

学位論文題名

Studies on heterosynaptic modulation by
long-range spill-over of glutamate.

(神経伝達物質グルタミン酸の長距離拡散による
異シナプス性調節に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

脊椎動物の中樞神経において、神経伝達物質はシナプス間隙内に放出された後、トランスポーターの働きによって速やかに再吸収されている。この機構によってシナプス間隙内の伝達物質の濃度は低下し、次の刺激への素早い応答を可能とすると共に、外部への拡散が妨げられて他のシナプスの活性化を防いでいる。これに対し近年、シナプス外部に漏出した神経伝達物質が近傍のシナプスの受容体を活性化させる伝達物質漏出 (spill-over) の概念が提唱されている。これは、あるシナプスにおいて放出された神経伝達物質がシナプス外部に漏出して、他の部位の受容体を活性化させる機構であり、同じ細胞に存在する受容体を活性化させる場合と、異なる神経細胞の受容体を活性化させる場合の2つに大別される。

今までに海馬歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維において、カイニン酸受容体および GABA_A 受容体がこの伝達物質漏出の作用で活性化されることが報告されている。カイニン酸受容体は中枢神経において広く分布するイオンチャネル型のグルタミン酸受容体であり、苔状線維軸索の興奮性の調節に携わっている。一方苔状線維のシナプス前部には GABA_A 受容体が分布し、軸索興奮性を調節することも知られている。現在までにグルタミン酸と GABA の伝達物質漏出による作用が、苔状線維興奮性の調節に各々どの程度寄与しているかを示した報告はない。本研究では放線層の反復刺激によって放出された神経伝達物質が、伝達物質漏出によって苔状線維の興奮性を調節する可能性について実験的に調べた。またトランスポーターの機能を変化させる事によって、伝達物質漏出の時間経過が変化するかについて調べた。

【材料と方法】

幼弱マウスから急性海馬スライス標本を作成し実験に用いた。11 - 21 日齢の C57BL/6J マウスからエーテル麻酔下に全脳を摘出した後に左右の海馬を取り出した。氷冷した高グルコース人工脳脊髄液を用いてマイクロスライサーにて厚さ 400 μm の急性スライスを作成し、実体顕微鏡下に置いた灌流槽に海馬スライスを固定して、灌流液を通じて薬物を投与した。恒温装置を通じて灌流液は 25 度に維持しながら測定を行った。同心円形双極金属電極を CA3 野透明層に刺入して、

矩形波の刺激電圧を 30 秒毎に与えて苔状線維を逆行性に電気刺激した。ガラス微小電極を歯状回顆粒細胞層に刺入し、逆行性集合活動電位(antidromic population spike 以下 PS と略す)を測定した。放線層の反復刺激には CA3 野放線層に刺入した電極に、60 秒毎に 100 Hz の刺激を 20 発加えた。細胞外活動電位は交流増幅器にて増幅し、pCLAMP 計測ソフトウェアを利用して記録した。

【結果】

本研究では最初に海馬苔状線維の興奮性が伝達物質漏出によって調節されるのを確認した。CA3 野放線層に反復刺激を加えると、その 50 ミリ秒後の PS の振幅は増大し、潜時も短縮した。これは苔状線維のシナプス前部に存在する受容体が、他のシナプスから漏出した神経伝達物質によって活性化されることで、軸索の脱分極を引き起こし、活動電位を発生する苔状線維の本数が増加したためと考えられた。

この実験においては、放線層に加えた刺激が苔状線維に波及し、活動電位を引き起こして苔状線維そのものからのグルタミン酸放出を誘発している可能性を除外できなかった。そこであらかじめ放線層刺激の強度を調節し、苔状線維を刺激しない条件で以下の実験を行った。この刺激強度の調節による方法は、苔状線維に特徴的な促進現象を利用したものであり、きわめて鋭敏に刺激波及の有無を鑑別する事が可能であった。苔状線維を刺激しない強度の放線層反復刺激によっても、PS は振幅の増大と潜時の短縮が見られた(振幅 : $116.5 \pm 3.6\%$, 潜時 : $96.2 \pm 1.8\%$, $n = 5$)。この効果は非 NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬の CNQX によって消失した。GABA の漏出による影響を調べるために、CNQX 投与に引き続いて GABA_A 受容体阻害薬の picrotoxin 投与を行ったが PS の振幅と潜時には大きな変化は見られなかった。この結果から、放線層に存在する連合/交連線維から放出されたグルタミン酸の伝達物質漏出が前シナプスのカイン酸受容体に作用して苔状線維の興奮性を変化させている事が想定された。次に漏出したグルタミン酸の効果持続時間を調べるために放線層反復刺激と苔状線維刺激の間隔を 10 ミリ秒から 2000 ミリ秒まで変化させる実験を行った。室温条件下 (25 度) では PS の増大は反復刺激後 10 ミリ秒から確認され、50 ミリ秒までは同程度であった。その後、刺激間隔と共に減少して 500 ミリ秒後には効果は消失した。グルタミン酸トランスポーター阻害薬である TBOA の投与により、その効果時間は延長して 500 ミリ秒後でも十分な増大が確認された。グルタミン酸トランスポーターの働きが強まる生理的条件下 (35 度) では、室温条件下 (25 度) と比べて程度はやや小さいが、10 ミリ秒から 50 ミリ秒まで同様に PS の増大を確認することができた。これらの結果から、グルタミン酸の伝達物質漏出が海馬 CA3 野での異シナプス性調節を担っている事、及びグルタミン酸トランスポーターが伝達物質漏出の制御に寄与している事が示された。

