

学位の種類	博士(医学)	氏名	村山 賢起
-------	--------	----	-------

学 位 論 文 題 目

Effects of neurosteroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one on ethanol-mediated paired-pulse depression of population spikes in the CA-1 region of rat hippocampal slices  
 (ラット海馬スライス CA-1 領域におけるエタノールによる集合電位の 2 回刺激抑制に神経ステロイド 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one が及ぼす影響)

共著者名 Zorumski F Charles, Izumi Yukitoshi  
 掲載雑誌名 Neuroscience Letters 394 巻 28 頁-32 頁 2006 年 2 月

研 究 目 的

中枢神経系においてエタノールが GABA(A) 受容体を介する抑制性の作用を増強することが数多くの報告より知られている。しかし、脳スライスでこれを観察すると臨床で報告されているエタノール血中濃度よりもはるかに高い濃度が必要となる。このことはエタノールの作用発現に、これを促進する内因性の物質が関与し、生体外の実験系では欠如している可能性を示唆する。内因性神経ステロイドの一つである 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (allopregnanolone, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THP, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ P) は GABA 伝達系の作用を増強するとされており、中枢神経系でのエタノールの作用にも関与している可能性が考えられた。そこで我々は中枢神経系において、エタノールの GABA(A) 受容体への作用に 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ P が及ぼす影響を海馬スライスで検討した。

材 料 ・ 方 法

1. ラット海馬スライスの作成

Sprague-Dawley 系雄性ラット (30 日) を対象に、ハロセン吸入麻酔下で断頭した。脳を頭蓋内より取り出し、95%酸素5%二酸化炭素でバブリングした氷冷下人工脳脊髄液 (ACSF) のなかで、パイプロトームを使用し、500  $\mu$ m の厚さの海馬スライスを作成した。各々のス

ライスは、95%酸素5%二酸化炭素で飽和させたACSF入りの溶液で2時間灌流させた。

## 2. 細胞外電位記録法

海馬スライスを、95%酸素5%二酸化炭素で飽和させたACSFで浸されているチェンバー内に載せ固定した。チェンバー内の温度は30℃に設定した。ACSFはチェンバー内を2ml/hで灌流させた。CA3の軸索であるSchafferの側枝が走行する放線層に刺激電極を配置した。CA1領域のシナプス層と錐体細胞層に微小ガラス電極（抵抗5-10MΩ）を配置した。シナプス層から興奮性シナプス後電位（dEPSP）、錐体細胞層から集合電位（PS）と細胞体興奮性シナプス後電位（sEPSP）をそれぞれ同時に記録した。

## 3. paired-pulse stimulation（2回連続電気刺激）法

刺激は21ms間隔による連続2回電気刺激法（paired-pulse stimulation）で行いこれを1回の記録とした。入出力関係を検討するために刺激強度を徐々に変化させ、少なくとも7回以上 paired-pulse stimulation を行った。また、モニターする刺激強度は最初のPS（1<sup>st</sup> PS）の最大値の50-60%に設定した。

## 4. 薬物

エタノールの濃度は60mM とし、20分間灌流した。3α5αPの濃度は100nMとし、エタノール投与2時間前に添加した。GABA(A)受容体拮抗薬であるピクロトキシンの濃度は1μMとした。

## 5. 統計

結果は、平均±標準誤差で表した。統計処理は2群比較にはStudent t-test、或いは、Mann-Whitney U testを用い p<0.05を有意とした。

## 成 績

### 1. dEPSP, sEPSP, PSそれぞれの解析

コントロールのスライスではpaired-pulse stimulationにより、最初のdEPSPに対する2回目のdEPSPの比（2<sup>nd</sup> dEPSP/1<sup>st</sup> dEPSP）は117.2±5.1%となり、2回目刺激で増強された（paired-pulse facilitation; PPF）。最初のsEPSPに対する2回目のsEPSPの比（2<sup>nd</sup> sEPSP/1<sup>st</sup> sEPSP）は51.7±6.7%となり2回目刺激で抑制された（paired-pulse depression; PPD）。また、最初のPSに対する2回目のPSの比（2<sup>nd</sup> PS/1<sup>st</sup> PS）も13.3±5.9%と、2回目刺激で抑制された（PPD）。

