

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
藪本 恭明	主査 教授 大 槻 勝 紀
	副査 教授 勝 間 田 敬 弘
	副査 教授 林 秀 行
	副査 教授 朝 日 通 雄
	副査 教授 花 房 俊 昭
主論文題名 Expression of GABAergic system in pulmonary neuroendocrine cells and airway epithelial cells in GAD67-GFP knock-in mice (GAD67-GFP ノックインマウスの肺神経内分泌細胞および気道上皮細胞における GABA システムの発現)	
学位論文内容の要旨	
《研究目的》 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は成熟哺乳動物の中樞神経系における主要な抑制神経伝達物質である。GABA は中樞神経系以外にも様々な非神経組織に存在し、組織特異的な生理機能を持つと考えられている。GABA の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の 2 つのアイソフォーム (GAD65、GAD67) のうち、GAD67 は、脳では 90%以上の GABA 合成に関与し、細胞質全体に分布している。従って脳内 GABA ニューロンの分布などをみるために GAD67 の遺伝子に緑色蛍光タンパク (GFP) を導入した GAD67-GFP ノックインマウスが作成された。今回、GAD67-GFP マウスの肺を精査し、気道の上皮細胞の一部に GFP シグナルを見出したことから、肺における GAD67 発現細胞の同定と、GABA 受容体の発現を検討した。  《研究方法》 1) 蛍光観察 GAD67-GFP マウス (4 週～4 月齢) を灌流固定し、摘出した肺の凍結切片を蛍光顕微鏡およびレーザー顕微鏡で観察した。 2) 免疫組織化学と電子顕微鏡観察 GAD67-GFP マウス (4 週～4 月齢) を灌流固定し、摘出した肺の凍結切片について神経内分泌細胞のマーカーである PGP9.5 と CGRP の免疫染色を行ない、GFP 陽性細胞について透過電子顕微鏡による観察を行った。GAD65/67、GABA、GABA <sub>B</sub> 受容体サブユニットに対する免疫組織化学染色を行った。 3) RT-PCR 法 GAD67-GFP マウスの肺について GAD65 と GAD67 および GABA <sub>A</sub> 受容体、GABA <sub>B</sub> 受容体、および GABA <sub>C</sub> 受容体それぞれのサブユニットの mRNA 発現を RT-PCR 法で分析した。  《研究結果》 1) 肺における GFP の分布を検討したところ、気管支上皮に孤立性および集合性の GFP 陽性細胞が観察されたが、肺胞には観察されなかった。	

- 2) 気道上皮における GFP 陽性細胞はマウス神経内分泌細胞のマーカーである PGP9.5 と CGRP が共に陽性であった。電顕的観察において、神経内分泌細胞の特徴である芯あり小胞が確認されたことから、GFP 陽性細胞は神経内分泌細胞と確認できた。
- 3) ほとんど全ての GFP 陽性細胞は GAD65/67 に免疫陽性であった。GABA 免疫反応は、GFP 陽性細胞にのみ陽性であったが、GFP 陽性細胞の全てが GABA 免疫陽性ではなかった。
- 4) RT-PCR では 2 種の GAD アイソフォームのうち GAD67 が主であることが確認できた。また GABA 受容体では GABA<sub>B</sub> 受容体の R1b と R2 サブユニットおよび GABA<sub>A</sub> 受容体の  $\alpha 5$  サブユニットの mRNA のみが観察できた。
- 5) GABA<sub>B</sub> 受容体サブユニットの免疫染色では、肺胞を含めた気道上皮細胞の一部に R1b および R2 サブユニットの免疫陽性反応を認めたが、GFP 陽性神経内分泌細胞には GABA<sub>B</sub> 受容体サブユニットの免疫陽性反応は認められなかった。

#### 《考 察》

肺胞を除く気道上皮に見られる神経内分泌細胞が、GABA 合成酵素の GAD67 を発現しており、実際に GABA を産生する能力のあることが確認された。GABA は GABA 受容体を介してその機能を発揮する。G タンパク共役型の GABA<sub>B</sub> 受容体は R1 と R2 サブユニットがヘテロダイマーを形成して機能的な受容体となるが、両サブユニットの mRNA が肺に確認できた。しかし、チャネル型の GABA<sub>A</sub> 受容体が機能を持つためには、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  のそれぞれのサブユニットから一つ以上の発現が必要であるため、 $\alpha 5$  サブユニット単独では受容体としての機能を果たさないと考えられた。さらに免疫染色により神経内分泌細胞以外の気道上皮に GABA<sub>B</sub> 受容体の存在が示唆された。従って、神経内分泌細胞で産生された GABA がパラクラインおよびエンドクライン的に気道上皮細胞の一部に作用することが考えられる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	藪本 恭明
論文審査担当者		主 査 教授 大 槻 勝 紀	
		副 査 教授 勝 間 田 敬 弘	
		副 査 教授 林 秀 行	
		副 査 教授 朝 日 通 雄	
		副 査 教授 花 房 俊 昭	
主論文題名			
<p>Expression of GABAergic system in pulmonary neuroendocrine cells and airway epithelial cells in GAD67-GFP knock-in mice (GAD67-GFP ノックインマウスの肺神経内分泌細胞および気道上皮細胞における GABA システムの発現)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>成熟哺乳動物の中樞神経系における主要な抑制神経伝達物質である<math>\gamma</math>-アミノ酪酸(GABA)は中枢神経系以外の非神経組織にも存在し、組織特異的な生理機能を持つと考えられているが、肺での研究は少ない。申請者は GAD67 の遺伝子に緑色蛍光タンパク(GFP)を導入した GAD67-GFP ノックインマウスの肺に GFP の発現を見出したことから、マウス肺気道上皮における GABA システムの発現について検討を加え、以下の結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 肺における GFP の分布は気管支上皮に孤立性および集合性に観察されたが、肺胞には観察されなかった。</li> <li>2) 気道上皮における GFP 陽性細胞は神経内分泌細胞であることを確認した。</li> <li>3) GFP 陽性神経内分泌細胞は GAD を発現しており、GABA 産生能を持っていた。</li> <li>4) GABA が作用するために必要な GABA 受容体について GABA<sub>B</sub> 受容体のサブユニットである R1b と R2 がヘテロダイマーを形成して機能すると考えられた。</li> <li>5) GABA<sub>B</sub> 受容体は、GFP 陽性神経内分泌細胞ではなく、それ以外の肺胞を含めた気道上皮細胞の一部に分布することが確かめられた。</li> </ol> <p>本論文は肺気道上皮の神経内分泌細胞が GABA 産生細胞であることを初めて明らかにし、この GABA がエンドクラインまたはパラクラインによって肺上皮細胞に発現した GABA<sub>B</sub> 受容体に作用する可能性を示した。これらの成果は、機能的意義が解明されていない肺神経内分泌細胞の研究発展に有用な基礎的知見を提供すると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項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> <p>(主論文公表誌)</p> <p>Medical Molecular Morphology 41(1): 20-27, 2008</p>			