

氏名	わたなべ だい 大 渡 辺
学位(専攻分野)	博士 (医学)
学位記番号	医博第2174号
学位授与の日付	平成12年1月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination (選択的細胞ターゲティング法による小脳ゴルジ細胞の機能解析)

論文調査委員 (主査) 教授 川口三郎 教授 柴崎 浩 教授 橋本信夫

### 論文内容の要旨

中枢神経系には多種多様なインターニューロンが存在する。インターニューロンは局所神経回路の興奮性を制御することにより、記憶や学習の素過程と考えられるシナプスの伝達効率の調節、神経回路の同期化やリズム形成等、中枢神経系の機能発現に重要な役割を果たしていると考えられている。小脳皮質では、興奮性シナプス伝達による神経回路は、苔状線維-顆粒細胞-プルキンエ細胞、登上線維-プルキンエ細胞から構成される。この興奮性シナプス伝達による神経回路は、3種類のGABA作動性インターニューロン(ゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞)の抑制性調節を受けている。ゴルジ細胞は、顆粒細胞に対してGABAによる抑制性制御を行う唯一のインターニューロンであり、苔状線維から小脳皮質への興奮性入力を制御することで重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、ゴルジ細胞を正確に同定し、その機能を体系的に解析することが困難であった為、その生理的機能は明らかではなかった。

小脳皮質インターニューロンであるゴルジ細胞の機能を明らかにすることを主眼とし、発生工学的手法を用いてトランスジェニックマウスを作製した。代謝型グルタミン酸受容体2型(mGluR2)は、小脳において、GABA作動性インターニューロンであるゴルジ細胞に発現している。マウスmGluR2遺伝子の上流域をプロモーターとしてヒトインターロイキン2型受容体 $\alpha$ サブユニット(IL-2R $\alpha$ )、及びIL-2R $\alpha$ とクラゲ蛍光タンパク(GFP)の融合タンパク(IL-2R $\alpha$ /GFP)を発現する2系統のトランスジェニックマウスを作製した。*in situ* hybridization及び、免疫組織学的手法により、トランスジェニックの発現分布を調べたところ、小脳では、mGluR2の発現と一致して、ゴルジ細胞特異的に発現を認めた。これにより、IL-2R $\alpha$ に特異性をもつイムノトキシン(anti-Tac(Fv)-PE38)投与によって成熟マウス個体からゴルジ細胞を選択的に欠失させることが可能となった。

イムノトキシンを小脳虫部背側に局所投与すると、ゴルジ細胞のみが選択的に脱落し、強い運動失調が出現した(急性期)。失調は徐々に回復し、ゴルジ細胞脱落に対して代償機構が働くと考えられた(慢性期)。rotorod test及びstational bar testにより、慢性期においても複雑な協調運動に障害が残存することが明らかとなった。これは、ゴルジ細胞が小脳における運動調節機能に必須であることを示す。

ゴルジ細胞は、苔状線維-顆粒細胞間のシナプス伝達を調節していると考えられている。ゴルジ細胞除去による苔状線維-顆粒細胞間のシナプス伝達の変化を調べる為、小脳スライス上で膜電位感受性色素を用いた光学的膜電位測定法及びパッチクランプ法を行った。GABA作動性ニューロンであるゴルジ細胞はGABA<sub>A</sub>受容体を介して顆粒細胞を抑制する。この抑制作用は、苔状線維-顆粒細胞間のグルタミン酸による興奮性シナプス伝達のうち、NMDA受容体を介する興奮性シナプス伝達を効果的に抑制していることが明らかとなった。さらにゴルジ細胞脱落後の慢性期では、GABA<sub>A</sub>受容体を介した抑制が解除されるだけでなく、NMDA受容体機能の不活化により顆粒細胞の興奮性も低下することが明らかとなった。

以上の結果は、苔状線維-顆粒細胞間のシナプス伝達においてゴルジ細胞が単にGABAを介した抑制性制御のみならず、

NMDA 受容体の興奮性を調節することで小脳の運動制御に重要な役割を果たすことを示す。

### 論文審査の結果の要旨

中枢神経系の複雑な機能発現には、インターニューロンによる局所神経回路の制御が重要である。本研究は、組み換え遺伝子導入マウスを用いて、GABA 作動性インターニューロンである小脳ゴルジ細胞による小脳皮質神経回路の制御機構を明らかにしようとしたものである。

遺伝子工学的手法により、小脳ではゴルジ細胞特異的にヒト・インターロイキン 2 型受容体 (IL-2 R $\alpha$ ) を発現する組み換え遺伝子導入マウスを作成した。IL-2 R $\alpha$  に特異的なイムノトキシンの投与により、マウス成熟個体からゴルジ細胞を選択的に除去する実験系を確立した。ゴルジ細胞除去後、強い運動失調が生じる急性期と、強い運動失調から回復するが複雑な協調運動では障害が残る慢性期の 2 相性の運動機能障害が生じることを明らかにした。次に、慢性期に働く代償機構の解析を行い、ゴルジ細胞が GABA を介して顆粒細胞の興奮性を調節するだけでなく、苔状線維-顆粒細胞間のグルタミン酸作動性シナプスの NMDA 受容体の活性制御にも関与していることを明らかにした。以上により、ゴルジ細胞が小脳の協調運動調節機能に必須であること、さらに脳機能障害からの回復の機序の一つとしてシナプス伝達物質受容体の可塑的变化があることを示した。

以上の研究は、インターニューロンの生理的機能・中枢神経系の機能異常に働く代償機構の解明に貢献し、神経科学・医学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 11 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。