## 2. 60mMエタノールによる影響

上記1のスライスに60mMのエタノールを20分灌流させた後、paired-pulse stimulationを行った。その結果、2<sup>nd</sup> dEPSP/1<sup>st</sup> dEPSPは $115.7 \pm 2.5\%$ 、2<sup>nd</sup> sEPSP/1<sup>st</sup> sEPSPは $58.7 \pm 10.0\%$ 、2<sup>nd</sup> PS/1<sup>st</sup> PSは $21.4 \pm 14.4\%$ でありこの三者をそれぞれ上記1と比較しても有意差はなかった。

## 3. ピクロトキシンの効果

GABA(A)受容体拮抗薬であるピクロトキシンを投与するとPSでのPPDが阻止されるという報告があり、我々の実験でも同様の結果が得られた。この現象はPSにおけるPPDにGABA(A)受容体が関与していることを示している。

## 4. 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pの効果

次にエタノール投与2時間前から3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pを100nM持続添加し、エタノール投与前後の記録を比較した。2<sup>nd</sup> PS/1<sup>st</sup> PSはエタノール投与前が $28.2 \pm 7.6\%$ 、投与後が $8.6 \pm 4.5\%$ でありPSのPPDは増強された ( $P < 0.01$ )。しかし、dEPSPのPPFとsEPSPのPPDには有意差は認められなかった。さらに、3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pを持続添加せず、エタノールと同時に投与した実験と、3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pを持続添加しエタノールを20mMで施行した実験では、どちらもPSのPPDが増強されることはなく、有意差を認めなかった。

## 5. GABA(A)受容体の関与

3 $\alpha$ 5 $\alpha$ P持続添加によるエタノール60mMでのPSのPPD増強が、GABA(A)受容体を介していることを確認するため、3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pを2時間持続添加したものに1 $\mu$ Mのピクロトキシンを添加、その後エタノールを投与した。その結果エタノール投与前の2<sup>nd</sup> PS/1<sup>st</sup> PSは $86.9 \pm 14.6\%$ 、これに比しエタノール投与後は $82.3 \pm 12.7\%$ と、ピクロトキシリンによるPPD阻止にエタノール投与による変化は認められなかった。

## 6. $\beta$ -サイクロデキストリンの効果

エタノールによるPSのPPD増強に3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pの持続添加が必要であることを確認するため、3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pの拮抗薬である $\beta$ -サイクロデキストリン(ADVASEP-7<sup>R</sup>)を用いた実験を行った。この実験では3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pを2時間持続添加したものにエタノールとADVASEP-7両者を同時投与した。1000 $\mu$ MのADVASEP-7ではエタノール投与後に4.で観察されたPSのPPD増強は認められなかった (エタノール投与前2<sup>nd</sup> PS/1<sup>st</sup> PS ;  $26.1 \pm 11.2\%$ 、投与後 $19.8 \pm 13.3\%$ )。

## 考 案

本研究では、ラット海馬スライスCA-1領域においてエタノール、3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pのいずれかを投

与するのみではPSに変化を及ぼすことはなく、両者の存在で明らかなPPDの増強が認められることを示した。最近の報告では3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pは中枢神経系で作用する重要なGABA modulatorであるといわれている。また、ラットにエタノールを投与すると3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pの血中濃度は上昇するという報告もある。これらの報告は、生体外でエタノールの効果を観察する実験を行う際、3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pが不可欠なホルモンの一つであることが示唆された我々の実験結果にも矛盾しないものである。神経ステロイドは生体外で海馬スライスを作成した時点から直ちに消失する可能性があり、実験に使用するACSFへの添加の必要性が示唆された。

3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pの存在下、エタノールはPSにおいてのみPPDを増強した(①)が、dEPSPのPPFに変化はなく(②)、sEPSPのPPDにも変化はなかった(③)。②からはCA-1領域へのグルタミン酸によるシナプス伝達に変化がないこと、③からは樹状突起から細胞体への興奮性の伝達に変化がないことが示される。一方①により、エタノールはシナプス後の錐体細胞領域で、細胞体自身の興奮性を変化させていることが示唆された。

