

博士論文

論文題目 思春期における海馬部位特異的な
興奮性シナプス可塑性の相違に関する研究

氏名 長谷川 祐人

目次

要旨	3
序文	4
方法	9
結果	20
考察	31
謝辞	43
引用文献	44
レジェンド	57
図表	66

要旨

近年の研究により、海馬の機能は全体を通じて一様ではなく、背側は主に記憶や学習に関与し、腹側は感情の調節に関連していることが示唆されている。しかし、それに関するシナプスレベルでの知見は乏しいため、本研究では、マウスの海馬部位特異的なシナプス可塑性を、発達にも着目しながら、電気生理学的、生化学的に検討した。その結果、シナプス可塑性の長期増強（Long-term potentiation: LTP）が、マウスにおいて思春期とされる週齢の腹側海馬でのみ、ほとんど誘導できないが、ドーパミン2型受容体を阻害することで誘導できた。このことから、背側、腹側海馬におけるシナプス可塑性が思春期特異的に制御され、それに D_2R が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

序文

学習や記憶形成において重要な役割を果たす海馬は、左右両側の脳半球内側縁に位置している。齧歯類の海馬は細長い形状で、長軸方向は脳の背側（dorsal）から腹側（ventral）にかけて側頭葉へと伸び、コの字型に間脳を巻き込むようにして湾曲している。海馬内では、嗅内皮質から貫通線維を介して海馬歯状回の顆粒細胞へ、苔状線維を介して CA3 領域錐体細胞へ、さらにシャッファー側枝を介して CA1 領域錐体細胞へとシグナルが伝播していき、その様式は dorsal と ventral で共通している。しかし、嗅内皮質から海馬への入力には、dorsal と ventral の間で違いがあるといわれ（Amaral and Witter 1989）、嗅内皮質の外側領域からの入力は歯状回の dorsal の半分に入り、中間領域からの入力はそれに隣接した歯状回 ventral1/4 に入り、内側領域からの入力は歯状回 ventral の最も末端の 1/4 に投射している（Ruth et al. 1982）。嗅内皮質の各領域は、それぞれが固有の入力を大脳皮質から受けているため、海馬は dorsal と ventral では異なる情報を処理していることが示唆される（Witter, et al. 1989）。さらに、CA1 領域錐体細胞からの投射先も dorsal と ventral で異なっている。dorsal 海馬 CA1 領域錐体細胞の軸索は前頭前皮質や膨大後部皮質へ投射し、ventral 海馬 CA1 領域錐体細胞は視床下部腹内側核や扁桃体へ投射している（Naber and Witter. 1998、

Fanselow and Dong. 2010、Segal, et al. 2010)。それに加えて、海馬歯状回、CA3 領域、CA1 領域のいずれにおいても dorsal と ventral の間で発現している遺伝子に差があることも最近報告されている (Lein, et al. 2006、Leonardo, et al. 2006、Thompson, et al. 2008、Fanselow and Dong. 2010)。これらの知見から、dorsal と ventral 海馬は異なった機能を有している可能性が示唆されるが、実際、海馬破壊実験により、それが支持されている。Moser ら (1995) は、成体ラットの dorsal 海馬あるいは ventral 海馬を選択的に損傷させ、モリス水迷路テストを行い、空間学習能力がどのように変化するかを観察した。ventral 海馬が選択的に破壊されたラットでは、水中に隠れたプラットフォームを見つけるまでの探索時間に対照のラットとの間で有意な差は見られなかったが、dorsal 海馬が選択的に破壊されたラットでは探索時間が著しく長くなった。これらの結果から、dorsal 海馬のみが空間記憶学習に寄与しているものと考えられる。一方、Kjelstrup (2002) は、同様に処理された成体ラットを用いて、高架式十字迷路テストにより不安様行動の変化を観察した。このテストは、ラットやマウスが高所を嫌うことを利用し、壁のあるアーム、あるいは、壁のないアームに滞在する時間を計測することで不安様行動を評価するものである。この研究では、dorsal 海馬のみを破壊したラットは対照のラットと同様の行動を示したが、ventral 海馬を選択的に損傷させたラットは、対照のラットに比べ、壁のないアームにより長時間滞在

するようになった。この結果は、**ventral** 海馬が不安様行動などの情動に密接に関与することを示唆している。したがって、海馬はこれまで認知機能や空間学習に関与すると考えられていたが、それを担うのはおもに海馬の **dorsal** であり、**ventral** はむしろ不安などの情動の調節に関与しているものと推察される。

海馬における主要な興奮性伝達物質はグルタミン酸であるが、それとともに学習や記憶、認知機能などの高次脳機能の調節に関与していると考えられている神経調整物質のひとつに、ドーパミンがある。海馬では、アデニル酸シクラーゼを活性化する **D₁** 型ドーパミン受容体 (**D₁R**) と、それを抑制する **D₂** 型ドーパミン受容体 (**D₂R**) (Jackson and Danielsson 1994) が発現している。学習におけるドーパミンの役割はドーパミン受容体を薬理的に処理することで詳細な検討がなされている。**D₁R** と **D₂R** に対する作動薬を海馬に注入すると、モリス水迷路テストや八方迷路学習テストで空間学習能力が向上することが報告されている (Packard and White 1991)。また、海馬のドーパミンニューロン活動の異常が精神疾患を引き起こす可能性が示唆されており、統合失調症における陽性症状（妄想、幻覚、幻聴）に **D₂R** 活性が関与し、一方、陰性症状（自閉、意識の欠如）に **D₁R** の抑制が関与することが報告されていることから、これらの受容体が精神疾患に対する治療薬のターゲットとなっている (Suh J et al. 2013)。以上から、海馬が関わる認知機能や空間学習、そして不安や情動の調節に、ド

ドーパミンが関与していると推察されるが、海馬部位特異的なドーパミンの作用に関する研究はほとんど行われていない。

一方、生物が常に変化する外界の環境に適応して生きていくためには、脳が外界からの刺激を経験として記憶し、それに対応して神経回路網での情報処理機能を柔軟に変化させる必要がある。そのとき、神経回路網の構成単位であるニューロン間をつなぐシナプスにおいては、刺激に応じて経験依存的に可塑的な変化が起こっているものと考えられる。上記のような実験結果を考慮すると、ここでも海馬の **dorsal** と **ventral** の間で機能が異なり、環境の変化に対してそれぞれが異なった応答をする可能性があり、それに関与するシナプスの特性に差があると想定されるが、それに関するシナプスレベルでの知見は乏しい。

さらに、本研究では「思春期」にも着目した。この時期には、生殖機能が成熟するなど、身体的に大きな変化が生じるとともに、神経機能にも複雑な変化が起こることが知られている。また、ヒトでは大脳辺縁系や前頭前皮質が思春期に劇的に発達し (Davey, et al. 2008)、前頭前皮質ではこの時期にドーパミン量が増加することが報告されている (Kalsbeek et al. 1988)。行動においては、好奇心が旺盛になったり、行動の抑制が効かなかったりするなど精神的に不安定な状態となることや、統合失調症などの情動異常を示す精神疾患の多くが「思春期」に発症することが報告されている (Paus, et al. 2008)。これに関連して、

新生児期に ventral 海馬を部分的に損傷させたラットが統合失調症様の症状を示すという報告 (Lipska and Weinberger 2002) があることから、思春期において、特に ventral 海馬でのシナプス特性が、精神的に不安定な行動や、情動の調節に異常をきたす精神疾患の発症に何らかの影響を及ぼし、それにドーパミンが影響を及ぼしている可能性が考えられる。

