

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
傍島 聡	主査 教授 阿部 宗昭 副査 教授 黒岩 敏彦 副査 教授 林 秀行 副査 教授 上田 晃一 副査 教授 米田 博
主論文題名 Implication for melatonin and its receptor in the spinal deformities of hereditary lordoscoliotic rabbits (脊柱変形におけるメラトニンとそのレセプターの関与 - 遺伝的胸椎前弯・前側弯ウサギを用いて-)	
学位論文内容の要旨	
<p>《目的》</p> <p>特発性側弯症の動物モデルには実験的に作製するモデルと、自然発症するモデルがある。ニワトリの松果体摘出によって発症する側弯変形モデルは、脊柱構成要素に侵襲を加えずに作製できるモデルで、ヒトの特発性側弯症の変形と類似点が多いことが報告されている。一方、自然発症動物モデルは報告が少なく、鳥類では white leghorn や日本ウズラに見られるが、ほ乳類では、金らにより報告されたウサギのみである。われわれはこれまでに成長期に脊柱変形が自然発症する日本白色種家兔の 1 系統、lordoscoliotic rabbit (以下 LSR) がヒトの特発性側弯症の疾患モデルになり得ることを報告してきた。すなわち、LSR の脊柱変形は、中、下位胸椎部を中心とする前側弯変形で回旋を伴うこと、生下時には見られず、生後4から6週頃に発症し16週まで増強すること、脊椎奇形は認めないなどヒトの特発性側弯症と多くの類似点を有している。</p> <p>松果体摘出側弯変形モデルはヒヨコの松果体を摘出することによって側弯が発症する。松果体摘出による直接的な神経系への影響はないとされ、松果体から分泌されるメラトニンは低下あるいは欠乏することが確認されており、一次的な分泌低下によるホルモンの機能低下が、何らかの形で側弯変形を惹起していると考えられているが、その発症機序に関しては未だ不明である。</p> <p>今回、LSR における脊柱変形とメラトニンとの関連を調べる目的で、血中メラトニン値の測定を行い正常群と比較した。さらにメラトニンレセプター mRNA の検索および定量を行った。</p> <p>《対象と方法》</p> <p>1. LSR10 羽に対し、変形進行期(4 から 20 週齢)の 4 週毎に血中メラトニン値の測定を Radioimmunoassay(RIA)法にて行った。メラトニンは光による日内変動があるため飼育環境は 12時間暗期、12時間明期とした。コントロールには正常で別系統の日本白色種家兔を同数用いた。採血は4から20週齢までの4週間ごとに行い、暗期の中間点で暗室にて、耳介静脈より行った。統計処理には t 検定を用いた。また同時期に X 線撮影を行い、その脊柱変形の有無を調べた。</p>	

2. メラトニンが脊髄に直接作用するならば脊髄にメラトニンレセプターが存在すると考え、メラトニンレセプターの存在を遺伝子レベルで明らかにすることを試みた。すなわち、PCR法による受容体ホモログ遺伝子のクローニングを行い、まずウサギのメラトニンレセプターmRNAの配列を決定した。これをもとにプライマーを作製し、RT-PCR法を行った。mRNAの定量は蛍光分析法であるTaqManPCR法を用いて行い、内部標準補正にはGAPDHを用いた。

#### 《結果》

1. LSRの血清メラトニン値は、4から16週までの4週間毎の各週齢において、コントロール群に対し統計学的に有意に高値であった。一方、その推移はLSR群、コントロール群ともに16週まで増加し、20週では減少していた。
2. ウサギメラトニン受容体の遺伝子配列を決定した。これは他の哺乳動物の配列と高い相同性を示した。この配列から新たに170塩基対プライマーを設計し、RT-PCRを行った。LSRの胸椎前弯、前側弯部の脊髄からメラトニンレセプターのmRNAの発現が認められた。蛍光分析法による相対的定量(GAPDHによる内部標準補正)では、内部標準補正に用いたGAPDHとの比はLSRでは0.433、コントロール群では0.431であり、両群間に脊髄でのメラトニンレセプターmRNAの量的な差は見られなかった。

#### 《考察》

メラトニンは主に松果体から合成される神経ホルモンであり、夜高く、昼低いという概日リズムがある。血液中のメラトニンの大部分は松果体由来であるとされているが、鳥類以下では網膜でも合成されると報告されている。生理作用には概日リズムの制御や生殖、性腺発育抑制など、多くの作用があるが、脊柱変形の原因に直接結びつく作用の報告はない。受容体は細胞膜受容体で、これまで受容体の存在が確認されているのは、視床下部、小脳、網膜、リンパ球などである。受容体遺伝子は1994年に初めて単離され、メラトニンの機能を分子レベルで解析することが可能になっている。哺乳動物では、1a、1bの二つのサブタイプがあるが、鳥類以下の動物では1cも単離されており、種により機能が異なる可能性があると考えられている。メラトニンの合成は光刺激に強く影響されるといわれており、哺乳動物では網膜が入力系、視床下部が発振系、松果体が出力系に相当し、各組織間の情報伝達はニューロンが行っているとされている。

