

脳虚血時における脳内 GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニットの脳保護的役割

新山和寿^{1,2)} 白石修史¹⁾ 須田高之¹⁾
一色淳²⁾ 趙美味^{3,4)} 渡邊泰雄^{3,4)}

¹⁾水戸済生会総合病院救命救急センター

²⁾東京医科大学麻酔科学講座

³⁾中国医科大学薬学院天然薬物研究室

⁴⁾日本薬科大学医療薬学科薬理薬物治療学分野

【要旨】 本研究は脳内 GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニットの脳虚血誘発細胞障害発現時における変動を経時的に検索し、本サブユニットの脳細胞保護における役割を見出すことを目的とした。GOI 麻酔下での脳内 GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニット mRNA は、視床、線条体、大脳皮質、海馬に多く発現し、小脳、延髄、視床下部では低い発現であった。両側総頸動脈結紮 (2VO) 誘発虚血後の再灌流 6 時間後は各脳部位で GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニット mRNA の発現の増加が認められた。しかし、再灌流 18 時間後には、視床、海馬、線条体での GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニット mRNA の発現は 2VO 処置前と比べて有意差は認められなくなった。一方、虚血に対し比較的耐性がある大脳皮質前頭葉、小脳、および、延髄では 2VO 前値と比較して、GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニット mRNA の発現は有意に高かった。本研究成績から、GABA_A 受容体の中でも $\alpha 4$ サブユニットの活性化を介した機序が脳保護作用を有することが示唆された。

はじめに

中枢抑制性神経系である GABA 神経は、脳虚血に対して神経保護的な役割を有していることが報告されている¹⁾。しかも、GABA_A 受容体の活性上昇が神経保護に関与していることも見出されている²⁻⁴⁾。一方、GABA_A 受容体にはサブユニットの存在が知られており、その中でもベンゾジアゼピン受容体が存在する $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ サブユニットが脳保護作用を有することも報告されている⁵⁻⁹⁾。これらの結果は、ベンゾジアゼピン系薬物の midazolam が脳保護効果を有することを明らかにした我々の結果からも証明される¹⁰⁾。

我々は静脈麻酔薬による脳保護効果について研究を行ってきており、これまでに砂ネズミの両側頸動脈結紮 (2VO) モデルの結果では、propofol が mid-

azolam よりも高い脳保護効果を有することを明らかにした¹⁰⁾。さらに、その後 GABA_A 受容体の中でも機能的役割が明確でなかった $\alpha 4$ サブユニットの塩基配列が C57BL/6J マウスにおいて解明された¹¹⁾。我々は従来のベンゾジアゼピン系薬物と性質の異なる propofol の薬理効果発現に GABA_A 受容体の中でも $\alpha 4$ サブユニットと密接な関係があることを見出した¹²⁾。そこで本研究は、C57BL/6J マウスを用いて GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニットの脳細胞保護における役割を明らかにすることを主目的とした。既に報告をしているが、C57BL/6J マウスは砂ネズミと同様に後交通動脈が欠損しており、2VO 処置により脳虚血を誘発できること¹³⁾¹⁴⁾ から、2VO 処置後の再灌流 2、4、6 および 18 時間後の GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニット mRNA の発現を RT-PCR 法で経時的な測定を

2007 年 9 月 4 日受付、2007 年 10 月 29 日受理

キーワード: GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニット、脳虚血、脳保護、C57BL/6J マウス、両側頸動脈結紮
(別冊請求先: 〒386-0012 長野県上田市中央 1-3-3 上田病院 新山 和寿)

行った。

研究材料および方法

1) 実験動物

実験動物は、9-10週齢雄性 C57BL/6J マウスを使用した。本研究を施行するまで、食餌や飲水は自由摂取とした。15分間の両側総頸動脈結紮処置を行い、再灌流後2、4、6および18時間後に各脳部位を摘出した4群と、2VO処置を行わずに各脳部位を摘出した非結紮群の、計5群に分類した。

なお、本実験を施行するに際し、東京医科大学動物倫理委員会の許可を得た。

2) 2VOによる脳虚血モデル作成

実験動物を麻酔箱(直径20cm、高さ15cm)に入れ、酸素50%、亜酸化窒素50%、イソフルラン2%(以下、GOI)で麻酔導入後に気管挿管、GOIで呼吸、および麻酔を維持した。実験動物の頭頂部に約5mmの切開を加え、レーザードプラプローブ(EGプローブ[®]、OMEGAWAVE社製、東京)を装着し、脳血流の変化をモニタリング(OMEGA FLOW CI[®]、OMEGAWAVE社製、東京)した。実験動物は腹臥位から仰臥位に体位変換後、鎖骨上に横切開を入れ、両側総頸動脈を周囲より完全に剝離した。vascular clipを用いて両側総頸動脈を15分間閉塞し、その後、再灌流を行った。非結紮群では、両側総頸動脈を周囲より完全に剝離してそのまま閉創した。手術中、両側総頸動脈の結紮後、脳血流が60%以上低下、さらに眼動脈の血流低下により白眼が確認できた実験動物のみ使用し、処置中および麻酔回復まで白熱電燈で体温低下の防止につとめた。