以上のような背景から、本研究では、マウスにおいて思春期と考えられる週齢とそれ以前、およびそれ以降の週齢で、海馬部位特異的にシナプス伝達や可塑性がどのように変化するか、さらにその変化にドーパミン受容体が関与しているかについて、dorsal および ventral 海馬スライスを用いて電気生理学的、および生化学的に検討した。

方法

実験動物

生後 21 日目 (PD 21) の C57BL/6J 雄マウスを日本クレア (株) より購入し、思春期前 (PD 22-29)、思春期 (PD 35-40)、思春期後 (PD 77-98) のマウスを実験に使用した。動物の取り扱いは東京大学の動物実験に関するガイドラインに従い、動物実験の 3R (Replacement, Reduction, Refinement) に配慮して適切に行った。また、全ての実験は動物実験委員会の承認を得ている。

電気生理学実験

標本作製

各週齢のマウスをフローセン (武田薬品工業株式会社) で充満させたデシケーターに入れて深く麻酔し、すばやく断頭した。解剖バサミで頭蓋骨を切り開き、スパーテルを脳の嗅球側から脳底部に差し込み、すくい上げるように脳を取り出した。小脳部分をメスで切り落としてから、残りの脳を半切して 95 % O₂, 5 % CO₂ 混合ガスで飽和させた氷冷リンゲル液 (組成 : 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 26.2 mM NaHCO₃, 11 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgSO₄) に 2-3 分間浸した。スパーテルを使ってひとつの半球から海馬を摘出し、

再び氷冷リンゲル液に浸した。引き続いて、もう一方の半球からも同様に海馬を取り出した。取り出した海馬を十分に氷冷してから、10%寒天ブロック上に長軸方向が平行になるように縦方向に並べた。dorsal 側のスライス標本を作製する際は dorsal 側が上になるように置き、ventral 側の先端をブロックごと切断した。マイクロスライサー (LEICA VT1200S、LEICA 社) の台に少量の瞬間接着剤を塗布し、海馬およびブロックの切断面を台に張り付けた。ventral 側のスライスを作る際は、dorsal 側の場合と逆の操作を行った。台に氷冷リンゲル液を満たし、海馬の先端を長軸に垂直な面で少し切断した後、その位置から厚さ 400 μ m の海馬スライスを左右 5 枚ずつ作製したが、始めに切断されたスライスは廃棄し、残りの各 4 枚のスライスを実験に使用した (Figure 1b)。事前にリンゲル液を満たし、95% O₂, 5 % CO₂ を充満させ、酸素濃度と湿度が保たれた状態のチェンバーに、リンゲル液を満たしたその上からろ紙を張り付けたシャーレを置き、そのろ紙の上に、作製した海馬スライスを乗せ、室温で少なくとも 1 時間以上静置し、スライス作製により生じるダメージから回復させた。

細胞外電位記録法

95 % O₂, 5 % CO₂ 混合ガスで飽和させたリンゲル液が常に灌流されている (流速 : 約 1.5 - 2.0 ml / min ; 25 \pm 0.3 °C) 記録用チェンバーに海馬スライスを移

し、コの字型白金グリッドに張ったナイロン繊維で、スライスを静かにチャンバー底に固定した。シナプス応答を誘発するための刺激電極として、双極タングステン電極（Microelectrode, Tungsten, 2-5 M Ω , FHC 社）を用い、3 M NaCl 水溶液を充填したガラス管電極（フィラメント入りキャピラリーガラス, GC-150F, Harvard Apparatus 社）を記録電極として使用した。実体顕微鏡下で、刺激電極を CA1 領域の放射状層内に刺入し、記録電極を刺激電極から約 1.2 mm の距離をあけて同じく放射上層内に刺入した（Figure 1a）。シャッフアー側枝を 0.1 Hz の頻度で刺激し、細胞外シナプス電位記録法によりフィールド興奮性シナプス後電位（field excitatory postsynaptic potential: fEPSP）を記録した。刺激強度は、AMPA 受容体を介した fEPSP の最大スロープ値が 0.10 - 0.15 mV/ms になるように調節した。シグナルは、MultiClamp 700B アンプ（Molecular Devices）で増幅し、digitizer（Molecular Devices: DIGIDATA 1322A）により 10 kHz のサンプリング頻度でデジタル化して、オンラインで解析するとともに（Clampex: Molecular Devices）、コンピューターに記録し、実験後にオフラインで詳しく解析した。

シナプス応答の入出力関係（input-output relationship）の解析

シナプス応答の入出力関係を検討する実験では、NMDA 受容体の阻害薬である D-AP5（25 μ M : Tocris Bioscience）を灌流液に加えることによりシナプス後

細胞での可塑的な変化を抑制するとともに、non-NMDA 受容体の阻害薬である CNQX (1 μ M : Tocris Bioscience) を加えることにより、fEPSP に対して fiber volley が相対的により大きくなるようにして、入出力関係をより正確に記録できるようにした。60 分間記録し、反応が安定した状態になったことを確認した後、刺激強度を一定の間隔で上げていき、それぞれの刺激強度で 2 分間ずつ記録した。各刺激強度で記録した 10 トレースの波形を平均して fiber volley の振幅(mV)と fEPSP の傾き(mV/ms)を計測し、その関係をプロットした。

2 発刺激促進 (paired-pulse facilitation : PPF) の解析

30 分間安定したベースラインを記録した後、NMDA 受容体を介した可塑的变化を抑えるために、灌流液に D-AP5 (25 μ M : Tocris Bioscience) を加えてさらに 15 分間ベースラインを記録した。その後、300、200、100、50 ms 間隔の 2 発連続刺激を、それぞれ 3 分 30 秒ずつ与えて PPF を記録した。さらに 5 分間ベースラインを記録し、NMDA 受容体依存性の長期的な可塑的变化が起こっていないことを確認した。

Paired-pulse ratio はそれぞれの間隔で記録した 20 トレースの波形を平均した後、2 発目の fEPSP のスロープ (mV/ms) を 1 発目の fEPSP のスロープで割ることにより算出した。

LTP (Long-term potentiation) の解析

安定したベースラインを 30 分間記録した後、TBS (Theta Burst Stimulation : 100 Hz 4 発を 5 Hz 間隔で 5 回を 1 train とし、その train を 10 回繰り返す) によって LTP を誘導し、TBS 後、シナプス応答をさらに 1 時間記録した。LTP の解析では、ベースライン時における fEPSP の最大初期スロープの値で標準化を行い、fEPSP のスロープ値を 1 分ごとにパーセントで表示した。LTP の大きさは、ベースラインのシナプス応答の平均に対する LTP 誘導後 50 - 60 分のシナプス応答の平均の増強率 (fEPSP slope (% baseline)) として算出し、比較・検討した。

D₂R antagonist である L-741,626 (TOCRIS) を使用した実験では、L-741,626 が DMSO 存在下でないと溶解しないことから、対照実験のリンゲル液にも DMSO 0.1% を加えて灌流させた。安定したベースラインを 30 分間記録した後、50 nM L-741,626 を加えた外液に入れ替えた。L-741,626 がスライスに十分いきわたるまで灌流を続け、安定したベースラインを 30 分間記録した後、TBS によって LTP を誘導した。対照実験群では、DMSO のみを加えたリンゲル液を灌流させ、同様に安定したベースラインを 30 分間記録した後、TBS によって LTP を誘導した。

GABA_A 受容体を介した抑制性入力の影響を検討するため、リンゲル液に GABA_A 受容体阻害薬であるピクロトキシン (100μM : Sigma 社) を加えたが、

この実験では、海馬スライスの CA1 領域-CA3 領域間を、眼科バサミを用いて予め切り離している。これはピクロトキシンを添加すると CA3 領域でてんかん様発火することが多く、それが CA1 領域に伝播することを防止するためである。安定したベースラインを 30 分間記録し、TBS によって LTP を誘導した。