【考察】

中枢神経における伝達物質漏出は今まで、比較的近傍に存在する同種のシナプスの受容体に作用する様式が知られていた。本研究では反復刺激の強度を厳密に調節し、苔状線維を刺激していない事を確認した状態で、連合/交連線維から放出されたグルタミン酸が漏出し、苔状線維の興奮性を調節する事を見出した。この伝達物質漏出の効果はグルタミン酸トランスポーターによって調節されており、トランスポーター阻害薬の投与により作用時間は大きく延長した。トランスポ

ーターの機能が亢進する生理的溫度条件下でも伝達物質漏出の効果が確認できた事は、実際の生体内で伝達物質漏出がシナプス伝達の調節に携わっている可能性を示唆するものである。

【結論】 離れた距離にある交連／連合線維のシナプスから放出されたグルタミン酸が、シナプス外部に漏出して海馬苔状線維の脱分極を促し、異シナプス性に興奮性を調節する事が確認された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	神谷	温之
副査	教授	渡邊	雅彦
副査	教授	本間	さと
副査	教授	田中	真樹
副査	教授	福田	諭

学位論文題名

Studies on heterosynaptic modulation by long-range spill-over of glutamate.

(神経伝達物質グルタミン酸の長距離拡散による
異シナプス性調節に関する研究)

神経伝達物質がシナプス外部に漏出して他の部位に作用する伝達物質漏出の神経情報処理における意義を明らかにする目的で、海馬 CA3 野における異シナプス間相互作用について検討した。マウス海馬急性スライスにおいて CA3 野透明層を電気刺激し、歯状回顆粒細胞層から苔状線維の逆行性集合活動電位を測定した。CA3 野放線層に反復刺激を加えると、その 50 ミリ秒後の透明層刺激による逆行性集合活動電位の振幅は増大し、潜時も短縮した。苔状線維のシナプス前部に存在する受容体が、他のシナプスから漏出した神経伝達物質によって活性化されることで軸索の脱分極を引き起こし、活動電位を発生する苔状線維の本数が増加したと考えられた。この効果は非 NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬の CNQX によって消失した。GABA の漏出による影響を調べるために、CNQX 投与に引き続いて GABA_A 受容体阻害薬の picrotoxin 投与を行ったが逆行性集合活動電位の振幅と潜時には大きな変化は見られなかった。これらの結果から、放線層に存在する連合/交連線維から放出されたグルタミン酸の伝達物質漏出がシナプス前部の非 NMDA 型グルタミン酸受容体に作用して苔状線維の興奮性を増大したと考えられた。次に漏出したグルタミン酸による異シナプス性作用の持続時間を調べるために放線層反復刺激と苔状線維刺激の時間間隔を変化させる実験を行った。室温条件下 (25 度) では逆行性集合活動電位の増大は反復刺激後 10 ミリ秒後から確認され、50 ミリ秒後までは同程度であった。その後、時間間隔の延長と共に減少して 500 ミリ秒後には効果は消失した。グルタミン酸トランスポーター阻害薬である TBOA の投与により、その効果時間は延長して 500 ミリ秒後でも十分な

増大が確認された。グルタミン酸トランスポーターの活性が高いと想定される生理的
温度条件下（35 度）では逆に逆行性集合活動電位の増大は減弱したものの軽度の増
大が観察された。以上の結果から、グルタミン酸の伝達物質漏出が海馬 CA3 野での異
シナプス性調節を担っている事、及びグルタミン酸トランスポーターが伝達物質漏出
の制御に寄与している事が示された。トランスポーターが正常に機能する生理的温
度条件下でも伝達物質漏出の効果が確認できた事は、生体内でも伝達物質漏出が局所神
経回路の情報処理に携わっている可能性を示唆する。

口頭発表に対し、以下の質疑応答がなされた。まず、渡邊教授から軸索の脱分極を
直接的に計測する事が可能であるか否かについて質問があった。これについて申請者
は、本研究においては軸索の脱分極を直接計測してはいないが、シナプス前部のパッ
チクランプ法により計測可能であると回答した。本間教授から生理的溫度条件ではな
く、室温で実験をおこなった理由について質問があり、申請者はまず伝達物質漏出の
効果が強く確認可能な室温で種々の実験を行い、その後生理的溫度条件でも同様の結
果が得られる事を確認して妥当性を検証した、と回答した。副査の田中教授からはス
ライス外部に漏出したグルタミン酸が灌流液を介して拡散する可能性について質問が
あった。これについて申請者は、スライスに対する灌流方向を変化させた状態で実験
をおこない、灌流の影響を検討するのが妥当であると回答した。また福田教授からは、
今回の研究で得た成果をどのように臨床的研究に結びつけるかという質問があり、申
請者は嗅覚路、特に嗅粘膜を対象とした電気生理学的実験をおこない、嗅細胞の興奮
性に関する研究に取り組む決意を述べた。最後に神谷教授からグリア細胞のネットワ
ーク活動が軸索の興奮性に携わるという最近の知見が、今回の実験結果の解釈に及ぼ
す影響について質問があり、申請者はグリア細胞の影響について評価するためには、
グリア細胞特異的な阻害剤を用いた実験や、刺激部位を変化させた実験をおこなう必
要があると回答した。

この論文は、グルタミン酸の長距離拡散による異シナプス間相互作用を初めて明ら
かにした点で高く評価され、今後の中樞神経系における情報処理機構の研究に新たな
視点をもたらすことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位な
ども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定し
た。