3) GABA_A受容体 $\alpha 4$ サブユニット mRNA 発現の測定

A) mRNAの抽出

摘出した各脳部位に ISOGEN 1,000 μ l (ニッポンジーン、富山、日本)を加えてホモジェナイズしクロロホルム 200 μ lを加えて攪拌した後、遠心分離(15,000 rpm、10分、4°C)した。上層のみ取り出しイソプロパノール 500 μ l (和光純薬、大阪、日本)を加えて攪拌後、遠心分離(15,000 rpm、10分、4°C)し沈殿物に80%エタノール 900 μ l (和光純薬、大阪、日本)を加え洗浄し、遠心分離(15,000 rpm、5分、4°C)した。沈殿物を室温にて風乾し、滅菌水 30 μ lを加えて mRNA solution とした。

B) genom DNA の除去

RNA solution に酢酸ナトリウム buffer (pH: 5.5, 10 mM MgSO₄, 100 mM 酢酸ナトリウム) (和光純薬、大阪、日本) 30 μ l と DNase I 3 μ l (GIBCO BRL) を加え、37°C で1時間 incubate、さらに酵素を失活させるために 99°C で10分間 incubate した。

C) RNA の再抽出と逆転写

精製されたサンプルに ISOGEN 500 μ l、クロロホルム 100 μ l を加えて攪拌した後、遠心分離(15,000 rpm、15分、4°C)した。上層のみ取り出しイソプロパノール 250 μ l 加えて遠心分離(15,000 rpm、10分、4°C)し沈殿物に80%エタノール 900 μ l 加え洗浄し、遠心分離(15,000 rpm、5分、4°C)した。沈殿物を室温で風乾し、滅菌水 30 μ lを加えて Total RNA solution とした。RNA 量は 500 μ l セルを用いて、吸光度計(260 nm)で測定し、0.5 μ g/ μ l に調整した。Total RNA 1 μ g に Random Primer 5 μ l (3 mM Tris-HCl; pH 7.0, 0.2 mM EDTA) (GIBCO BRL) を加え 65°C で10分間 incubate した。氷上に5分間放置した後に、M-MLV 5 \times RT buffer 4 μ l (250 mM tris-HCl: pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (GIBCO BRL)、0.1 M DTT 2 μ l (GIBCO BRL)、10 mM dNTP Mix 2 μ l (GIBCO BRL)、M-MLV Reverse Transcriptase 0.5 μ l (20 mM Tris-HCl: pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% (v/v) NonidetP-40, 50% (v/v) glycerol) (GIBCO BRL)、RNase inhibitor 0.5 μ l (和光純薬、大阪、日本)を加え攪拌し、37°C で1時間 incubate、さらに 99°C で10分間 incubate したサンプルに滅菌水 30 μ lを加えて cDNA solution とした。

D) 定量的 PCR

GABA_A受容体 $\alpha 4$ サブユニットの sequences に対する probe と primer は既報¹²⁾に従って the primer design Soft ware (Primer Express[®])を用いて作成した (probe: 5'TCA GTT TTC ACT TCT GTA GGA CCC CCA) (forward primer: 5'GGC CCA AAG CTG GTG ACA TTA A) (reverse primer: 5'CTG GAC AGT TTG CTG GAT GGT TA) (Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan)。内部標準の glycer-aldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) に対応する probe と primer は TaqMan GAPDH control reagent kit を用いた。

1) cDNA 1 μ l, TaqMan universal PCR Master Mix 12.5 μ l, GABA_A receptor $\alpha 4$ subunit forward primer 2.25 μ l (10 pmol/ μ l), GABA_A receptor $\alpha 4$ subunit

reverse primer 2.25 μ l (10 pmol/ μ l), TaqMan probe 1 μ l, 滅菌水 6 μ l, Total 25 μ l の混合液を作成した。

II) cDNA 1 μ l, TaqMan universal PCR Master Mix 12.5 μ l, GAPDH forward primer 0.25 μ l (10 mM), GAPDH reverse primer 0.25 μ l (10 mM), TaqMan probe 0.25 μ l, 滅菌水 10.75 μ l, Total 25 μ l の混合液を作成した。

III) I), II) で作成した混合液から PCR 法により GABA α 受容体 α 4 サブユニットおよび GAPDH を特異的に増幅させた。定量的 PCR の条件は 40 cycle, hot start 50°C 2 分間 (stage I), 95°C 10 分間 (stage II), 95°C 15 秒間、60°C 1 分間を 40 cycle (stage III) に設定し、内部標準に対する GABA α α 4 サブユニットの各脳部位での割合を算出した。

4) 統計的処理

統計的処理は、Non-paired *t* 検定で群間処理を行った。危険率 5% 以内を有意の差とした。

結 果

1) 非結紮群および無麻醉群における GABA α 受容体 α 4 サブユニットの分布の比較 (Fig.1)