TBS 刺激中の脱分極 (depolarization envelope) の解析

LTP 誘導のための TBS により誘発された脱分極を解析した (Fig 8)。各刺激直後に得られる fEPSP の振幅の最大値を計測し (Fig 8c 赤矢印)、TBS を与える直前のベースライン記録時の fEPSP10 トレースの振幅の平均で標準化した (Fig 8d)。

ホールセルパッチクランプ法 (ブラインド法)

細胞外電位記録と同様に、海馬スライスを記録用チャンバー内に固定する。その際、眼科バサミを用いて予め CA1 領域と CA3 領域とを切り離す。記録電極用内液の組成は 122.5 mM Cs gluconate, 17.5mM CsCl, 10.0 mM HEPES (CsOH), 0.2mM EGTA (Na), 2.0 mM Mg-ATP, 0.3 mM Na₃GTP, 8.0 mM NaCl であり、pH 7.2、浸透圧 290-310 mOsm に調整してある。この記録電極用内液をガラス管電極 (抵抗値 3.0-6.0 M Ω : 中芯入り中空キャピラリーガラス, GC-150, HARVARD

APPARATUS 社) に充填して記録に用いた。パッチ電極に陽圧を加えながら CA1 領域の錐体細胞層に電極先端を近づけると同時に、1 mV の矩形波パルスを連続的に与え、それに対する電流応答をモニターした。パッチ電極が細胞表面に接触すると抵抗値が上がってパルスに応答する電流が減少することから、電流の減少を確認した時点で、電極内につながるチューブより電極内部に軽い陰圧をかけ、電極と細胞膜の間に抵抗の高いシールを形成させた。その後、シールの抵抗値が 1 G Ω を超えたことを確認し、電極内に瞬間的に強い陰圧をかけることによってパッチ下膜を破壊し、ホールセル記録を開始した。細胞膜電位を保持電位-90 mV に固定した。なお、細胞膜電位は液間界面電位を補正した値を記述した。刺激の強度は、AMPA 受容体を介した興奮性シナプス後電流 (evoked excitatory postsynaptic current: eEPSC) の振幅が 200-300 pA になるように調節した。また、記録中は 5 mV の矩形波電圧を与えることによって Series resistance、Input resistance を観察し、Series resistance については 30 M Ω 以上に達した場合にデータを棄却した。また、Series resistance、Input resistance は、記録中にその値が 20%以上変化した場合にもデータを棄却した。

NMDA 受容体興奮性シナプス電流/ AMPA 受容体興奮性シナプス電流比 (N/A ratio) の測定

GABA_A 受容体を介した抑制性入力を遮断するため、この実験では ACSF に 100 μ M のピクロトキシン (Sigma 社) を加えた。保持電位 -90 mV で安定な応答を 10 分間記録した後、灌流液を介して 10 μ M CNQX を添加し、AMPA 受容体由来の eEPSC (AMPA eEPSC) を消失させた。保持電位を +40 mV にし、Mg²⁺ ブロックを解除して NMDA 受容体由来の EPSC (NMDAR eEPSC) を 10 分間記録した。AMPA 受容体による EPSC の振幅の平均で NMDA 受容体による EPSC の振幅の平均を割った値を N/A ratio とした。

10 分間記録した NMDA 受容体による EPSC から、4~7 分の間の 20 トレースを平均した後、最大値の 90% からベースラインに戻るトレースの区間を単一の指数関数で近似することにより、減衰時定数 (decay time constant) を算出した。これらの解析には Clampfit9 のプログラムを用いた。

生化学実験

海馬抽出液の調整

思春期前 (PD 22-29)、思春期 (PD 35-36)、思春期後 (PD 77-80) のマウスより海馬スライスを、ventral 側、dorsal 側それぞれ 1 匹あたり 6 枚作製し、CA1 領域のみを取り出して、3 匹分を 1 サンプルとして -80°C で冷凍保存した。海馬抽出液の調整は渡辺らの方法 (Watanabe et al. 1998) を参考に行った。氷冷した

溶解バッファー (0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 2 mg/ml phenylmethylsulphonylfluoride, 0.1 mg/ml pepstatinA, 1 mg/ml leupeptin, 2 mg/ml aprotinin, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) に海馬 CA1 サンプルを入れ、テフロン・ホモジェナイザーを用いて約 800 rpm、20 ストロークで破碎した。破碎液を 4℃、700 g で 10 分間遠心分離し、上清を回収して、BCA 法によってタンパク質濃度を測定した。

ウェスタンブロット

海馬抽出液のタンパク質濃度を揃え、7.5% SDS ポリアクリルアミドゲルに添加して電気泳動を行った。泳動後、PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) 膜にタンパク質を転写し、0.5% スキムミルク入り TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20) で 1 時間室温にてブロッキングした。ブロッキング後、目的の分子の任意の分子量ごとに膜を切り分け、1 次抗体を 4℃、オーバーナイトで反応させた。1 次抗体反応後、TBST で 10 分間の膜洗浄を 3 回行い、1 次抗体に反応する 2 次抗体で、1 時間室温にて反応させた。反応後、TBST で 10 分間の膜洗浄を 3 回行い、さらに TBS (Tris Buffered Saline) で 5 分間の膜洗浄を 3 回行った。Clarity Western ECL Substrate による化学発光によりシグナルを測定した。EZ-Capture MG (ATTO) で化学発光を撮影し、各バンドの濃さを画像解析ソフト ImageJ

(National Institutes of Health: NIH)を用いて定量した。ventral、dorsal それぞれの思春期後の値を 100%として、思春期前と思春期の値を標準化し、グラフに示した。典型的なバンドの図を Figure 4(a)に示す。

抗体

ウェスタンブロットに用いた抗体および入手先、希釈濃度は以下の通りである。

抗 GluN2A 抗体、抗 GluN2B 抗体 (Frontier Science) 1/300

抗 GluN1 抗体 (Enzolifescience) 1/4000

抗 GluA1 抗体 (Alomone Labs) 1/300

抗 PSD95 抗体 (Frontier Science) 1/1000

抗 D1R 抗体 (Abcam) 1/500

抗 D2R 抗体 (MILLIPORE) 1/500

抗 β III-tubulin 抗体 (Abcam) 1/1000

データの解析

電気生理学実験のデータは、解析ソフト Clampfit 9 (Axon Instrument) を用いてオフラインで解析を行い、数値は平均 \pm 標準誤差で表示した。統計学解析は、思春期前、思春期、思春期後を比較する際は一元配置分散分析 (one-way analysis

of variance, one-way ANOVA) により行い、P 値が有意水準 $\alpha=0.05$ 以下の場合、Bonferroni 法による多重比較検定を行った (Figures 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 and 11)。また、対照実験群と D₂R antagonist 存在下群の 2 群間の有意差を検定する際には Student's *t*-test を用い、有意水準 5% で検定した (Figures 10, 12, 13 and 14)。P<0.05 を*で、p<0.01 を**で、p<0.001 を***とし、Figure に示した。

結果

Dorsal および ventral 海馬における基本的なシナプス伝達特性

dorsal と ventral 海馬での基本的なシナプス伝達の特徴の違いを検討するため、細胞外電位記録法により、海馬 CA1 領域において AMPA 受容体により媒介されるシナプス応答を記録した。CA1 領域への入力であるシャッフアー側枝の電気刺激により発生した活動電位が軸索を伝わりシナプス前末端部に到達すると、グルタミン酸がシナプス間隙に放出される。そのグルタミン酸がシナプス後細胞膜上に存在する AMPA 受容体に結合して活性化することで、シナプス後部に電流が流入してシナプス後細胞の細胞膜内外の電位変化が生じるが、その際の電場の変化により参照電極と記録電極先端の間で電位差が生じ、それが fEPSP として記録される。

