using TRNOE experiments and computational methods: application to thermolysin inhibitors | Drug Metab Dispos | 17 | 265-281 | 2001 |
| Yamaotsu N., Suga M., Hirono S. | Molecular dynamics simulation of calmodulin-trifluoperazine complex in aqueous solution | Drug Design and Discovery | 58 | 410-421 | 2001 |
| Yoshii F., Nakamura T., Hirono S., Shimizu Y., Hoshi T., Ando M., Hagiwara H. | Conformational analysis and selection of odor-active conformers: synthesis of molecules designed for the lily-of-the-valley (muguet)-type odor | Helvetica Chimica Acta | 84 | 2051-2063 | 2001 |
| Hippo Y., Taniguchi H., Tsutsumi S., Machida N., Chong JM, Fukuyama M., Kodama T., Aburatani H. | Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays | Cancer Reserch | 62 | 233-240 | 2001 |
| Mukasa A., Ueki K., Matsumoto S.,Tsutsumi S., Nishikawa R., Fujimaki T., Asai A., Kirino T., Aburatani H. | Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p | Oncogene | | in press | 2002 |
| Takahashi M., Tsuboyama-Kasaoka N., Nakatani T., Ishii M., Tsutsumi S., Aburatani H., Ezeaki O. | Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production | Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol | 282 | G338-348 | 2002 |
| Takabe W., Kodama T., Hamakubo T., Tanaka K., Suzuki T., Aburatani H., Matsukawa N., Noguchi N. | Anti-atherogenic antioxidants regulate the expression and function of proteasome α -type subunits in human endothelial cells | J. Biol. Chem. | 276 | 40497-40501 | 2001 |
| Saiura A., Mataka C., Murakami T., Umelani M., Wada Y., Kohro T.,Aburatani H., Haritara Y., Hamakubo T., Yamaguchi T., Hasegawa G., Naito M., Makuuchi M., Kodama T. | A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means dna microarray analysis1 | Transplantation | 72 | 320-329 | 2001 |

| | | | | | |
|---|---|-----------------------|----|----------|------|
| Akiyoshi S., Ishii M., Nemoto N., Kawabata M., Aburatani H., Miyazono K. | Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oligonucleotide arrays | Jpn J Cancer Res | 92 | 257-268 | 2001 |
| Hippo Y., Yashiro M., Ishii M., Taniguchi H., Tsutsumi S., Hirakawa K., Kodama T., Aburatani H. | Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with highly metastatic potential to peritoneum or lymph nodes | Cancer Reserch | 61 | 889-895 | 2001 |
| Akaike N., Murakami N., Katsurabayashi S., Jin Y., H. Imazawa T. | Focal stimulation of single GABAergic presynaptic boutons on the rat hippocampal neuron | Neuroscience Research | | in press | |
| Miura I., Miyamoto K., Nakamura K., Watanabe Y. | Hydrogen peroxide induced chemokine production in the glia-rich cultured cerebellar granule cells under acidosis | Life Science | 70 | 821-831 | 2002 |
| Watanabe Y., Zhi Ming Wang, Jeong Seop Rhee, George F Lawlor, Ishibashi H., Akaike N. | Inhibitory effects of 1,4-DHP antagonists on synaptic GABA release modulated by BAY-K8644 in mechanically dissociated rat substantia innominata | Life Science | | in press | 2002 |
| Yamada Y., Watanabe Y., J.Zhang, Haraoka J., Ito H. | Changes in cortical and cerebellar bcl-2 mRNA levels in the developing hydrocephalic rat (LEW-HYR) as measured by a real time quantified RT-PCR | Neuroscience | | in press | 2002 |