GOI 麻醉下で 2VO 処置を行わずに術侵襲のみを加えた後、断頭した非結紮群と、無麻醉下で可及的速やかに断頭した無麻醉群、それぞれの脳部位における GABA α 4/GAPDH \times 1,000 の値および分布を比較した (Fig. 1)。各脳部位での GABA α 4/GAPDH \times 1,000 の値は、非結紮群と無麻醉群の両群で有意な差は認められなかった。さらに、非結紮群の各脳部位における GABA α 4/GAPDH \times 1,000 の値の割合は、大脳皮質 (前頭葉) 16.1%、大脳皮質 (後頭葉) 15.3%、小脳 2.8%、延髄 1.4%、視床 19.1%、視床下部 4.7%、線条体 25.5%、海馬 15.0% であった。一方、無麻醉群は、大脳皮質 (前頭葉) 16.8%、大脳皮質 (後頭葉) 16.8%、小脳 2.6%、延髄 1.2%、視床 14.8%、視床下部 4.0%、線条体 28.9%、海馬 13% であった。両者の GABA α 受容体 α 4 サブユニットの分布にほとんど差は認められなかった。これは、GABA α 受容体 α 4 サブユニット mRNA の発現

A) No anesthetic

B) GOI anesthetic

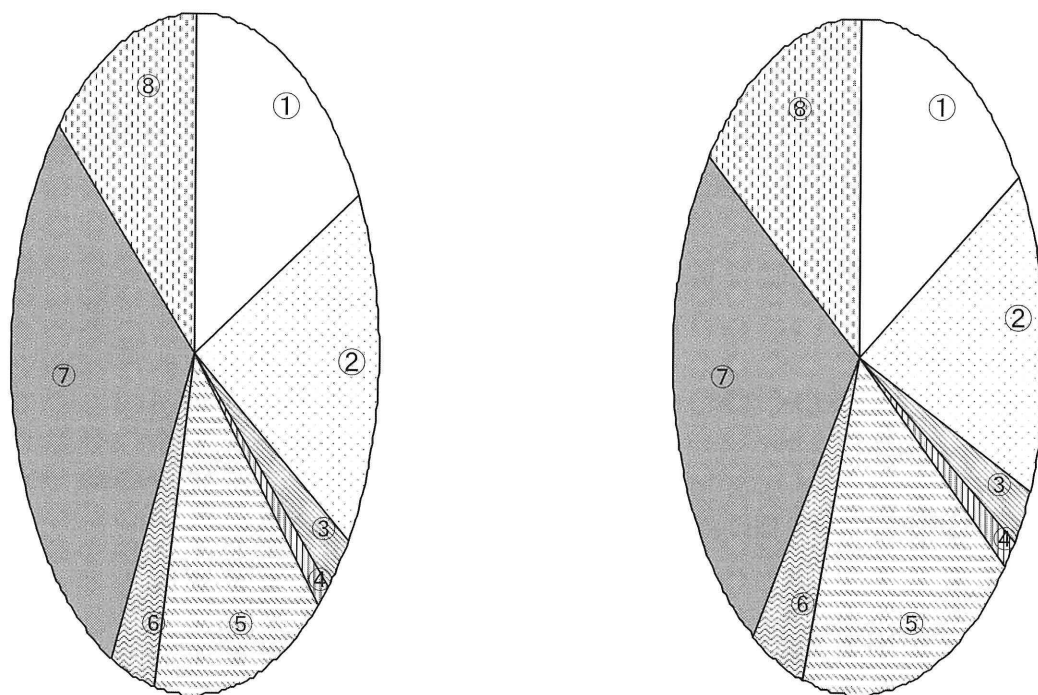


Fig. 1 Distribution of brain GABA α 4 subunit in a C57BL/6J mouse. A: Non-anesthetized condition, B: GOI anesthetized condition. Each value shows the mean of eight mice as a percentage of the total value of brain GABA α 4 subunits. ①: Frontal cortex, ②: Occipital cortex, ③: Cerebellum, ④: Medullar oblongata, ⑤: Thalamus, ⑥: Hypothalamus, ⑦: Corpus striatum, ⑧: Hippocampus.

に、GOI 麻酔や術侵襲による影響はほとんどないことを示唆する。

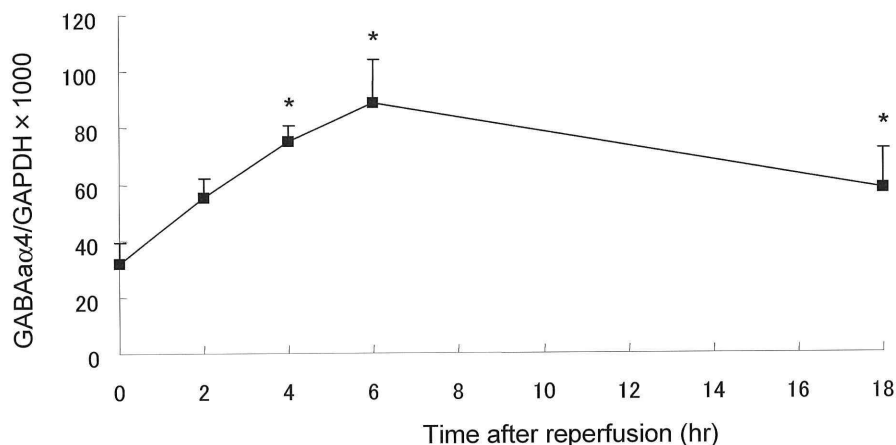
2) 2VO 処置再灌流後の GABA α 4 受容体 α 4 サブユニットの各脳部位における経時的変動

