

学位論文題名

GABA合成酵素含有5-HT作動性神経の
生理学的特性に関する研究

学位論文内容の要旨

【目的と背景】 化学シナプスでは、神経細胞はシナプス前ニューロンから後ニューロンに神経伝達物質を放出し、情報を伝達する。これを担う神経伝達物質は、グルタミン酸やγ-アミノ酪酸 (GABA) などのアミノ酸、アセチルコリンやドーパミンなどのモノアミンが典型的である。これらの神経伝達物質がニューロペプチドや成長因子などの神経調節因子と共放出される可能性が報告されているが、アミノ酸やモノアミン同士の classical な神経伝達物質の共放出も少なからず報告されている。これはシナプス前ニューロンが複数の神経伝達物質によって後ニューロンの活動を制御すると考えられる興味深い現象である。セロトニン (5-hydroxytryptamine: 5-HT) は、臨床的所見および動物実験の結果から、精神機能の調節に深く関わっていると考えられる神経伝達物質である。中枢神経系における 5-HT 作動性神経は、脳幹の正中部に位置する縫線核群を起始核として存在する。中でも背側縫線核 (dorsal raphe nucleus: DRN) および正中縫線核の 5-HT 作動性神経は、扁桃体や側坐核、大脳皮質や海馬にそれぞれ投射し、情動調節機能に関与している。DRN には 5-HT を単独発現する 5-HT ニューロンと GABA の合成酵素である glutamic acid decarboxylase (GAD) を共発現する 5-HT/GAD ニューロンが存在していることが報告されている。これは 5-HT/GAD ニューロンが GABA と 5-HT を共放出する可能性を示唆するものであるが、詳細は全く不明である。また 5-HT と同様に、GABA も情動調節機能を担う神経伝達物質であることから、5-HT/GAD ニューロンは情動に特化した生理学的機能を有することが想定される。そこで本研究では、この 5-HT/GAD ニューロンの機能的役割の追究を目的として、電気生理学的検討、形態学的検討および情動ストレス応答に関わる行動薬理学的検討を行った。本研究は第 1 章「GABA 合成酵素含有 5-HT 作動性神経の電気生理学的および形態学的特徴の検討」および第 2 章「GABA 合成酵素含有 5-HT 作動性神経のストレス応答性に焦点を当てた行動薬理学的および組織化学的検討」で構成される。

【材料と方法】 ① 電気生理学的解析：生後 3-4 週齢の雄性 Wistar/ST rat の脳から縫線核を含む厚さ 300 μm の冠状断急性スライスを作製し、背側縫線核神経細胞から whole-cell patch clamp 記録を行った。電気記録後、ガラス管電極より回収した total RNA を用いて単一細胞 RT-PCR 法を行い、5-HT 合成酵素である tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) mRNA および 67kbp-GAD (GAD67) mRNA の発現パターンから記録ニューロンを分類した。② 形態学的解析：多色蛍光 *in situ* hybridization 法または免疫蛍光法により、TPH2、GAD67、小胞体 GABA トランスポーター (VIAAT)、5-HT トランスポーター (HTT) の mRNA およびタンパク質の局在解析を行った。③ 行動薬理学的解析：open field (OF) ストレスまたは contextual fear conditioning (CFC) ストレスを負荷した後、ラットを 4% paraformaldehyde で灌流固定し、厚さ 30 μm の凍結切片を作製した。神経細胞活性時の最初期遺伝子 *c-fos* のタンパク質 (c-Fos) を ABC 酵素抗体法により検出し、DRN を背側部 (DRD)、腹側部 (DRD)、lateral wing 部 (DRL) に細分化した各領域における c-Fos 発現数を計測した。この c-Fos 発現の情動特異性

を検証するため、ストレス負荷前に benzodiazepine 系抗不安薬である diazepam を全身投与し、各領域の c-Fos 発現数の変動を計測した。次に情動ストレス特異的 c-Fos 発現のニューロン選択性を解析するために、c-Fos 抗体、TPH2 抗体および GABA ニューロンのマーカーである parvalbumin (PV) 抗体を用いた 3 重免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による免疫蛍光顕微鏡解析を行った。