マウスの思春期前、思春期、思春期後のそれぞれの週齢におけるシナプス伝達効率を比較するために、それぞれの時期での入出力関係を検討した。細胞外電位記録においては、シナプス前細胞の軸索であるシャッフアー側枝に発生した活動電位の成分 (fiber volley) が入力であり、シナプス後細胞で誘発される fEPSP が出力である。一般的に、fiber volley は fEPSP よりも小さいため、通常の実験条件では両者を正確に測定できないことがある。そこで、入出力関係を検

討する実験に限って、1 μ M CNQX を灌流液に加えて fEPSP を相対的に減少させることにより、fiber volley と fEPSP をより正確に測定できるようにした (Figure 1c)。刺激強度を一定の間隔で上げていき、それぞれの刺激強度で fiber volley の振幅と fEPSP を記録した。fiber volley の振幅を 0.05 mV ずつに区切り、その fiber volley に対する fEPSP の最大スロープ値の平均をプロットとしたところ、ventral および dorsal ともに、思春期前、思春期、思春期後で有意な差はみられなかった。(Figure 2: **ventral** pre-adolescence (n=12), adolescence (n=10), adult (n=12) 全て $p>0.05$; **dorsal** pre-adolescence (n=10), adolescence (n=10), adult (n=12) 全て $p>0.05$)。

次に、マウスの思春期前、思春期、思春期後それぞれの週齢において、2 発刺激により誘導される 2 発刺激促進 (paired-pulse facilitation: PPF) の検討を行った。PPF はシナプス前終末からの神経伝達物質放出確率に依存しているとされ、放出確率が上がると PPF は減少し、逆に放出確率が下がると PPF は増大する (Manabe et al. 1993)。PPF の解析では、NMDA 受容体を介した可塑的变化を抑えるために、灌流液に 25 μ M D-AP5 を加えた。dorsal 側と ventral 側どちらも、発達に伴って、PPF の値は小さくなる傾向が示された (Figure 3: **ventral** 50ms pre-adolescence 1.48 ± 0.19 (n=11), adolescence 1.36 ± 0.13 (n=9), adult 1.16 ± 0.13 (n=11) pre-adolescence vs. adolescence $p>0.05$, pre-adolescence vs. adult $***p<0.001$, adolescence vs. adult $*p<0.05$; 100ms pre-adolescence 1.46 ± 0.19 (n=11), adolescence

1.304 ± 0.10 (n=9), adult 1.24 ± 0.10 (n=11) pre-adolescence vs. adolescence $p > 0.05$,
 pre-adolescence vs. adult $**p < 0.01$, adolescence vs. adult $p > 0.05$; 200ms
 pre-adolescence 1.30 ± 0.13 (n=11), adolescence 1.19 ± 0.08 (n=9), adult 1.14 ± 0.06
 (n=11) pre-adolescence vs. adolescence $p > 0.05$, pre-adolescence vs. adult $**p < 0.01$,
 adolescence vs. adult $p > 0.05$; 300ms pre-adolescence 1.17 ± 0.12 (n=11), adolescence
 1.08 ± 0.07 (n=9), adult 1.03 ± 0.08 (n=11) pre-adolescence vs. adolescence $p > 0.05$,
 pre-adolescence vs. adult $**p < 0.01$, adolescence vs. adult $p > 0.05$; **dorsal** 50ms
 pre-adolescence 1.85 ± 0.12 (n=7), adolescence 1.84 ± 0.16 (n=9), adult 1.66 ± 0.16
 (n=11) pre-adolescence vs. adolescence $p > 0.05$, pre-adolescence vs. adult $*p < 0.05$,
 adolescence vs. adult $p > 0.05$; 100ms pre-adolescence 1.82 ± 0.16 (n=7), adolescence
 1.76 ± 0.13 (n=9), adult 1.59 ± 0.17 (n=11) pre-adolescence vs. adolescence $p > 0.05$,
 pre-adolescence vs. adult $*p < 0.05$, adolescence vs. adult $p > 0.05$; 200ms
 pre-adolescence 1.53 ± 0.09 (n=7), adolescence 1.52 ± 0.12 (n=9), adult 1.41 ± 0.13
 (n=11) 全て $p > 0.05$; 300ms pre-adolescence 1.34 ± 0.11 (n=7), adolescence 1.35 ± 0.05
 (n=9), adult 1.34 ± 0.16 (n=11) 全て $p > 0.05$ 。また、dorsal は ventral に比べて、50
 ms、100 ms、200 ms、300 ms のいずれの間隔においても、週齢に関わらず PPF
 の値が有意に大きかった (Figure 3: pre-adolescence ventral vs. dorsal 全ての間隔
 で $***p < 0.001$, adolescence ventral vs. dorsal 全ての間隔で $***p < 0.01$, adult ventral

vs. dorsal 全ての間隔で*** $p<0.001$)。以上の結果から、ventral は dorsal に比べてグルタミン酸の放出確率が高く、さらに、海馬部位によらず、グルタミン酸放出確率は成長とともに上昇することが示唆された。

思春期前、思春期、思春期後におけるシナプス後細胞における機能分子の発達に伴う発現変化を、postsynaptic density protein 95 (PSD95)と、AMPA 受容体のサブユニットである GluA1 についてウェスタンブロッティング解析により検討した。PSD95 は dorsal で思春期前に比べ思春期後は増加し (Figure 4a: **ventral** pre-adolescence 66.46 ± 21.97 (n=6), adolescence 79.11 ± 6.16 (n=3), adult 100.0 ± 10.33 (n=3) 全て $p>0.05$: **dorsal** pre-adolescence 43.10 ± 14.48 (n=6), adolescence 82.64 ± 5.89 (n=3), adult 100.0 ± 36.02 (n=3) pre-adolescence vs. adolescence $p>0.05$, pre-adolescence vs. adult ** $p<0.01$, adolescence vs. adult $p>0.05$)、GluA1 は ventral で思春期前に比べ思春期後は増加していた (Figure 4b: **ventral** pre-adolescence 76.29 ± 22.21 (n=6), adolescence 84.42 ± 17.65 (n=3), adult 100.0 ± 22.07 (n=3) pre-adolescence vs. adolescence $p>0.05$, pre-adolescence vs. adult ** $p<0.01$, adolescence vs. adult $p>0.05$: **dorsal** pre-adolescence 90.15 ± 30.18 (n=6), adolescence 90.26 ± 33.38 (n=3), adult 100.0 ± 15.94 (n=3) 全て $p>0.05$)。

以上より、ventral および dorsal 海馬ともに、シャッファー側枝と CA1 領域錐体細胞間の興奮性シナプスにおいて、AMPA 受容体により媒介されるシナプ

ス応答に、成長に伴う変化は認められるが、思春期特異的な変化はないことが明らかとなった。

AMPA 受容体と同様に、シナプス伝達に重要なグルタミン酸受容体として NMDA 受容体がある。NMDA 受容体を介したシナプス伝達の発達過程を、ホールセル記録法により NMDA 受容体シナプス電流を測定して検討した。思春期前、思春期、思春期後それぞれの週齢のマウス海馬スライスの CA1 錐体細胞から、AMPA eEPSC と NMDAR eEPSC を記録し、N/A ratio を比較した。その結果、思春期 ventral 海馬の N/A ratio は思春期前に比べて減少していた (Figure 5b: **ventral** pre-adolescence 0.772 ± 0.072 (n=3), adolescence 0.454 ± 0.146 (n=6), adult 0.587 ± 0.149 (n=3) pre-adolescence vs. adolescence $*p < 0.05$, pre-adolescence vs. adult $p > 0.05$, adolescence vs. adult $p > 0.05$)。一方、dorsal では、週齢による N/A ratio の変化は見られなかった (Figure 5b: **dorsal** pre-adolescence 0.435 ± 0.066 (n=3), adolescence 0.408 ± 0.176 (n=6), adult 0.427 ± 0.243 (n=4) 全て $p > 0.05$)。AMPA 受容体のシナプス応答の input-output relationship では有意な差が見られなかったため、思春期 ventral 海馬での N/A ratio の減少は、NMDA 受容体シナプス応答が、思春期 ventral 海馬で減少していることによるものだと考えられた。