15分間の脳虚血後の GABA α 4/GAPDH \times 1,000 の値を各脳部位において経時的に測定したところ、以下ようになった。大脳皮質 (前): 0時間 (2VO 処置前) 32 \pm 7、2時間後 55 \pm 7、4時間後 75 \pm 6、6時間後 89 \pm 15、18時間後 58 \pm 8。大脳皮質 (後): 0時間 (2VO 処置前) 34 \pm 8、2時間後 58 \pm 14、4時間後 72 \pm 4、6時間後 72 \pm 9、18時間後 50 \pm 9 (Fig. 2)。海馬: 0時間 (2VO 処置前) 27 \pm 5、2時間後 65 \pm 7、4時間後 111 \pm 3、6時間後 94 \pm 13、18時間後 48 \pm 10。線条体: 0時間 (2VO 処置前) 47 \pm 5、2時間後 133 \pm 11、4時間後 141 \pm 22、6時間後 138 \pm 23、18時間後 94 \pm 19 (Fig. 3)。小脳: 0時間 (2VO 処置前) 7 \pm 1、2時間後 14 \pm 2、4時間後

18 \pm 2、6時間後 17 \pm 3、18時間後 13 \pm 2。延髄: 0時間 (2VO 処置前) 4 \pm 1、2時間後 6 \pm 1、4時間後 8 \pm 1、6時間後 7 \pm 1、18時間後 6 \pm 1 (Fig. 4)。視床: 0時間 (2VO 処置前) 41 \pm 6、2時間後 61 \pm 9、4時間後 56 \pm 2、6時間後 67 \pm 8、18時間後 60 \pm 9。視床下部: 0時間 (2VO 処置前) 11 \pm 3、2時間後 15 \pm 4、4時間後 18 \pm 5、6時間後 16 \pm 3、18時間後 19 \pm 4 (Fig. 5)。

以上の結果より、大脳皮質、小脳、延髄では再灌流6時間後まで GABA α 受容体 α 4 サブユニット mRNA の発現は増加したが、18時間後には減少が認められた。しかし、この値は0時間値と比較して、有意に高い値であった ($p < 0.05$)。一方、海馬、線条体、視床でも、GABA α 受容体 α 4 サブユニット mRNA の発現は再灌流6時間後まで0時間値と比較して有意に増加した ($p < 0.05$)。これらの部位では、6時間以降 GABA α 受容体 α 4 サブユニット mRNA の発現は低

A) Frontal cortex



B) Occipital cortex

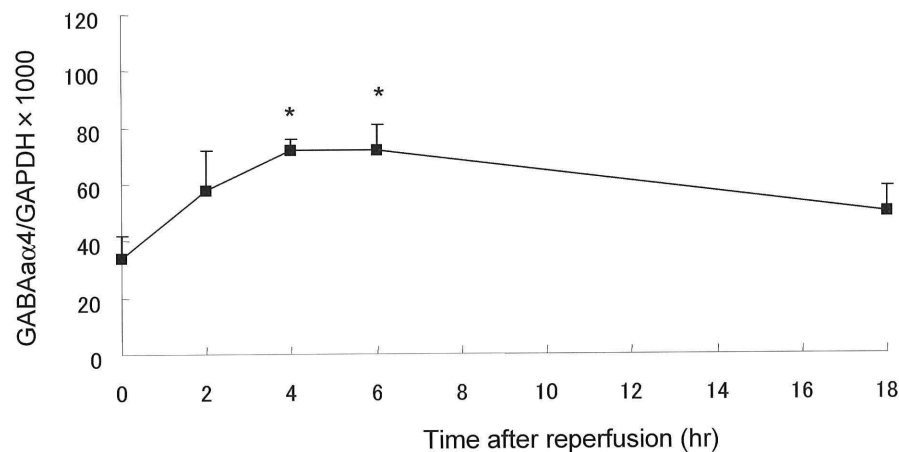


Fig. 2 Changes in brain GABA α α 4 subunit after reperfusion for 18 hours in 2VO C57BL/6J mouse. Each value shows mean \pm S.E. of eight mice. *: Significant difference vs the value obtained at 0 hr after reperfusion. * $P < 0.05$.