【結果と考察】第 1 章：単一細胞 RT-PCR 法により、whole-cell patch clamp 記録ニューロン (n=82) は、TPH2 mRNA 陽性である 5-HT ニューロン (52.4%, n=43)、TPH2/GAD67 mRNA 両陽性である 5-HT/GAD67 ニューロン (12.2%, n=10)、GAD67 mRNA 陽性である GAD67 ニューロン (4.9%, n=4) およびいずれも陰性であるその他のニューロン (30.5%, n=25) に分類された。5-HT/GAD67 ニューロンは、5-HT ニューロンおよび GAD67 ニューロンと比較して、低い発火頻度および低い膜抵抗値という電気生理学的特徴を示した。発火頻度は A タイプ K⁺電流 (IA) によって調節される。この IA は電位依存性 K⁺チャネルのサブタイプである Kv4 ファミリーの関与が知られることから、5-HT/GAD67 ニューロンにおける Kv4 発現様式の違いが示唆される。さらに、入力抵抗値は膜受容体密度や膜表面積に依存することから、他のニューロンと比較して 5-HT/GAD67 ニューロンのサイズが大きい可能性が示唆される。形態学的特性解析では、特に DRL に 5-HT/GAD67 ニューロンの局在が検出された。この 5-HT/GAD67 ニューロンには VIAAT の mRNA およびタンパク質が検出されず、DRN の 5-HT 作動性神経投射先の神経終末においても HTT と VIAAT の共発現は検出されなかった。これは、5-HT/GAD67 ニューロンからの GABA の遊離の可能性を否定するものであり、5-HT と GABA の 2 つの神経伝達物質が co-release される可能性は低いということを示した。過去の報告から、5-HT/GAD67 ニューロン内の GABA は神経伝達物質として存在するのではなく、神経保護作用や神経栄養因子としての機能を持つことが考えられた。第 2 章：OF ストレス負荷により、DRL、DRD、DRV のいずれの領域においても c-Fos の発現が増大し、特に DRL では DRD および DRV と比較して有意な発現数増大が見られた。CFC ストレス負荷では、DRD、DRV、DRL すべての領域において c-Fos 発現数が増大したものの、領域間での有意差は無かった。これらのストレス負荷による DRL における c-Fos 発現増大は、抗不安薬 diazepam の投与により有意に抑制されたことから、この c-Fos 発現は不安情動特異的であることが示された。また、OF ストレス負荷により誘発された c-Fos は、5-HT ニューロンよりも 5-HT/PV ニューロンに選択的に発現しており、CFC ストレスにより誘発された c-Fos はその逆であった。これは 5-HT ニューロンよりも 5-HT/GAD67 ニューロンは OF ストレスのような軽度なストレスに対して選択的に反応することを示すものであり、ストレスの強度や種類に応じて DRL 内の存在する神経細胞は異なった反応を示すことが考えられた。

【結論】GABA 合成酵素 GAD67 含有 5-HT 作動性神経は、ラット DRL 領域に局所的に存在していることが明らかとなった。この神経細胞は共存する GABA を遊離せず、5-HT 作動性神経や GABA 作動性神経とも異なった電気生理学的特徴を持つ。また mild なストレスに対して反応し、生体のストレス応答反応に寄与することが示唆された。一部のストレスに対して特異的に反応性を示すこの神経の生理学的機能や形態学的特徴を追求していくことは、情動関連精神疾患の病態解明の糸口となることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 神 谷 温 之
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 田 中 真 樹
副 査 教 授 渡 邊 雅 彦

学位論文題名

GABA合成酵素含有5-HT作動性神経の 生理学的特性に関する研究

近年、1つの神経細胞内に複数の神経伝達物質が存在する報告がなされている。この複数の神経伝達物質によるシナプス後ニューロンの活動制御機構に関しては、その真偽も含めて不明な点も多い。本研究は GABA 合成酵素含有 5-HT 作動性神経の生理学的特性を明らかにすることを目的として、電気生理学的、分子生物学的、形態学的、行動薬理学的手法のすべてを駆使し、当該神経細胞の特性を多角的に評価した。

