

氏名	まえだ たけひこ 前 田 武 彦
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 571 号
学位授与の日付	平 成 9 年 7 月 23 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	海馬苔状線維—CA3野長期増強発現機序およびムスカリン受容体サブ タイプ M ₁ , M ₂ を介した調節機構に関する電気生理学的研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 公 道 教 授 赤 池 昭 紀 教 授 市 川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

高齢人口の増加に伴い、老年痴呆症が医療上および社会的に問題となっており、これを治療する抗痴呆薬の開発が急務となっている。この老年痴呆症の主な病態として記憶障害があり、病因の一つとして大脳皮質および海馬におけるコリン作動性神経系の機能低下が知られている。また、動物実験において、ムスカリン様アセチルコリン受容体作用薬が学習・記憶に影響を与えることが示されている。1973年に発見された海馬における長期増強 (LTP) 現象は、学習・記憶のシナプスレベルでの基礎的過程として提唱されているが、特に苔状線維—CA3野 LTP の発現機序に関しては未詳の部分が多い。また、ムスカリン受容体作用薬の海馬 LTP に対する作用の詳細は不明である。そこで著者は、電気生理学的手法を用いて、ムスカリン受容体作用薬カルバコール (CCh) の、海馬切片苔状線維—CA野 (CA3)LTP に対する作用を精査し、さらに、単一電気刺激による興奮性アミノ酸の遊離を検出できるパッチセンサー法を確立し、この手法を用いて、CA3野 LTP およびシャファー側枝—CA1野 (CA1)LTP の発現機序について調べ、以下の新知見を得た。

第一章 海馬苔状線維—CA3野長期増強のコリン作動性薬物による調節

モルモット海馬切片において、0.2 Hz のテスト刺激を苔状線維に与えることにより誘発される場の興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を細胞外記録した。CA3野透明層における fEPSP の振幅は、33 Hz、5 秒間のテタヌス刺激により平均50%増大し、その増大が1時間以上にわたり持続する LTP が観察された。切片に0.01 μ M および0.1 μ M の CCh を灌流適用すると、テタヌス前の fEPSP は変化することなく、LTP は減弱された。この減弱作用はムスカリン受容体のサブタイプの一つ、M₂ 受容体の選択的拮抗薬である AF-DX116 (AF) により拮抗された。一方、1 および10 μ M の CCh の適用により、テタヌス前の fEPSP は減少したが、このテタヌス刺激直前の fEPSP を基準にするとテタヌス後の増強は、薬物未処置切片より有意に大きかった。その増大率は、刺激強度あるいは灌流液中の Ca²⁺ 濃度を減少してテタヌス前の反応の大きさを CCh 処置切片と同程度に減少させる処置を行った切片での増大率よりも大きかった。高濃度の CCh による LTP 増大作用は選択的 M₁ 受容体拮抗薬であるピレンゼピン (PZ) により拮抗された。以上の結果から、低濃度の CCh は M₂ 受容体を、高濃度の CCh は M₁ 受容体を介して CA3野 LTP の発現をそれぞれ抑制または促進することが示唆される。

第二章 海馬コリン作動性神経系破壊の苔状線維—CA3野 LTP に対する影響

痴呆モデル動物の作製に使用されるコリン作動性神経毒 AF64A をモルモット脳室中に投与し、一週間後に作製した海馬切片 (AF64A 切片) より記録を行った。生理的食塩水を投与したモルモットより作製した海馬切片 (対照切片) に比べ、AF64A 切片ではコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性の低下、および、海馬内の抗 ChAT 抗体陽性細胞の減少が観察された。AF64A 切片における CA3野の LTP は、対照切片に比べ有意に小さかった。AF64A 切片での CCh の LTP に対する影響は対照切片の場合とは異なり、10 nM—10 μ M では増大作用のみ示し、この作用は PZ により拮抗された。さらに、PZ、AF およびアセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるフィズチグミン (Phy) の各単独効果について検討した。対照切片の LTP に対して、PZ (1 μ M) は減弱作用を、AF (1 μ M) は増大作用を示し、さらに Phy は低濃度 (0.1 μ M) で減弱作用を、高濃度 (10 μ M) で増大作用をそれぞれ示した。一方、AF64A 切片においては、PZ、AF およ

びPhy, いずれの薬物もLTPに対して有意な影響を与えなかった。以上の結果は, AF64Aは内在性アセチルコリンの遊離およびM₂受容体の機能を抑制することによりCA3野LTPを減弱すること, また, 海馬内在性コリン作動性神経はCA3野LTPに対して, M₁受容体を介して促進的に, M₂受容体を介して抑制的に調節することを示唆している。