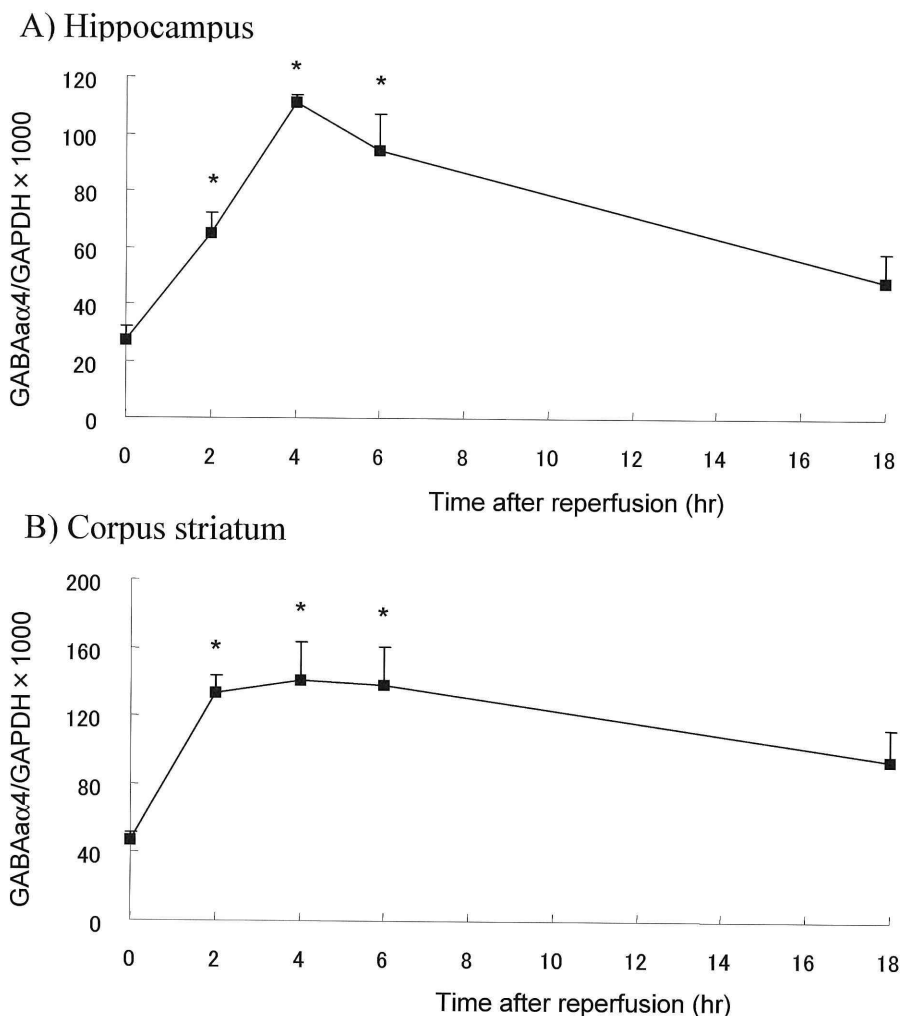


Fig. 3 Changes in brain GABAα 4 subunit after reperfusion for 18 hours in 2VO C57BL/6J mouse. Each value shows mean±S.E. of eight mice. *: Significant difference vs the value obtained at 0 hr after reperfusion. **P*<0.05.

下し、特に海馬では18時間後に0時間値まで戻った。視床下部ではGABAα受容体α4サブユニットmRNAの発現は、再灌流18時間後まで有意差のある経時的变化は認められなかった。

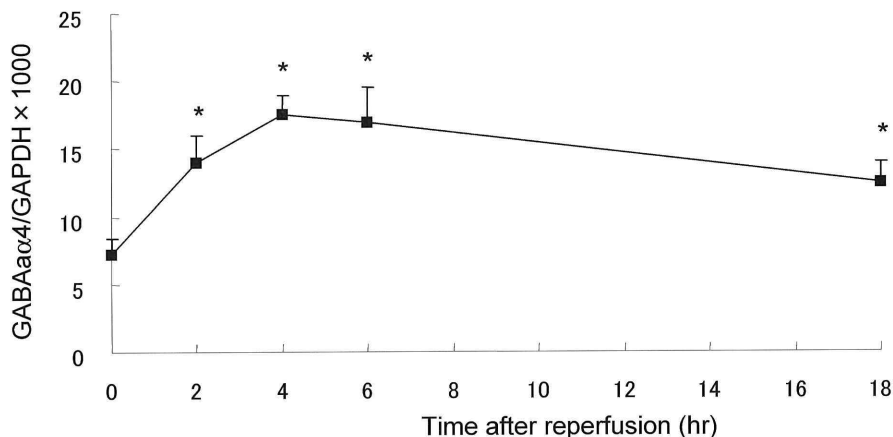
考 察

今回我々は、2VOにより脳虚血を誘発できるC57BL/6Jマウスを用いて¹³⁾¹⁴⁾、再灌流後のGABAα受容体α4サブユニットmRNAの発現を経時的に測定し、脳部位別での比較検索を行った。再灌流後6時間に亘り、GABAα受容体α4サブユニットmRNAの発現は程度の差こそあれ、視床下部を除いた脳部位で著明な増加が認められた。さらに、再灌流後18時間においても、大脳皮質、小脳、延髄で著明なGABAα受容体α4サブユニットmRNAの発現が認められた。これらの結果は、従来の我々の病理組織検索の結果¹⁵⁾

を加味すると、虚血による侵襲に対し抵抗性を有する脳部位にGABAα受容体α4サブユニットmRNAの持続的発現が認められたことから本サブユニットと脳保護因子誘発との関連性を示唆するものである。

虚血性脳細胞死に関する脳保護因子に関して多くの報告がなされている。抑制性神経のGABAに関して、GABA受容体刺激薬である静脈麻酔薬が脳保護作用を有することからGABA受容体活性が脳保護に関与することが示唆されている。Saransaari and Oja¹⁾は、虚血や低血糖時にGABA放出量が増加することと、この放出が興奮性神経誘発細胞死の抑制に繋がることを報告した。殊に、GABAα受容体の脳保護作用については、taurineの脳保護作用がGABAα受容体やglycine受容体活性の上昇に起因すること⁴⁾、さらに、ベンゾジアゼピン系静脈麻酔薬の中でもmidazolamやdiazepamが脳保護作用を有する⁷⁾¹⁰⁾との報告がある。