本研究の第1章では、免疫組織化学染色法および *in situ* hybridization 法を用いた共焦点レーザー顕微鏡解析を行い、GABA 合成酵素 GAD67 含有 5-HT 作動性神経 (5-HT/GAD67 ニューロン) が、ラット背側縫線核 lateral wings (DRL) 領域に局所的に存在していることを明らかにした。またこの神経細胞には、GABA をシナプス間隙へ遊離する際に必要な小胞膜トランスポーター vesicular inhibitory amino acid transporter (VIAAT) が検出されなかった。この結果は、細胞内に共存するであろう 5-HT と GABA の2つの神経伝達物質が共放出される可能性を否定するものであった。電気生理学的検討では、whole-cell patch clamp 法に単一細胞 RT-PCR 法を組み合わせることで、ニューロン膜特性解析に加えて、記録ニューロンの分子生物学的同定解析を行った。その結果、5-HT/GAD67 ニューロンは 5-HT ニューロンや GAD67 ニューロンと比較して、発火頻度が低く、入力抵抗が有意に小さいという細胞膜特性が明らかにされた。これらの結果は、各ニューロン間でのイオンチャネルの発現数の差や、細胞サイズの違い、細胞表面積の差を示唆するものであった。第2章では、5-HT/GAD67 ニューロンのもつ生体内情動制御機能に焦点を当て、情動ストレス負荷時の神経細胞の活性化を、最初期遺伝子転写因子の一つである c-Fos タンパクの免疫染色を行うことにより検討した。Open field (OF) ストレス負荷により、DRL 領域において c-Fos 発現数の増大が認められた。同様に、contextual fear conditioning (CFC) ストレス負荷によっても DRL 領域において c-Fos 発現数の増大が認め

られた。これらのストレス負荷により誘発された c-Fos 発現数の増大は、抗不安薬 diazepam (0.5 mg/kg, i.p.) の全身投与により有意に抑制された。この結果から、ストレス負荷により誘発された DRL における c-Fos の情動特異性が示された。次にストレス負荷により誘発された c-Fos 陽性細胞の性質同定のために、5-HT 合成酵素である tryptophan hydroxylase、GABA のマーカーである parvalbumin (PV)、そして c-Fos の計 3 つの抗体を使用した蛍光 3 重免疫染色を行った。その結果、PV 陽性 5-HT 作動性神経 (5-HT/GAD67 ニューロン) は、CFC ストレスよりも OF ストレスに対して優先的に反応することが示された。逆に、PV 陰性 5-HT 作動性神経 (5-HT ニューロン) は OF ストレスよりも CFC ストレスに対して優先的に反応することが示され、各ニューロンのストレス応答性には特異性が存在する可能性が示された。

最終審査では申請者の発表に対し、副査の渡邊雅彦教授から、OF ストレスと CFC ストレスの質的な違いや、DRL 領域に存在する 5-HT 作動性神経の投射領域についての質問がなされ、RT-PCR 法における primer の設計に関する助言がなされた。副査の田中真樹教授から、5-HT 作動性神経の情動調節メカニズム、DRL 領域へ神経投射を行う脳領域、GAD67 ニューロンの発火特性に関する質問がなされた。副査の吉岡充弘教授から、5-HT/GAD67 ニューロン内に存在するであろう GABA の生理学的機能や、5-HT 神経系の発達の観点からの GABA の役割について質問がなされた。さらに主査の神谷温之教授から、活動電位波形の詳細な解析結果や、入力抵抗に関する過去の文献との比較検討、negative-current 注入中の電位変化に関する電気生理学的な質問がなされた。申請者はすべての質問に対して、自らの実験結果と過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。特に、DRL 領域への入力神経投射に関しては、大脳皮質や手綱核からの神経投射を代表的な例として挙げ、これらの脳領域が DRL に存在する神経の活動を調節する可能性を説明した。また、5-HT/GAD67 ニューロン内に存在するであろう GABA の生理学的な機能に関しては、細胞膜 GABA transporter の逆回転や、GABA shunt を介した神経保護作用などを挙げ、GABA のもつ多様な生理学的役割を説明した。

本学位論文は、GABA 合成酵素含有 5-HT 作動性神経の生理学的特性の一端を明らかにし、その成果は情動に関連した精神疾患の病態解明の糸口となることが期待される。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。