

氏 名	いそ むら よし かず 磯 村 宜 和
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2178 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 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 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	大脳皮質錐体細胞の樹状突起内カルシウム動態に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 大 森 治 紀 教 授 金 子 武 嗣 教 授 川 口 三 郎

論 文 内 容 の 要 旨

[序論] 中枢神経系におけるシナプス可塑性の機構を解明することは、脳の機能的発達や記憶、学習の仕組みを理解するうえで重要である。例えば、ラットの海馬錐体細胞におけるシナプス伝達の長期増強は生後2-3週にかけて著しく発達することが知られている。この長期増強の誘発には活動電位の発生に伴う NMDA 受容体や電位依存性カルシウムチャンネルを介した細胞内カルシウム濃度の上昇が必須であることが示されている。ところが生後数週間にかけての細胞内カルシウム動態の発達過程については不明な点が多かった。そこでホールセルパッチクランプ記録法とカルシウムイメージング法を用い、海馬錐体細胞の尖頭樹状突起において活動電位により誘発される細胞内カルシウム動態が生後発達とともにどのように変化するかを定量的に測定し、その機序と機能的意義について検討を加えた。さらに大脳皮質第 II/III 層および第 V 層錐体細胞についても同様の定量的測定を試みた。

[方法] 生後4-20日齢のラットより海馬、新皮質を摘出し、マイクロスライサーを用いてスライス標本作製し、人工脳脊髄液を循環させた恒温記録槽に静置して測定を開始した。顕微鏡下にて錐体細胞を同定し、カルシウム指示薬 fura-2 を含む電極内液を充填したガラス電極を用いてホールセルパッチクランプ記録をおこなった。シナプス刺激または脱分極刺激により一定の数、頻度の活動電位を発生させたときの膜電位変化を電流固定法により記録した。さらに海馬については、薬理的に Na^+ 、 K^+ コンダクタンスを阻害した条件のもとで一定の膜電位に脱分極させたときに流れるカルシウム電流を電圧固定法により測定した。また、長期増強を観察するためにフィールドシナプス後電位の記録をおこなった。一方、細胞内カルシウム動態の測定については、二波長の照射光 (380,360 nm) により励起された細胞内 fura-2 の蛍光像 (520 nm) を I-CCD カメラによって毎秒 30 画像の速度で取込み、デジタル化と各種補正の後に、二波長励起による蛍光強度比の変化から細胞内カルシウム動態を評価した。

[結果] 海馬錐体細胞の尖頭樹状突起において、活動電位を伴うシナプス刺激により細胞内カルシウム濃度の上昇が誘発された。このような活動電位により誘発される細胞内カルシウム濃度上昇は、生後1週間は低い値を示し、生後2, 3週目にかけて顕著に増大することがわかった。電位固定下、一定の膜電位への脱分極刺激によって誘発されるカルシウム電流密度と細胞内カルシウム濃度上昇ともに生後1週目よりも3週目のほうが大きかった。このことより樹状突起上の電位依存性カルシウムチャンネルの密度増加や性状変化が細胞内カルシウム動態の生後発達の主要因であることが示唆された。また細胞内カルシウム濃度上昇の生後発達、Schaffer 側枝へのシータバースト刺激により誘発される長期増強の感受性の発達過程と良く相関していた。さらに、大脳皮質第 II/III 層および第 V 層錐体細胞についても、海馬と同様の細胞内カルシウム動態の生後発達がみられることがわかった。

[考察] 海馬 CA1 領域において高頻度シナプス刺激により誘発される長期増強は生後2, 3週以降になって出現することがよく知られているが、興味深いことに、生後わずか数日でもシナプス後細胞の膜電位を 0 mV 程度まで強く脱分極させたままシナプス刺激をおこなうと長期増強が誘発されるという研究が報告されている。また長期増強の誘発には、活動電位の発生に伴う NMDA 受容体や電位依存性カルシウムチャンネルを介した細胞内カルシウム濃度の上昇が必須であることが示さ

れている。これらのことから海馬錐体細胞における長期増強の発達過程は、活動電位により誘発される細胞内カルシウム動態の生後発達に依存している可能性が考えられる。同様に、大脳皮質第 II/III 層および第 V 層錐体細胞においてもシナプス可塑性は細胞内カルシウム動態の生後発達に依存している可能性がある。以上のように、大脳皮質において細胞内カルシウム動態の生後発達は中枢神経系の機能的発達に重要な役割を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

中枢神経系のシナプス可塑性の機構を解明することは、脳の機能的発達や記憶、学習の仕組みを理解するうえで重要である。シナプス可塑性（長期増強）の誘発には細胞内カルシウム濃度の上昇が必須であるとされている。本研究は、大脳皮質錐体細胞の樹状突起における細胞内カルシウム動態の生後発達の過程とその機序を明らかにし、長期増強の誘発に対する機能的役割について検討を加えたものである。

まずラット脳切片標本を用いて、電気生理学的・光学的記録法により海馬錐体細胞の膜電位変化と樹状突起内カルシウム濃度変化を同時に測定した。その結果、活動電位によって誘発されるカルシウム濃度の上昇は生後2, 3週目にかけて顕著に増大することが明らかとなった。大脳皮質第 II/III 層および第 V 層錐体細胞についても同様の生後発達の過程をたどることがわかった。さらに、その機序として、カルシウム電流密度と細胞内カルシウム濃度の同時測定により、電位依存性カルシウムチャンネルの密度増加が主な要因であることが示された。このような樹状突起内カルシウム動態の生後発達は、長期増強やバースト状発火の発達過程と密接に関連していることが明らかとなった。

以上のように、大脳皮質（海馬、新皮質浅層・深層）において活動電位により誘発される樹状突起内カルシウム動態の生後発達は中枢神経系の機能的発達に重要な役割を担っていることが示唆された。本研究は脳の機能的発達や記憶、学習の機構の解明に貢献し、生理学や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 12 月 1 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。