A) Cerebellum



B) Medullar oblongata

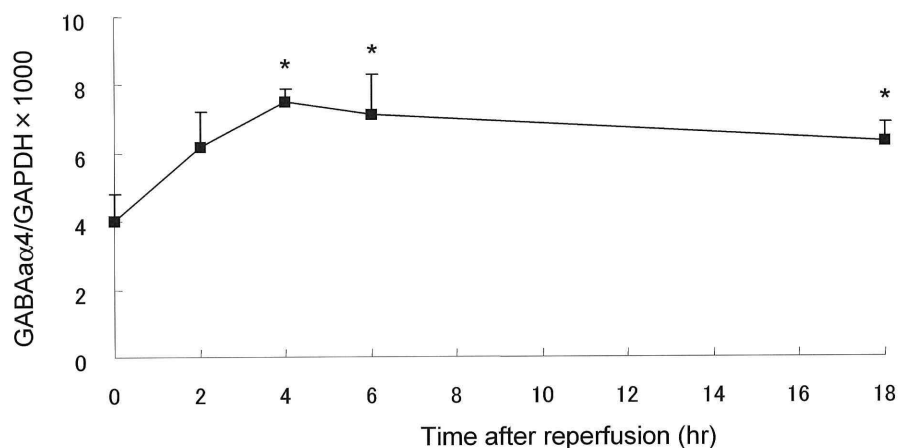


Fig. 4 Changes in brain GABA α α 4 subunit after reperfusion for 18 hours in 2VO C57BL/6J mouse. Each value shows mean \pm S.E. of eight mice. *: Significant difference vs the value obtained at 0 hr after reperfusion. * P < 0.05.

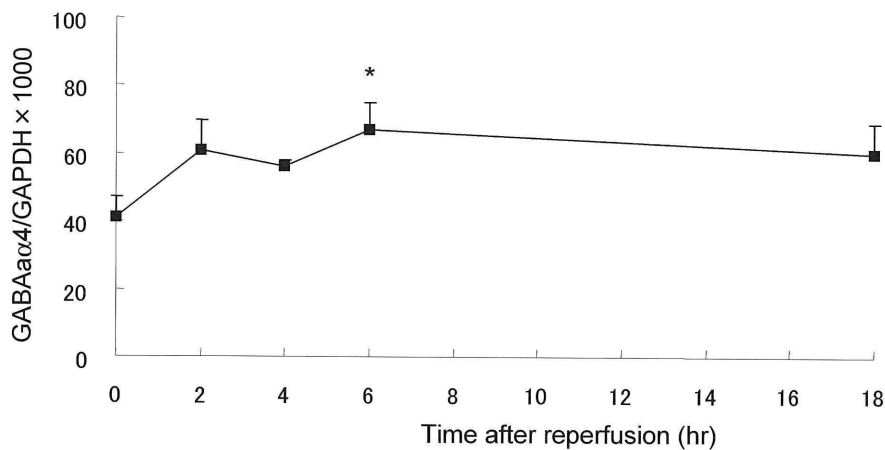
実際の臨床応用として、GABA α 受容体と密接な関連があるベンゾジアゼピン受容体の特異的結合薬物のイオマゼニルが脳血管障害での神経細胞の生存性の指標に SPECT で応用されている⁶⁾。

一方、GABA α 受容体には、数種のサブユニットの存在が知られている。しかも、このサブユニットにおいても細胞内情報伝達系との関連から各機能が明らかとされており、脳保護における役割についても詳細な研究が行われている。例えば、Li ら¹⁶⁾ は砂ネズミを用いて虚血再灌流後の海馬における α 1、 β 2 サブユニット mRNA を測定し、虚血による錐体細胞の退化が見られた CA1 領域では、これらサブユニットの著明な減少が認められ、且つ、チロシンキナーゼ活性も低下も生じることを報告した。一方、最近の我々の研究から propofol は GABA α 受容体の α 4 サブユニットに強い関与を有すること¹⁰⁾、しかも、propofol が

midazolam よりも強い脳保護作用を持つこと⁸⁾から、脳虚血時における脳保護因子としての GABA α 受容体 α 4 サブユニットの役割が示唆された。

本研究成績では、2VO からの再灌流後の GABA α 受容体 α 4 サブユニット mRNA の発現を経時的変動を虚血による侵襲に対し抵抗性を有する脳部位と弱い部位に分類し検索を行った。すなわち、一過性脳虚血後の脳細胞死が生じる条件下での再灌流直後からの細胞内情報伝達系の変動は脳細胞内への多量の Ca イオン流入を引き金とするが、その際、脳保護機構の異常な神経活動も生じる¹⁷⁾¹⁸⁾。Verheul ら¹⁹⁾ は、2VO 処置での脳虚血再灌流 30 分後に大脳皮質の GABA 受容体の Cl イオンチャネル活性が亢進し、その後、5 時間後には ATP 量の回復に伴って Cl イオンチャネル活性が安定してくると報告している。さらに、Schwartz ら⁷⁾ は 4VO 処置から再灌流後に短時間で GABA 活性