NMDA 受容体シナプス応答の減弱を起こす原因として、NMDA 受容体におけるサブユニット構成の影響が考えられた。NMDA 受容体のサブユニットであ

る GluN2A と GluN2B は発生初期以降その発現量が変化し、サブユニット構成によって受容体チャネルの開口時間が異なることが知られている (Errger et al. 2005)。そこで、思春期前、思春期、思春期後における NMDA 受容体シナプス応答の kinetics を ventral と dorsal で検討した。減衰時定数は、ventral では週齢による変化はみられなかったが (Figure 5c: **ventral** pre-adolescence 137.8 ± 14.45 (n=3), adolescence 128.5 ± 25.85 (n=6), adult 127.1 ± 22.44 (n=3) 全て $p > 0.05$)、dorsal は成長に伴い減少する傾向が示された (Figure 5c: **dorsal** pre-adolescence 155.4 ± 50.95 (n=3), adolescence 146.0 ± 51.34 (n=6), adult 102.0 ± 18.96 (n=4) 全て $p > 0.05$) が有意差はなかった。

さらに、NMDA 受容体サブユニットのタンパク質レベルでの発現量変化を調べるため、ウェスタンブロット解析を行った。NMDA 受容体の各種サブユニットについて、思春期前、思春期、思春期後で発現量を比較したところ、GluN2A は、ventral で思春期前に比べ思春期後は増加し (Figure 6a: **ventral** pre-adolescence 71.36 ± 43.19 (n=18), adolescence 77.46 ± 23.79 (n=18), adult 100.0 ± 29.5 (n=18) pre-adolescence vs. adolescence $p > 0.05$, pre-adolescence vs. adult $*p < 0.05$, adolescence vs. adult $p > 0.05$: **dorsal** pre-adolescence 97.04 ± 31.26 (n=12), adolescence 117.2 ± 43.34 (n=12), adult 100.0 ± 47.66 (n=12) 全て $p > 0.05$)、GluN2B は dorsal で思春期前に比べ思春期後は減少していた (Figure 6b: **ventral**

pre-adolescence 85.86 ± 47.97 (n=18), adolescence 78.89 ± 19.14 (n=18), adult 100.0 ± 19.86 (n=18) 全て $p > 0.05$: **dorsal** pre-adolescence 190.8 ± 99.8 (n=12), adolescence 146.2 ± 55.19 (n=12), adult 100.0 ± 37.13 (n=12) pre-adolescence vs. adolescence $p > 0.05$, pre-adolescence vs. adult $**p < 0.01$, adolescence vs. adult $p > 0.05$)。GluN1 は ventral で思春期前、思春期に比べ思春期後は増加していたが (Figure 6c: **ventral** pre-adolescence 55.67 ± 28.78 (n=18), adolescence 70.04 ± 19.80 (n=18), adult 100.0 ± 20.89 (n=18) pre-adolescence vs. adolescence $p > 0.05$, pre-adolescence vs. adult $***p < 0.001$, adolescence vs. adult $**p < 0.01$: **dorsal** pre-adolescence 95.47 ± 56.31 (n=12), adolescence 81.76 ± 35.18 (n=12), adult 100.0 ± 30.32 (n=12) 全て $p > 0.05$)、NMDA 受容体の発現量に思春期特異的な変化は検出できなかった。

以上より、NMDA 受容体を介するシナプス伝達は発達過程において、思春期海馬 ventral 特異的に減少している可能性が考えられた。

LTP の発達に伴う変化

思春期海馬 ventral で NMDA 受容体シナプス応答の減弱が観察されたことから、シナプス長期可塑性の一つである長期増強 (Long-term potentiation : LTP) にも発達に伴う変化が生じる可能性が考えられたため、それを検討した。30 分間安定したベースラインを記録した後、in vivo の海馬で見られる 5~10 Hz のシ

一タ波 (Ranck JB Jr. 1973) を模した TBS によって LTP を誘導した。TBS 後から 50 - 60 分における fEPSP の増強率で比較したところ、ventral では思春期のみ増強率が低く、その他の週齢と比較した際に有意な差が認められた (Figure 7a: ventral pre-adolescence 123.9 ± 12.11 (n=21), adolescence 109.5 ± 13.75 (n=17), adult 127.6 ± 12.0 (n=21) pre-adolescence vs. adolescence $**p < 0.01$, pre-adolescence vs. adult $p > 0.05$, adolescence vs. adult $*p < 0.05$)。一方、dorsal では、いずれの週齢においても同程度の増強が起こり、有意な差は認められなかった (Figure 7a: dorsal pre-adolescence 138.8 ± 16.65 (n=16), adolescence 139.8 ± 17.97 (n=23), adult 143.5 ± 13.3 (n=19) 全て $p > 0.05$)。以上から、ventral では、思春期特異的に LTP が減弱することが示された。

さらに、ventral と dorsal 海馬の間で、TBS 時の脱分極 (Depolarization envelope) の程度を比較した (Figure 8)。TBS 1train 目の最後である 20 発目の刺激による fEPSP の振幅の最大値を、TBS 直前のベースライン記録時の 10 トレースを平均した fEPSP の振幅で標準化し、比較したところ、ventral では思春期に、他の週齢と比べて脱分極が小さいことが確認された (Figure 9: ventral pre-adolescence 202.7 ± 69.8 (n=21), adolescence 138.6 ± 39.1 (n=17), adult 188.6 ± 51.7 (n=21) pre-adolescence vs. adolescence $**p < 0.01$, pre-adolescence vs. adult $p > 0.05$, adolescence vs. adult $*p < 0.05$)。一方、dorsal では、脱分極は週齢間で差がみられ

なかった (Figure 9: **dorsal** pre-adolescence 267.8 ± 121.6 (n=16), adolescence 260.82 ± 135 (n=23), adult 305.6 ± 167.3 (n=19) 全て $p > 0.05$)。以上の結果から、思春期 ventral 海馬でのみ、TBS に対する脱分極が減弱していることが明らかとなった。

思春期 ventral 海馬で LTP が減弱した原因として、抑制性シナプスによる抑制が亢進し、TBS による脱分極が減弱した可能性が考えられた。そこで、GABA_A 受容体の阻害薬であるピクロトキシン ($100\mu\text{M}$) 存在下で、思春期 ventral 海馬で LTP を誘導した。その結果、ピクロトキシン存在下でも、思春期 ventral 海馬では LTP が誘導できず (Figure 10a: PTX+ 117.6 ± 6.346 (n=7), PTX- 114.2 ± 6.152 (n=7) $p=0.709$)、脱分極も小さいままであった (Figure 10c: PTX+ 205.5 ± 21.2 (n=7), PTX- 167.7 ± 16.98 (n=7) $p=0.19$)。以上から、GABA_A 受容体による抑制は、思春期 ventral 海馬 LTP の減弱に関与していないことが示された。

ドーパミン受容体が思春期 ventral 海馬に与える影響

思春期ラット海馬において、D₂R の発現量が最大になり (Casey et al. 2008)、ventral 海馬では D₂R の発現量が多い (Bruinink and Bishoff 1993) という報告があることから、思春期 ventral 海馬の LTP の減弱に、ドーパミン受容体が影響を及ぼす可能性を検討した。