第三章 パッチセンサー法を用いた単一電気刺激により誘発される海馬切片グルタミン酸遊離の検出および海馬長期増強発現機序の解明

若齢ラット海馬切片において, CA1野およびCA3野錐体細胞にホールセルクランプあるいはアウトサイドアウトパッチクランプ(パッチセンサー)を行った。CA1野記録時にはシャファー側枝を, CA3野記録時には苔状線維の単一電気刺激を行い, ホールセルクランプした錐体細胞より興奮性シナプス電流(EPSC)を記録した。この電気刺激により遊離した興奮性アミノ酸を検出する目的で, パッチセンサーをシナプス領域に固定し, パッチ電流を測定した。また, 後シナプス細胞の興奮性を調べる目的で, グルタミン酸受容体サブタイプの一つ, AMPA/KA型受容体の作用薬であるAMPAを含む溶液を充填したピペットをホールセルクランプした細胞の近隣に固定し, AMPAを細胞に適用することでAMPA誘発ホールセル電流(AMPA電流)を記録した。テタヌス刺激として100 Hz, 1秒間の刺激を5秒間隔で3回行うことにより, CA3野におけるEPSCのLTPが発現した。この際, パッチ電流の振幅の著明な増大が観察されたが, AMPA電流の振幅はほとんど変化しなかった。一方, CA1野におけるEPSCのLTPの発現に伴い, AMPA電流の著明な増大が観察されたが, パッチ電流はほとんど変化しなかった。以上の結果より, CA3野LTP発現時には興奮性アミノ酸遊離が, CA1野LTP発現時にはシナプス後細胞の応答性が増大していることが示唆される。

以上, 著者は海馬CA3野LTPがムスカリン受容体のサブタイプのうちM₁によって促進的に, M₂によって抑制的に調節されることを明らかにした。また, LTPの発現機序解明にあたり, 現在最も直接的な手法と考えられるパッチセンサー法を確立し, これを用いてCA3野およびCA1野LTPの発現機序の違いを明示した。本研究の成果は, 抗痴呆薬としてのムスカリン受容体作用薬の作用機序の解明および新たな抗痴呆薬の探索に有用な基礎的知見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

記憶・学習機能に深く関与していることが知られている海馬内のシナプスでは, 長期増強という学習・記憶の基礎的過程と考えられる現象が見出され, その発現機序や薬物による影響に興味を持たれているが, 苔状線維—CA3野系での長期増強に関しては未詳の部分が多い。一方, アセチルコリンがこの機能に密接に関与しており, ムスカリン受容体作用薬も学習・記憶に影響を与えることが動物実験において示されているが, 海馬長期増強に対する作用は詳しく調べられていない。著者は, 海馬切片標本における電気生理学的方法により, 主として苔状線維—CA3野系での長期増強(CA3野長期増強)を対象に, ムスカリン受容体作用薬カルバコールの作用を詳しく調べ, またパッチセンサー法という新しい方法を確立して長期増強発現機序に検討を加えた。

第一章 海馬苔状線維—CA3野長期増強のコリン作動性薬物による調節

モルモット苔状線維刺激によるCA3野透明層での場の興奮性シナプス後電位(fEPSP)でみられる長期増強が, カルバコールの低濃度(0.01-0.1 μM)によっては抑制されるが, 高濃度(1-10 μM)では逆に増大すること, 選択的M₂受容体拮抗薬(AF-DX116)は, 抑制作用のみを消失させ, 増大作用には影響しないこと, 選択的M₁受容体拮抗薬(ピレンゼピン)は増大作用のみを消失させ, 抑制作用には無影響であることを明らかにした。これらの結果から, カルバコールはCA3野長期増強を, 低濃度ではM₂受容体を介して抑制的に, 高濃度ではM₁受容体を介して促進的に, 調節することが示唆される。

第二章 海馬コリン作動性神経系破壊の苔状線維—CA3野長期増強に対する影響

選択的コリン作動性神経毒(AF64A)の脳室内注射によりコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が低下したモルモット海馬切片では, 正常モルモット海馬切片の場合と比較して, CA3野長期増強の程度は有意に小さく, カルバコールは0.01-10 μMの濃度範囲で増大作用(ピレンゼピンで消失)のみを示した。さらに, 正常モルモット海馬切片では, ピレンゼピンは減弱作用, AF-DX116は増大作用, フィゾスチグミンは低濃度(0.1 μM)で減弱作用, 高濃度(10 μM)で増大作用をそれぞれ示したが, AF64A処置モルモット海馬切片ではこれらの作用は全て観察されなかった。以上の結果は,

AF64A は内因性アセチルコリンの遊離および M_2 受容体の機能を抑制することにより CA3 野長期増強を減弱すること、さらに海馬内在性コリン作動性神経は CA3 野長期増強に対して、 M_1 受容体を介して促進的に、 M_2 受容体を介して抑制的に調節することを示唆している。

第三章 パッチセンサー法を用いた単一電気刺激により誘発される海馬切片グルタミン酸遊離の検出および海馬長期増強発現機序の解明

若齢ラット海馬切片において、CA1 野および CA3 野錐体細胞にアウトサイドアウトパッチクランプを行ってパッチセンサーとし、これを用いてシャファー側枝、苔状線維の単一電気刺激によりそれぞれ CA1 野、CA3 野で遊離する興奮性アミノ酸を検出した。ホールセルクランプした別の CA1 野、CA3 野錐体細胞からシャファー側枝、苔状線維単一電気刺激に対する反応として興奮性シナプス電流 (EPSC) を記録し、長期増強の発現を観察した。その結果、CA3 野長期増強発現時には興奮性アミノ酸遊離が増大するがシナプス後細胞の応答性は変化せず、逆に、CA1 野長期増強発現時にはシナプス後細胞の応答性が増大するが興奮性アミノ酸遊離は変化しないことを、現時点で最も直接的と考えられる方法で示した。

以上著者は、海馬 CA3 野長期増強がムスカリン受容体のサブタイプによって異なる調節を受けていることを明らかにし、CA3 野と CA1 野の長期増強発現機序の違いを明示した。これらの成果は、抗痴呆薬の探索に有用な基礎的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 9 年 7 月 1 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。