

氏名	さくら い えい の すけ 櫻 井 英 之 助
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 637 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	長期増強現象におけるニューロペプチドおよび神経細胞接着因子の役割 に関する海馬切片標本での電気生理学的研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 公 道 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 赤 池 昭 紀

論 文 内 容 の 要 旨

1970年代初頭、大脳辺縁系に属する海馬において入力線維に高頻度の刺激を与えると、その後シナプス反応が長期にわたって増強される現象、いわゆる長期増強 (long term potentiation; LTP) が見いだされた。LTP は学習や記憶などの神経高次機能の可塑性の基礎となる細胞レベルでの現象として提唱され、その詳細なメカニズムの検証が現在まで精力的に進められている。しかし、行動薬理学的に学習・記憶機能に影響を与えることが知られている薬物が、LTP にどのような作用を及ぼすのかの検証は不十分であり、LTP の誘導・発達・維持の諸相に関する新規内因性物質の存在の可能性もある。そこで著者は、電気生理学的手法を用い、海馬スライスにおける LTP を対象に数種の興味深い物質の作用を詳細に検討し、以下の新知見を得た。

第一章 ガラニンおよびアルギニンバソプレッシンの海馬長期増強に対する作用

モルモット海馬切片において、0.2 Hz の試験刺激を Schaeffer 側枝に与えることにより誘発される興奮性シナプス後電場電位 (fEPSP) を CA1 野の放線層より細胞外記録した。33 Hz, 5 秒間のテタヌス刺激を加えることにより1時間以上にわたり fEPSP は約40%増大したので、LTP の誘発が確認された。行動薬理学的に記憶障害を引き起こすことが報告されているガラニンを海馬切片に灌流適用すると、テタヌス刺激前の fEPSP には影響しなかったが、LTP は有意に減弱した。ガラニンの中枢性受容体拮抗薬である M40 単独では LTP に影響しなかったが、ガラニンと M40 を同時適用するとガラニン単独で見られた LTP 抑制効果を消失させた。これよりガラニンは中枢性受容体を介し、LTP に抑制的に関わっていることが示された。次いで、学習行動に正負双方向的に影響を及ぼすことが報告されている [Arg⁸]-vasopressin (AVP) の作用について検討した。AVP を灌流適用することによりテタヌス負荷前の fEPSP に影響することなく、用量依存的に LTP を抑制した。この抑制作用は、苔状線維-CA3 野系の LTP においても見られた。V1 受容体拮抗薬と AVP を同時適用すると AVP による LTP 抑制作用は減弱した。

以上の実験結果は、ガラニン及び AVP がそれぞれの中枢型受容体を介して LTP を抑制的に調節することを示唆している。

第二章 神経細胞接着因子の海馬長期増強に対する作用

終脳に特異的に発現する神経細胞接着因子、テレンセファリン (TLCN) に注目し、先ず特異的 TLCN 抗体を用いてラット海馬内分布を調べた。CA1 野では、TLCN は錐体細胞の樹状突起部位に局在していることが示された。さらに免疫電顕を用いた解析により、TLCN は樹状突起の膜部位にのみ存在し、軸索側には存在しないことが明らかとなった。

次に、TLCN の神経可塑性に対する機能を調べるため、抗 TLCN 抗体あるいは TLCN キメラタンパクをマイクロインフュージョンポンプにより記録部位近傍に局所適用し、ラット海馬切片の LTP に対する作用について検討した。100 Hz, 1 秒間のテタヌス刺激を加えることにより fEPSP は約60%増大した。抗 TLCN 抗体をテタヌス刺激前から局所適用したところ、テタヌス刺激前の fEPSP は変化しなかったが、LTP は20 μg/ml 以上で有意に抑制された。一方、対照として用いたウサギ IgG は LTP に有意な影響を及ぼさなかった。次に、内在性の TLCN カウンター受容体を予めブロックし TLCN

の接着分子機能を阻害する目的で、TLCNのキメラタンパクである TLCN(1-9)/Fc 或いは TLCN(1-3)/Fc をテタヌス刺激前より投与した。両タンパクは LTP を抑制し、TLCN(1-9)/Fc は $30 \mu\text{g/ml}$ では有意な抑制作用を示した。これに対し TLCN と相同性の高い ICAM-1/Fc およびシグナルペプチド Fc では試みた濃度範囲では LTP に明らかな作用を示さなかった。以上の結果より、切片に適用された TLCN のキメラタンパクは LTP の誘導を抑制することが示された。