まず、D₁R と D₂R の発現量をウェスタンブロットにより定量し、週齢ごと

に ventral と dorsal で比較・検討した。D₁R は、ventral では成長に伴い増加するが、dorsal では変化がみられなかった (Figure 11a: **ventral** pre-adolescence 49.31 ± 22.18 (n=18), adolescence 81.65 ± 16.97 (n=18), adult 100.0 ± 15.71 (n=18) pre-adolescence vs. adolescence *** $p < 0.01$, pre-adolescence vs. adult *** $p < 0.01$, adolescence vs. adult * $p < 0.05$: **dorsal** pre-adolescence 76.88 ± 33.66 (n=12), adolescence 93.21 ± 28.27 (n=12), adult 100.0 ± 37.42 (n=12) 全て $p > 0.05$)。一方、D₂R は、ventral で思春期のみ一過的に増加したが、dorsal では変化がみられなかった (Figure 11b: **ventral** pre-adolescence 116.6 ± 33.36 (n=18), adolescence 154.2 ± 52.86 (n=18), adult 100.0 ± 23.05 (n=18) pre-adolescence vs. adolescence * $p < 0.05$, pre-adolescence vs. adult $p > 0.05$, adolescence vs. adult *** $p < 0.01$: **dorsal** pre-adolescence 79.82 ± 25.75 (n=12), adolescence 92.12 ± 38.90 (n=12), adult 100.0 ± 44.32 (n=12) 全て $p > 0.05$)。

ウェスタンブロット解析により、D₂R が LTP に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、D₂R の阻害薬である L-741,626 存在下で、LTP を誘導した。ventral 海馬においては、思春期前、および、思春期後のいずれにおいても LTP は阻害薬によって変化しなかったが、思春期では、対照実験群ではこれまでと同様に LTP が誘導できなかったが、阻害薬を加えることによって、有意な LTP が誘導された (Figure 12: **ventral** pre-adolescence; control 129.7 ± 3.965 (n=3),

D₂R antagonist 142.2 ± 14.36 (n=4) p=0.505, adolescence; control 112.6 ± 4.448 (n=7),
D₂R antagonist 144.1 ± 5.350 (n=8) ***p=0.0006, adult; control 144.2 ± 6.218 (n=6),
D₂R antagonist 136.0 ± 6.727 (n=7) p=0.394)。dorsal は、いずれの週齢においても、
阻害薬を加えたことによる LTP の変化はみられなかった (Figure 13: **dorsal**
pre-adolescence; control 133.0 ± 3.749 (n=3), D₂R antagonist 150.3 ± 19.41 (n=3)
p=0.432, adolescence; control 140.6 ± 7.318 (n=5), D₂R antagonist 131.4 ± 4.926 (n=5)
p=0.33, adult; control 154.7 ± 12.4 (n=5), D₂R antagonist 153.8 ± 6.992 (n=4) p=0.951)。

D₂R 阻害薬を加えた際の TBS による脱分極を検討すると、思春期 ventral 海
馬の対照実験群でみられた脱分極の減弱が、阻害薬を加えることで回復するこ
とが示された (Figure 14: **ventral** control 138.2 ± 11.38 (n=7), D₂R antagonist 204.3 ±
21.71 (n=8) *p=0.049)。一方、思春期 dorsal 海馬では、阻害薬による脱分極の変
化は見られなかった (Figure 14: **dorsal** control 226.1 ± 9.296 (n=5), D₂R antagonist
240.3 ± 21.58 (n=5) p=0.564)。

以上から、思春期 ventral 海馬では、D₂R が TBS による脱分極を低下させ、LTP
が誘導されないことが強く示唆された。

考察

ventral および dorsal 海馬におけるシナプス伝達の発達に伴う変化

本研究では、まず海馬の ventral および dorsal 部位におけるシナプス伝達効率の発達過程を調べた。入出力関係の結果では、dorsal と ventral 海馬ともに成長に伴った変化は見られなかったが、シナプス伝達効率を決める要素は、量子理論によれば、シナプス前終末における放出確率、伝達物質放出部位の数、シナプス後細胞における感受性（Kerchner GA and Nicoll RA. 2008）であるため、それぞれについて検討した。

シナプス前終末における放出確率については、2 発刺激促通の結果から、dorsal と ventral 海馬ともに、シナプス前終末からのグルタミン酸の放出確率が成長に伴って増加していることが明らかとなった。しかし、入出力関係には差がなかったことから、他の要素に違いがあるために放出確率の差が相殺されたと推測される。まず、その要素のひとつとして、シナプス後細胞におけるグルタミン酸に対する感受性に差があることが考えられる。その可能性のひとつとして、シナプス後膜に存在する AMPA 受容体数の違いが挙げられる。この点に関しては、ウェスタンブロット解析の結果から、海馬 CA1 領域において dorsal と ventral の AMPA 受容体サブユニットのひとつである GluA1 の違いが考えられ

るが、GluA1 とシナプス後膜タンパク質である PSD95 の発現量が成長に伴って増加あるいは増加傾向を示したものの、今回のウェスタンブロットでは、シナプス膜上での比較はできず、シナプトソーム分画や PSD (postsynaptic density) 分画のウェスタンブロットによりシナプス膜上の AMPA 受容体の発現量を測定する必要がある。AMPA 受容体の感受性が異なるもう一つの可能性として、AMPA 受容体のチャネルコンダクタンスが異なることにより、シナプス後細胞におけるシナプス応答に違いがみられることが挙げられる。微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic current: mEPSC) を記録し、それに non-stationary fluctuation analysis を適用することにより、AMPA 受容体の単一チャネルコンダクタンスおよび 1 つのシナプス小胞から放出されるグルタミン酸により活性化される AMPA 受容体の個数を推定することで、海馬 dorsal および ventral で AMPA 受容体の感受性に差が存在する可能性を検討できると考える。一方、放出確率の違いを相殺するもう一つの要素として、伝達物質放出部位数の違いが挙げられる。一本の軸索に存在するシナプス後細胞とシナプス結合するシナプス前終末の数、もしくはひとつのシナプス前終末内に存在する放出部位の数を検討することが考えられる。成熟した動物の海馬 CA1 領域においては、ひとつのシナプス前終末には、原則的にはひとつの放出部位しか存在しないということが定説となっているが、幼若な動物のシナプスではひとつのシナプスに複

数の放出部位が存在する可能性があり、その違いが関与していることが考えられる。このような点をさらに詳しく解析することにより、dorsal と ventral 海馬におけるシナプス伝達の成長に伴った変化を示す原因が明確になると考えられる。

一方、海馬 CA1 領域におけるシャッフアー側枝から錐体細胞へのシナプス伝達において、TBS のような刺激による強い脱分極が起こった際には、NMDA 受容体が重要な役割を果たすことが知られている。そこで、dorsal および ventral 海馬における NMDA 受容体の発達に伴う変化を検討した。ホールセル記録によって、dorsal および ventral 海馬興奮性シナプスで、NMDA 受容体を介するシナプス電流を解析した結果、N/A ratio は思春期 ventral 海馬で減弱していた。AMPA 受容体シナプス応答の入出力関係は、各時期間で差がみられなかったことから、NMDA 受容体が思春期 ventral 海馬でのみ減弱していると考えられる。この原因として、NMDA 受容体数の減少やサブユニット構成の変化、NMDA 受容体の単一チャネルコンダクタンスの変化が考えられた。まず、受容体の減少の有無を検討するため、ウェスタンブロッティング解析を行って NMDA 受容体の発現量を調べた。その結果、NMDA 受容体を構成するサブユニットである、GluN1、GluN2A、GluN2B の発現量に、思春期 ventral 海馬特異的な変化は検出されな