LSRが血清メラトニン高値を示したことからメラトニンを介するLSRの脊柱変形の発症機序に関してメラトニンの異常による二次的な分泌の亢進が考えられた。このことからメラトニンレセプターに着目し、脊柱変形高位の脊髄からのメラトニンレセプターmRNAの発現の検索および定量を行った。その結果、脊髄におけるメラトニンレセプターmRNAの発現は確認できたが、LSRとコントロール群との間にメラトニンレセプターmRNAの発現量の差はみられなかった。しかし、脊髄にメラトニンレセプターmRNAの発現を確認できたことは、メラトニンが直接脊髄に作用する可能性が考えられたが、脊柱変形発症機序におけるメラトニンの標的器官の検索、すなわちメラトニンレセプターmRNAの存在を他の脊柱構成要素においても検討する必要がある。また、メラトニンレセプターmRNAの定量結果から、遺伝子レベルでの量の違いがメラトニンレセプター異常の原因ではないと考えられた。今後、メラトニンレセプター異常について検討する際、細胞のどのレベルで起こっているのか、すなわち遺伝子の変異により機能が変化しているのか、あるいはメラトニンレセプターmRNA以降の刺激伝達経路、いわゆるシグナルの異常があるのかなど、分子レベルでの解明が必要と考えている。

#### 《結語》

LSRはコントロール群と比較し有意に血清メラトニンが高値であり、メラトニンレセプターの異常による二次的な分泌亢進が考えられた。LSRにおけるメラトニンを介する脊柱変形発症機序において脊髄以外の脊椎構成要素におけるメラトニンレセプターの局在やその異常の解明が必要であると思われる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	傍 島 聰
論文審査担当者		主 査 教授 阿 部 宗 昭 副 査 教授 黒 岩 敏 彦 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 上 田 晃 一 副 査 教授 米 田 博	
主論文題名 Implication for melatonin and its receptor in the spinal deformities of hereditary lordoscoliotic rabbits (脊柱変形におけるメラトニンとそのレセプターの関与 - 遺伝的胸椎前弯・前側弯ウサギを用いて-)			
論文審査結果の要旨			
<p>特発性側弯症の動物モデルには実験的に作製する動物モデルと、自然発症する動物モデルがある。ニワトリの松果体摘出によって発症する側弯変形は、脊柱構成要素に侵襲を加えずに作製できるモデルで、ヒトの特発性側弯症の変形と類似点が多いことが報告されている。松果体から分泌されるメラトニンは低下や欠乏が生じることが確認されており、一次的な分泌低下によるホルモンの機能低下が、何らかの形で側弯変形を惹起していると考えられているが、その発症機序に関しては未だ不明である。一方、申請者らはこれまでに成長期に脊柱変形が自然発症する日本白色種家兔の 1 系統、lordoscoliotic rabbit (以下 LSR) がヒトの特発性側弯症の疾患モデルになり得ることを報告している。</p> <p>本研究では、LSR における脊柱変形とメラトニンとの関連を調べる目的で、血中メラトニン値の測定および脊髄におけるメラトニンレセプターの mRNA の検索、定量を行い、正常例(別系統の日本白色種家兔)と比較検討したものであり、以下の結果が得られている。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. LSR の血中メラトニン値は変形進行期において正常例に比し有意に高値であった(<math>p &lt; 0.05</math>)。</li> <li>2. 胸椎前弯、前側弯部の脊髄にメラトニンレセプターの mRNA の発現が認められた。また、蛍光分析法による相対的定量(GAPDH による内部標準補正)では、LSR と正常例とにメラトニンレセプターの発現量の差はみられなかった。</li> </ol> <p>以上の結果より、メラトニンを介する LSR の脊柱変形発症機序において、LSR の血清メラトニン高値は一次的な分泌亢進、あるいはメラトニンレセプターの異常によって feedback が解除されることによる二次的な分泌亢進が考えられる。LSR の脊柱変形発症機序が松果体摘出モデルと同じであれば、両者にはメラトニンホルモンの機能低下という病態が関与することになり、LSR の血清メラトニン高値はメラトニンレセプターの異常による二次的な分泌亢進と考えられる。今回、脊髄にメラトニンレセプター mRNA の発現を確認できたことは、メラトニンが直接脊髄に作用する可能性を示唆している。また、メラトニンレセプター mRNA の定量結果からは量的な異常は見られなかったが、今後、脊柱変形発症機序におけるメラトニンの標的器官の検索やメラトニンレセプター mRNA 以降の刺激伝達経路(シグナル)の異常があるのかなど、メラトニンを介した脊柱変形発症機序の解明への課題が示された。</p> <p>本研究において脊柱変形の病因にメラトニン、およびメラトニンレセプターが関与していることが示唆されたことは、今後の脊柱変形の病因解明に有用であると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			

(主論文公表誌)

SPINE 28(6): 554-558, 2003