

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	宇野 珠世
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論 文 題 目 $\alpha 3\alpha 5$ 型ニコチン受容体機能の cAMP による調整			
論文審査担当者 主 査 教授 兼松 隆 印 審査委員 教授 仲田 義啓 審査委員 教授 酒井 規雄			
〔論文審査の要旨〕 ニコチン受容体(nAChR)は 5 量体構造をとるイオンチャネル内蔵型受容体であり, α , β , γ , および δ サブユニットから構成され, サブユニットの組み合わせにより薬理学的特性が各々異なっている。中枢神経系においては主に $\alpha 2\sim 10$, $\beta 2\sim 4$ のサブタイプから構成される。中枢神経系のニコチン受容体は, 痛みの調節やニコチン依存形成に寄与するといわれている。内側手綱核から脚間核に投射する経路には, $\alpha 3$ と $\alpha 5$ サブユニットを含む nAChR が豊富に発現しており, ニコチン依存の忌避反応に関与していることが知られている。一方, GPR3 は, Gs と結合し cAMP を恒常的に上昇させる G タンパク質共役型受容体であり, 内側手綱核, 海馬, 皮質, 小脳に発現し, 神経突起伸長, 生存, 分化に関わる重要な因子である。GPR3 は内側手綱核で $\alpha 3\alpha 5$ 型 nAChR と共発現していることから, GPR3 により上昇する cAMP が nAChR の制御を介してニコチン依存形成に関与している可能性がある。そこで, 本研究では, 内側手綱核に共局在する $\alpha 3\alpha 5$ 型 nAChR と GPR3 に着目し, $\alpha 3\alpha 5$ nAChR の cAMP 及び GPR3 による機能制御について検討した。 使用細胞として $\alpha 3\alpha 5\alpha 7$ 型 nAChR と GPR3 が内在性に発現している SH-SY5Y 細胞株と, $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ 型 nAChR 安定発現 CHO 細胞を用いた。 細胞内カルシウムイオン濃度([Ca ²⁺])は, Fluo-4-AM を用いたイメージング法にて観察した。観察終了時にイオノマイシンを添加し, 細胞内[Ca ²⁺]が最大限に上昇した状態を観察することにより Fluo-4-AM のローディング状態を確認した。各検討の[Ca ²⁺]上昇はイオノマイシンによる[Ca ²⁺]上昇に対する比率を取ることで定量化した。			

ニコチン誘発電流の測定には SH-SY5Y 細胞にホールセルパッチを施し、膜電位を -70mV に固定し、ニコチン、各種拮抗薬を灌流液中に投与し、ニコチン誘発電流を 10 秒ごとに観察した。

結果は以下の様にまとめられる。

1. SH-SY5Y 細胞におけるニコチンによる $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇には、細胞外からの流入と、細胞内からの動員があると考えられた。また、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬投与によりニコチンによる $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇が有意に抑制されたことから、細胞外からの流入には nAChR を介する成分と Ca^{2+} チャンネルを介する成分があることがわかった。さらに、非特異的ニコチン受容体拮抗薬を用いた検討から、細胞膜透過性を有するニコチンが細胞膜を透過し、細胞内から Ca^{2+} を動員する可能性が示唆された。
2. 次に、形質膜の $\alpha 3\alpha 5\text{nAChR}$ を介する Ca^{2+} 流入の成分のみを抽出するために、ムスカリン受容体拮抗薬（アトロピン）、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬（ニフェジピン、 ω コノトキシン）、 $\alpha 7$ ニコチン受容体特異的拮抗薬（MLA）存在下に細胞膜透過性のないアセチルコリンを投与し、 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇を観察した。この形質膜の $\alpha 3\alpha 5\text{nAChR}$ を介する $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は、cAMP アナログである dbcAMP1mM を 48 時間処置すると減少し、 $\alpha 3\beta 4\text{nAChR}$ mRNA 発現も有意に減少した。これらの結果から、SH-SY5Y 細胞では、長期間の cAMP 上昇は転写レベルで $\alpha 3\beta 4\text{nAChR}$ の機能を抑制的に制御すると考えられた。
3. $\alpha 3\alpha 5\beta 4\text{nAChR}$ 安定発現 CHO 細胞を用いて、細胞内の $\alpha 3\alpha 5\text{nAChR}$ を介する反応に対する cAMP の効果を検討したところ、dbcAMP1mM を 15 分間処置するとニコチンによる $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は有意に増加したが、48 時間処置では変化がなかった。これらの結果から、 $\alpha 3\alpha 5\text{nAChR}$ は cAMP による機能制御を受け、その制御機構は形質膜に存在する受容体と細胞内に存在する受容体で異なっている可能性が示唆された。
4. GPR3 とニコチン誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇との関係を、SH-SY5Y 細胞と $\alpha 3\alpha 5\beta 4\text{nAChR}$ 安定発現 CHO 細胞で検討した。SH-SY5Y 細胞において GPR3 をノックダウンすると、ニコチン誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は有意に増加した。反対に GPR3 を過剰発現させると、いずれの細胞株においても有意ではないがニコチン誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は減少する傾向がみられた。これらの結果から、GPR3 はニコチンに対する反応を負に制御している可能性が示唆された。

以上の結果から、本論文は $\alpha 3\alpha 5$ ニコチン受容体が cAMP により機能調節を受けることを明らかにした。また、 $\alpha 3\alpha 5$ ニコチン受容体と GPR3 が共局在する内側手綱核-脚間の経路において GPR3 により恒常的に上昇した cAMP が $\alpha 3\alpha 5$ ニコチン受容体の機能を修飾する可能性と、GPR3 がニコチン受容体の機能を調節し、ニコチン依存に関与する可能性があることを示した。このことは、中枢神経におけるニコチン受容体の働きの理解に資するところ大である。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。