A) Thalamus



B) Hypothalamus

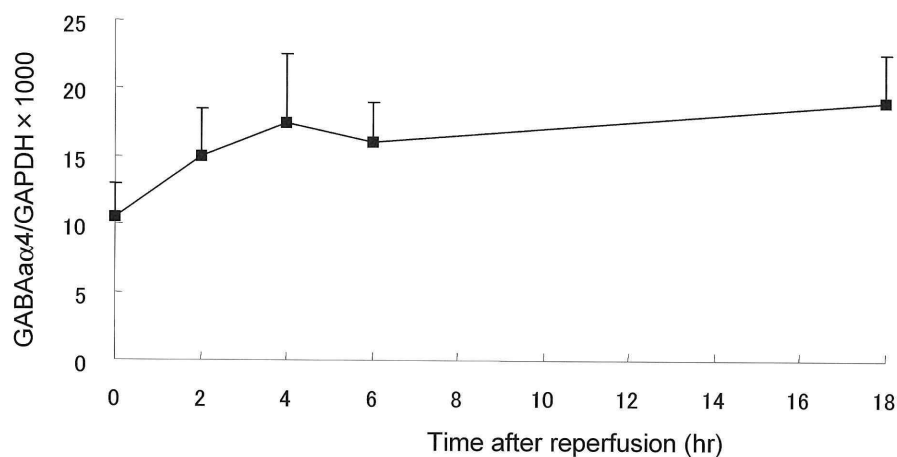


Fig. 5 Changes in brain GABAα 4 subunit after reperfusion for 18 hours in 2VO C57BL/6J mouse. Each value shows mean±S.E. of eight mice. *: Significant difference vs the value obtained at 0 hr after reperfusion. **P*<0.05.

が上昇し、脳細胞死が生じ易い海馬近辺では特に一過性の上昇が生じることを見出した。我々の研究では、興味あることに2VO誘発の遅発性脳細胞死に対して抵抗性を有する部位¹⁴⁾¹⁵⁾、すなわち、大脳皮質、延髄、小脳の部位でのGABAα受容体α4サブユニットmRNAの発現は、再灌流前の発現値と比較して18時間後においても有意な増加が認められた。一方、抵抗性の低い部位¹⁵⁾¹⁸⁾においては、再灌流後4-6時間はGABAα受容体α4サブユニットmRNAの発現の増量が認められたが18時間後では、再灌流前の発現値と比較して有意な差は認められなかった。すなわち、脳虚血誘発の遅発性細胞死の発現が低い脳部位ほどGABAα受容体α4サブユニットmRNAの持続的発現が認められた。これらの結果から、今後は本サブユニット欠損動物での2VO誘発脳虚血による遅発性脳細胞死の検索を計画している。

結 論

本研究で得られた結果と従来までの結果を総括すると、2VOで前脳虚血を可能とするC57BL/6Jマウスにおいて²⁰⁾、GABAα受容体は脳虚血誘発の遅発性脳細胞死に対して抵抗性を有するとともに、その構成蛋白であるα4サブユニットは脳保護作用発現に関与するサブユニットであることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たって、川崎みどり先生(日本薬科大学医療薬学科薬理薬物治療分野)の援助を感謝します。本研究の一部は、文部科学省基盤研究B(Y.W.)によって施行された。