次に LTP の発達相および維持相に TLCN がどのような関わりがあるかを調べるため、テタヌス刺激後に TLCN(1-9)/Fc を適用した。テタヌス刺激直後から20分間局所適用した場合、TLCN(1-9)/Fc は有意に LTP の増大を抑えた。一方、テタヌス刺激後5分から20分間適用した場合、TLCN(1-9)/Fc はわずかに増大率を抑える傾向を見せたが、有意差は生じなかった。これらのデータは、TLCN が LTP の誘導相だけでなく発達相にも関与しているが、維持相には関与していないことを示唆している。

以上、著者は行動薬理学的に学習・記憶に影響を与えることが知られている神経ペプチドであるガラニンと AVP が、LTP ではそれぞれの受容体を介して抑制的に関わっていること、さらに新規細胞接着因子である TLCN が LTP の形成、特に誘導相及び発達相に関与していることを示した。これらの知見は、LTP の発現機序を考える上での基礎的な知見であり、抗痴呆薬の開発や記憶障害の機序解明に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

海馬で見出されたシナプス活動の長期増強現象は学習・記憶機能の細胞レベルでの素因的過程と考えられ、その発現や調節に関する詳細な機構解明が進みつつあるが、まだ不明な点も多く残されている。著者は、行動薬理学的に学習・記憶機能を変化させる薬物や新規内因性物質の長期増強への影響を、海馬スライス標本において電気生理学的手法で調べ興味ある知見を得た。

第一章 ガラニンおよびアルギニンバソプレッシンの海馬長期増強に対する作用

モルモット海馬スライス標本において Schaeffer 側枝電気刺激による CA1 野放線層での興奮性シナプス後電場電位を指標に、テタヌス刺激前15分から20分間灌流適用した2つの生理活性ペプチドの作用を調べた。行動薬理学的に学習・記憶機能障害をもたらすことが知られているガラニン (10^{-7}M) は、テタヌス刺激前の試験反応には影響することなく長期増強を有意に抑制した。この抑制作用はガラニンの中枢性受容体拮抗薬である M40 の同時適用によって消失した。行動薬理学的に学習・記憶機能に影響があることは認められているが、亢進あるいは抑制と正負双方向の影響が報告されているアルギニンバソプレッシ (AVP) は、 10^{-9} および 10^{-8}M の濃度で、テタヌス刺激前の試験反応に影響することなく長期増強を有意に抑制した。この抑制作用は V1 受容体拮抗薬 ($[\text{Pmp}^1, \text{Tyr}(\text{Me})^2]\text{-AVP}$) の同時適用によって減弱した。これらの結果から、ガラニンおよび AVP はそれぞれ特異的受容体を介して海馬における長期増強の誘導を抑制的に調節することを指摘した。

第二章 神経細胞接着因子の海馬長期増強に対する作用

吉原、森らによって終脳に特異的に発現する神経細胞接着因子として発見されたテレンセファリン (TLCN) に着目して、海馬内分布および長期増強との関連をラットにおいて調べた。まず特異的 TNCL 抗体を用いて海馬内分布を調べ、CA1 野では錐体細胞の樹状突起部位に局在すること、さらに免疫電順により樹状突起の膜にのみ存在し軸索側には存在しないことを明らかにした。次に、海馬スライス標本において Schaeffer 側枝電気刺激による CA1 野放線層での興奮性シナプス後電場電位の長期増強を指標に、(1)内因性 TLCN を抗 TLCN 抗体でトラップして不活性化し、(2) TLCN の接着分子機能の発現に重要な役割を果たしていると考えられる TLCN カウンター受容体を外部適用した TLCN キメラタンパクで遮断して内因性 TNCL の接着分子機能を阻害する、といった処置をしたときの影響を調べた。その結果、テタヌス刺激5分前または直後から20分間処置した場合には、長期増強は特異的に抑制されたが、テタヌス刺激5分後から20分間処置されたときは影響は観察されなかった。これらの結果から、TLCN は長期増強の誘導相および発達相において促進的な役割を果たしているが、長期増強の維持相には関与していないことが示唆される。

以上の諸成績は、学習・記憶機能の素因的過程と考えられる長期増強現象発現に関する基本的な情報を与えると共に、新たな薬物による調節の可能性を示唆しており、抗痴呆薬の開発にも有用な知見であると考えられる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成12年10月6日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。