った。また、NMDA 受容体シナプス応答の減衰時定数を評価することにより、NMDA 受容体のサブユニット構成を間接的に検討したが、いずれの部位、および、時期においても差がみられなかったことから、GluN2A と GluN2B の含有比率には差がないものと思われる。さらに、今回の解析からは、NMDA 受容体の単一チャネルコンダクタンスを評価することはできないが、今後の検討課題としたい。

また、本研究では、ドーパミン受容体の関与についても検討を行った。D₂R の発現を検討するために、ウェスタンブロッティング解析を行ったところ、思春期 ventral 海馬でのみ D₂R が一過的に増加していることが確認された。そのため、D₂R と NMDA 受容体の関連について議論したい。GluN2B サブユニットに関しては、思春期のマウスにおいて、D₂R の活性化によって減少する cAMP 依存的にそのエンドサイトーシスが促進されるという報告があるため (Jia JM et al. 2013)、本研究においても思春期 ventral 海馬で、GluN2B の減少が起こっている可能性が考えられたが、ウェスタンブロッティング解析とホールセル記録の減衰時定数の結果から GluN2B の思春期特異的な変化は否定的であるが、局在に関する情報が得られていないことと、減衰時定数を用いたサブユニット構成の変化を同定する解析の鋭敏性が十分に高いかという懸念もあるため、今回の解析だけでは確定的な結論を得ることはできなかった。GluN2B サブユニットの発現

量に関しては明確な変化が得られなかったが、解析感度の限界という問題はあるものの、cAMP の観点から、ここでもう少し議論しておきたい。D₂R の活性化により、前述のように cAMP の減少による GluN2B サブユニットのエンドサイトーシスが誘導される可能性があるが、NMDA 受容体シナプス応答を記録する際には、その活性化により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇し、それによって Ca²⁺依存性のアデニル酸シクラーゼを活性化することで cAMP が増加すると考えられるが、それにより D₂R の増加による cAMP の減少が相殺された可能性がある。そのために、GluN2B サブユニットの発現量に明確な差が見出されなかった可能性もある。

さらに、NMDA 受容体数やサブユニット構成以外の要因で、NMDA 受容体を介するシナプス電流が減少した可能性を考察したい。Li YC ら (2009) は、ラット前頭前皮質 (prefrontal cortex: PFC) スライスを用いて、medial PFC 第 5 層錐体細胞でホールセル記録を行い、ドーパミンを外溶液中に投与することで NMDA 受容体シナプス応答が減少すると報告し、D₂R のアンタゴニストを加えると、NMDA 受容体のリン酸化を引き起こし、NMDA 受容体シナプス電流が増大することを報告している (Wang and Salter 1994, Leveque et al. 2000, Hattori et al. 2006)。したがって、NMDA 受容体数やサブユニット構成の変化とは関係なく、NMDA 受容体の生化学的な修飾により、NMDA 受容体を介したシナプス伝達が

減弱している可能性も考えられるが、本研究ではそれを積極的に支持するデータは得られていない。一つの可能性として、NMDA 受容体の単一チャネルコンダクタンスが受容体の生化学的修飾により変化することも考えられるため、この点も今後の検討課題としたい。

思春期 ventral 側海馬 LTP

思春期（5 週齢）では、ventral 側海馬での LTP が思春期前、思春期後に比べて減弱していた。本研究では LTP の誘導に TBS を用いたが、TBS により誘導される LTP は NMDA 受容体依存的であることが知られているため（Larson and Lynch, 1988）、思春期 ventral 海馬で観察された NMDA 受容体シナプス応答の減弱は、NMDA 受容体活性化によるシナプス後部での Ca^{2+} 濃度上昇で活性化される CaMKII や PKA、PKC などによる AMPA 受容体のシナプス後部への挿入過程が障害されたことにより引き起こされた可能性も考えられる。しかし、本研究では、これらについては実験的に検討できていないため、今後、詳しく検討する必要がある。

本研究で明らかになった最も重要な結果の一つとして、思春期の ventral 海馬における LTP の障害が D_2R アンタゴニストにより回復したことが挙げられる。LTP の障害回復の原因としては、二つの可能性が考えられる。その一つは、 D_2R

が NMDA 受容体に対して直接作用する可能性である。これに関連して、ラット培養海馬 CA1 ニューロンで D₂R のアゴニストを加えると、G タンパク質を介してチロシンキナーゼ受容体の一つである platelet-derived growth factor (PDGF)受容体が活性化され、それにより、PLC (phospholipase C) が活性化されて細胞内 Ca²⁺が増加し、NMDA 受容体による興奮性シナプス伝達が抑制されるという報告 (Kotecha et al. 2002, Beazely et al. 2006, 2009) がある。このことから、思春期 ventral 海馬では、この発達時期に一過的に増加した D₂R によって細胞内 Ca²⁺が増加するため、恒常的に NMDA 受容体の不活性化 (Lu et al. 1998, 2000) が起こっており、NMDA 受容体を介するシナプス応答が減弱することで、TBS 中の脱分極が減弱するために LTP が誘導されなかった可能性がある。D₂R アンタゴニスト存在下で、ホールセル記録法による NMDA 受容体を介するシナプス電流を測定し、NMDA 受容体と D₂R に直接的な相互作用があるかを検討する必要があるだろう。

一方、思春期 ventral 海馬において、D₂R が直接 NMDA 受容体には関与しておらず、他の経路に作用して間接的に影響を及ぼすことで LTP の減弱を引き起こした可能性も考えられる。D₂R は GABA 作動性の中型有棘 (medium-sized spiny: MS) ニューロンで見られるなど、その多くが GABA 介在ニューロンに発現するという報告 (Gingrich and Caron 1993, Tritsch and Sabatini 2012) があるが、本研

究では GABA_A 受容体が LTP の障害に関与しているという結果は得られなかった。しかし、G タンパク共役型である GABA_B 受容体の関与については検討していない。GABA_B 受容体はシナプス後細胞で G タンパク質共役型内向き整流性カリウムチャネル（GIRK チャネル）に作用することによって K⁺イオンの細胞外への流出を制御する（Mott et al. 1994, Couve et al. 2000）。GABA_B 受容体のアンタゴニストである CGP 投与により LTP が亢進するという報告（Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe 2007）から、D₂R が活性化されることにより GABA_B 受容体を介した抑制の亢進が起こり、思春期 ventral 側海馬における LTP の減弱を導いた可能性が考えられるが、本研究では検討していないため、今後、その可能性を検証する必要がある。

アセチルコリン（ACh）によって活性化される G タンパク共役型受容体であるムスカリン性 ACh 受容体（Caulfield and Birdsall 1998）も、LTP の障害に関与する可能性がある。この受容体は、その阻害薬が健忘を引き起こすことから、記憶の形成に重要と考えられており、さらに、アルツハイマー病や統合失調症の創薬ターゲットとしても考えられている（Blokland 1996, Drever et al. 2011）。海馬は内側中隔野や対角帯垂直脚からコリン作動性神経の投射を受け、その神経終末は海馬上昇層に位置している（Cole and Nicoll, 1984）。海馬上昇層には、腹側被蓋野からのドーパミン神経も投射していることから（Jay TM 2003,

Esmaeili et al. 2012)、D₂R 活性がコリン作動神経に影響を及ぼす可能性が考えられる。海馬上昇層を刺激して海馬内因性の ACh を放出させることで、海馬 CA1 領域における LTP が亢進するという報告 (Shinoe et al. 2005) や、線条体での ACh のマイクロダイアリシスによる解析で、D₂R の活性化により ACh が減少するという報告 (Kurotani et al. 2003) があることから、思春期 ventral 海馬では、D₂R の活性化により、コリン作動性シナプスからの ACh 放出が減少し、LTP の減弱が生じた可能性がある。この点についても、今後の研究課題である。