文 献

- 1) Saransaari P, Oja SS: Characteristics of GABA release in mouse brain stem slices under normal and ischemic conditions. *Neurochem Res* **30**(12): 1549-1556, 2005
- 2) Lange-Asschenfeldt C, Raval AP, Perez-Pinzon MA: Ischemic tolerance induction in organotypic hippocampal slices: Role for the GABA_A receptor? *Neurosci Lett* **384**: 87-92, 2005
- 3) Nunez JL, Alt JJ, McCarthy MM: A new model for prenatal brain damage I. GABA_A receptor activation induces cell death in developing rat hippocampus. *Exp Neurol* **181**: 258-269, 2003
- 4) Wang GH, Jiang ZL, Fan XJ, Zhang L, Li X, Ke KF: Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABA_A and glycine receptors. *Neuropharmacol* **52**(5): 1199-1209, 2007
- 5) Smith TA: Type A gamma-aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine bindings: significance to clinical syndromes and their treatment. *Brit J of Biomed Sci* **58**(2): 111-121, 2001
- 6) 鳥塚莞爾、上村和夫、融 道男、篠原幸人、西村恒彦、米倉義晴、中川原讓二、松田博史、坂井文彦、松田一己、福山秀直、森本 清: 中枢性ベンゾジアゼピン受容体イメージング剤 123I-イオマゼニルの第3相臨床試験(第4報)—脳血管障害における臨床的有用性の検討—。 *核医学* **33**: 329-344, 1996
- 7) Schwartz RD, Yu X, Kaltzman MR, Hayden-Hixson DM, Perry JM: Diazepam, given postischemia, protects selectively vulnerable neurons in the rat hippocampus and striatum. *J of Neurosci* **15**(1): 529-539, 1995
- 8) Imaizumi M, Kim HJ, Zoghbi SS, Briard E, Hong J, Musachio JL, Ruetzler C, Chuang DM, Pike VW, Innis RB, Fujita M: Quantify upregulated peripheral benzodiazepine receptors associated with cerebral ischemia in rat. *Neurosci Lett* **16**: 200-205, 2007
- 9) Hall ED, Andrus PK, Fleck TJ, Oostveen JA, Carter DB, Jacobsen EJ: Neuroprotective properties of the benzodiazepine receptor, partial agonist PN gerbil forebrain ischemia Model. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 875-883, 1997
- 10) Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, Uchino H: Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABA_A receptors. *Acta Anaesth Scand* **43**: 153-162, 1999
- 11) Cestri IN, Liu ZF, Mu W, Burt DR: GABA_A receptor $\alpha 4$ subunit DBA/2J and C57BL/6J mice. *Brain Res Bull* **47**: 643-647, 1998.
- 12) Sekine S, Matsumoto S, Isshiki A, Kitamura T, Yamada J, Watanabe Y: Changes in expression of GABA_A $\alpha 4$ Subunit mRNA in the brain under anesthesia induced by volatile and intravenous anesthetics. *Neurochem Res* **31**: 439-448, 2006
- 13) Wellons JC, Sheng H, Laskowitz DT, Buckhard M G, Pearlstein RD, Warner DS: A comparison of strain-related susceptibility in two murine recovery models of global cerebral ischemia. *Brain Res* **868**(1): 14-21, 2000
- 14) 武田直子、室園美智博、渡辺省五、一色 淳、渡辺泰雄: 新規VIPならびにPACAP誘導体の低濃度腹腔内投与での脳保護効果—2種類の脳虚血モデル動物を用いて—。 *麻酔* **54**: 240-248, 2005
- 15) Urayama A, Yamada S, Kimura R, Zhang J, Watanabe Y: Neuroprotective effect and brain receptor binding of taltirelin, a novel thypotropin-releasing hormone (TRH) analogue, in transient forebrain ischemia of C57BL/6J mice. *Life Sci* **72**: 601-607, 2002
- 16) Li H, Siegel RE, Schwartz RD: Rapid decline of GABA_A receptor subunit mRNA expression in hippocampus following transient cerebral ischemia in the gerbil. *Hippocampus* **3**(4): 527-537, 1993
- 17) Joashi UC, Greenwood K, Taylor DL, Kozma M, Mazarakis ND, Edward AD, Mehmet H: Poly (ADP ribose) polymerase cleavage precedes neuronal death in hippocampus and cerebellum following injury to the developing rat forebrain. *Euro J Neurosci* **11**(1): 91-100, 1999
- 18) Taylor DL, Joashi UC, Sarraf C, Edward AD, Mehmet H: Consequential apoptosis in the cerebellum following injury to the developing rat forebrain. *Brain Pathl* **16**(3): 195-201, 2006
- 19) Verheul HB, de Leeuw FE, Scholten G, Tulleken CA, Lopes da Silva FH, Ghijsen WE: GABA_A receptor function in the early period after transient forebrain ischemia in the rat. *Eur J Neurosci* **5**(7): 955-960, 1993
- 20) 得津 馨、渡辺泰雄、一色 淳: マウス三種系統差における総頸動脈結紮誘発の脳内血行変化および Bcl-2 発現の評価。 *脳循環代謝* **11**(2): 94-104, 1999

Changes in GABA α 4 subunit mRNA expression of C57BL/6J mice after reperfusion of two vessel occlusion

Kazutoshi NIIYAMA¹⁾, Shuji SHIRAISHI¹⁾, Takayuki SUDA¹⁾
Atsusi ISSHIKI²⁾, Meime ZHAO^{3,4)}, Yasuo WATANABE^{3,4)}

¹⁾Mito Saiseikai General Hospital, Emergency Medicine and Critical Care Center

²⁾Department of Anesthesiology, Tokyo Medical University

³⁾Department of Ethnopharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, China Medical University

⁴⁾Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, School of Medicinal Pharmaceutical Sciences,
Nihon Pharmaceutical University

Abstract

In order to evaluate the functional role of brain GABA α 4 subunit in case of brain ischemia, changes in the expression of this subunit were examined after reperfusion of two vessel occlusion (2VO) in C57BL/6J mice. Under GOI anesthesia, the expressions of GABA α 4 subunit mRNA were highly detected in the frontal cortex, hippocampus, thalamus and striatum, although the less expressions of this subunit were seen in cerebellum, medulla oblongata and hypothalamus. Between just after reperfusion of 2VO and 6 hr later, the expressions of this subunit in all brain regions were increased. Over 18 hr later, however, these expressions seen in thalamus, hippocampus and striatum were completely returned to the levels obtained before reperfusion of 2VO. These results indicate that the GABA α 4 subunit plays a role of the neuroprotection under the brain ischemia, since the sustained increases of this subunit were expressed in the resistance brain areas to the 2VO induced brain ischemia.

<Keywords> brain ischemia, brain protection, C57BL/6J mouse, two vessel occlusion, GABA α receptor α 4subunit