## 結 論

生体外でエタノールの中枢神経抑制効果を観察する際に神経ステロイド 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ Pは必要なホルモン因子の一つと考えられた。

## 引 用 文 献

1. R. Rupprecht, Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties, Psychoneuroendocrinology 28 (2003) 139–168.
2. R.A. Deitrich, T.V. Dunwiddie, R.A. Harris, V.G. Erwin, Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions, Pharmacol. Rev. 41 (1989) 489–537.
3. C.L. Faingold, P. N'Gouemo, A. Riaz, Ethanol and neurotransmitter interactions—from molecular to integrative effects, Prog. Neurobiol. 55 (1998) 509–535.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	村山 賢起
<p>審査委員長 松原和夫 ㊟</p> <p>審査委員 岩崎 寛 ㊟</p> <p>審査委員 清水 恵子 ㊟</p> <p>審査委員 高草木 薫 ㊟</p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Effects of neurosteroid 3<math>\alpha</math>-hydroxy-5<math>\alpha</math>-pregnan-20-one on ethanol-mediated paired-pulse depression of population spikes in the CA-1 region of rat hippocampal slices</p> <p>(ラット海馬スライスにおけるエタノールによる集合電位の2回刺激抑制に神経ステロイド 3<math>\alpha</math>-hydroxy-5<math>\alpha</math>-pregnan-20-one (3<math>\alpha</math>5<math>\alpha</math>P) が及ぼす影響)</p>			
<p>エタノールは、中枢神経系において GABA (A) 受容体に作用するとされているが、その作用機序は明確ではない。一方、近年、3<math>\alpha</math>-hydroxy-5<math>\alpha</math>-pregnan-20-one (3<math>\alpha</math>5<math>\alpha</math>P) は GABA (A) 受容体に作用する神経ステロイドであることが指摘され、エタノール摂取により 3<math>\alpha</math>5<math>\alpha</math>P の脳内および血中濃度が上昇するという報告もある。本論文提出者は、ラット海馬スライスを用いることにより、脳の他の領域の影響を除外し、エタノールの GABA (A) 受容体への作用が 3<math>\alpha</math>5<math>\alpha</math>P により影響を受けるか否かを検討した。</p> <p>実験手法として、連続 2 回の電気刺激 (paired-pulse) による細胞外電位を記録する電気生理学的方法を採用した。電気刺激間隔を 21ms とし、錐体細胞層から</p>			

集合電位と細胞体興奮性シナプス後電位、およびシナプス層から樹状突起興奮性シナプス後電位を同時に記録した。

その結果、60 mM のエタノール単独投与では、投与前後で 2 回目刺激の集合電位の減少、即ち 2 回刺激抑制は変化しない。しかし、 $3\alpha 5\alpha P$  に 2 時間暴露したスライスでは、エタノール存在下、集合電位の 2 回刺激抑制は著明に増強された。この効果は、GABA(A) 受容体の拮抗薬であるピクロトキシンや、 $3\alpha 5\alpha P$  の作用を阻害するとされている ADVASEP-7 の存在下では観察されなかった。一方、同時に記録した樹状突起興奮性シナプス後電位と細胞体興奮性シナプス後電位においては、エタノール存在下における有意な変化は認められなかった。これらの結果から、エタノールの中樞神経系抑制効果発現において  $3\alpha 5\alpha P$  が GABA(A) 受容体を介しその効果を増強すること、これに関与する GABA(A) 受容体は細胞体付近に存在することが示された。

本研究は、エタノールの神経細胞への作用が神経ステロイドを介していることを細胞レベルで示唆する新規の知見である。本研究の成果は、神経ステロイドの役割を明確にすることによって、臨床における GABA(A) 受容体作動性薬剤の新たな展開、進展に大きく貢献し得ると考えられる。なお、各審査委員より、本論文ならびに関連分野に関する試問の結果からも適切な解答が得られた。よって、審査委員会は、本論文が学位論文に十分値するものと判定致した。