さらに Rosen ら (2015) は、腹側被蓋野から海馬へ投射するドーパミンニューロンの発火パターンの違いにより、海馬 CA1 ニューロンに対して興奮性あるいは抑制性の作用を及ぼすと報告しており、ドーパミンによる修飾が、海馬シナプスの前終末に影響を及ぼしている可能性も考えられることから、D₂R アンタゴニスト存在下での input-output や PPF を測定することや、ドーパミン投射が海馬シナプスのどこに影響を及ぼしているのか、免疫電子顕微鏡などを用いて詳細に検討することが必要であろう。

思春期 ventral 海馬におけるシナプス可塑性の意義

本研究により、思春期 ventral 側海馬でシナプス可塑性の違いが明らかとなり、その違いは、思春期特異的であることが明らかになった。思春期には性ホ

ルモンの分泌が急激に増加し、異性を探すなどの行動が増えるといわれている (Laviola et al. 2003)。男性ホルモンであるテストステロンは、海馬 CA1 領域での LTP を減弱させるという報告がある (Harley et al. 2000) ことから、思春期 ventral 海馬におけるシナプス可塑性に性ホルモンが関連する可能性も考えられるため、今後の検討が期待される。一方で本研究では「雄」マウスを用いたが、女性ホルモンであるエストロゲンは海馬 CA1 領域での LTP を亢進させるという報告 (Smith and McMahon 2005) がある。さらに Shen ら (2010) は、「雌」マウス海馬 CA1 領域では、思春期には LTP が正常に誘導され、思春期を過ぎると LTP が思春期時より亢進することを報告し、免疫染色と電子顕微鏡による観察により、思春期後は、思春期に比べて GABA_A 受容体が減少していることも明らかにしている。そのため、GABA_A 受容体を介した抑制系シグナル伝達の成長に伴う変化が ventral 側でより顕著に起こり、LTP の亢進を引き起こした可能性が考えられたが、本研究では GABA_A 受容体と LTP の関連は確認できなかった。このことから、雄と雌では思春期に起こる可塑性の変化に違いがあることが示唆され、本研究の成果は、海馬機能の性差の発現機構を明らかにすることに貢献できる可能性がある。

さらに、本研究では、ドーパミンが部位・時期依存的な LTP の調節に関与することが明らかになった。ドーパミン神経はその投射系によって分類される

が、海馬には黒質-線条体経路の A9 系、腹側被蓋野-辺縁系または皮質系経路の A10 系、そして、赤核後核から辺縁系へ投射する A8 系が存在し、海馬の背側から腹側にかけて投射が及ぶことが明らかとなっている (Gasbarri et al. 1994, 1996, 1997)。A9 系では、中脳の黒質に細胞体を置くドーパミンニューロンが、線条体で MS ニューロンを抑制的に制御している。パーキンソン病では、この抑制が阻害され、統合失調症ではドーパミンの分泌が亢進することで D2R が刺激され、視床が興奮し知覚過敏の状態になると考えられている (Brichta and Greengard 2014, Huadong Xu et al. 2015)。A10 系では情動や報酬系にドーパミンを分泌し、統合失調症の陽性症状に関連する中脳辺縁系路と、不安やストレスにより活性化し、陰性症状の発現に関連する中脳皮質経路がある (Oades and Halliday 1987, German and Manaye 1993, Krabbe et al. 2015) が、本研究で確認された思春期 ventral 海馬 LTP の減弱との関連は明らかになっていない。逆行性トレーサーなどを用いて標識することにより、どのドーパミン投射経路が本研究での LTP の調節機構に関与しているかの検討や、自発運動の低下や学習能力の低下がみられる D2R ノックアウトマウス (Tran et al. 2002) を用いて、思春期におけるシナプス可塑性が行動に与える影響などを調べることで、精神神経疾患と本研究の関連性が明らかになることも考えられ、本研究で得られた成果の臨床応用への道も開かれるであろう。

これまで、海馬の機能を dorsal と ventral で区別し、その成長過程による違いを研究した報告はほとんどなく、本研究を足掛かりとして、dorsal および ventral 海馬の機能の相違に関する研究がさらに発展し、海馬が機能的に不均一で、発達時期によって異なる部位特異的な役割が明らかになれば、海馬機能研究にこれまでとは異なる視点を与えることができるであろう。さらに、成長過程での海馬部位特異的な機能変化を引き起こす機構が明らかとなれば、高次脳機能の生後発達の一般的な意義の一端を解明できることが期待される。

さらに、抗精神疾患薬としてドーパミン受容体拮抗薬が現在使用されているため、本研究で思春期における LTP の変化に対するドーパミンの役割が解明できれば、最終的には、思春期に発症することが多い統合失調症などの精神疾患の治療法の改善に直接寄与できる可能性がある。また、思春期における脳機能の調節機構やその破綻の発現機構が明らかにできれば、思春期にみられる精神状態不安定化のメカニズムの解明にも迫れる可能性があり、将来的には教育への応用や、小児の問題行動の理解やそれに対する対処法の開発にもつながり得るものと考えられる。ヒトの成長過程において自我が芽生えと言われる思春期の教育は、その後の人生や、その子供たちが今後支えていく社会にも多大な影響を与えられ、本研究が思春期の重要性を改めて提示するきっかけとなることを期待する。

謝辞

実験の進め方や解析方法など、本研究の全体に亘ってご指導、ご助言をいただいた指導教員の真鍋俊也教授に心より感謝いたします。また、本研究を進めるにあたり、日々の実験指導とご助言をいただいた片桐大之助教、ならびに神経ネットワーク分野の皆さまに深く感謝とお礼を申し上げます。

長谷川祐人

引用文献

Amaral DG and Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. **31**: 571-591. (1989)

Beazely MA, Tong A, Wei WL, Van Tol H, Sidhu B, MacDonald JF. D2-class dopamine receptor inhibition of NMDA currents in prefrontal cortical neurons is platelet-derived growth factor receptor-dependent. *J Neurochem*. **98**: 1657-1663. (2006)

Beazely MA, Lim A, Li H, Trepanier C, Chen X, Sidhu B, MacDonald JF. Platelet-derived growth factor selectively inhibits NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in CA1 hippocampal neurons. *J Biol Chem*. **284**: 8054-8063. (2009)

Blokland A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory ? *Brain Res Rev*. **21**: 285-300. (1996)

Bongsebandhu-phubhakdi S and Manabe T. The neuropeptide nociceptin is a synaptically released endogenous inhibitor of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* **27**: 4850-4858. (2007)

Brichta L and Greengard P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Front Neuroanat.* **152**: 1-16. (2014)

Bruinink A and Nishoff S. Dopamine D2 receptors are unevenly distributed on the rat hippocampus and are modulated differently than in striatum. *Eur J Pharmacol.* **245**: 157-164. (1993)

Casey BJ, Jones RM, Hare TA. The adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci.* **1124**: 111-126. (2008)

Claufield MP and Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. X VII . Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* **50**: 279-290. (1998)

Cole AE and Nicoll RA. Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded in vitro from rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.* **352**: 173-188. (1984)

Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. GABA_B receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci.* **16**: 296-312. (2000)

Davey CG, Yucel M, Allen NB. The emergence of depression in adolescence: development of the prefrontal cortex and the representation of reward. *Neurosci Biobehav Rev.* **32**: 1-19. (2008)

Drever BD, Riedel G, Platt B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res.* **221**: 505-514. (2011)

Erreger K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJ, Traynelis SF. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signaling profiles. *J physiol.* **563**: 345-358. (2005)

Esmaeili MH, Kermani M, Parvishan A, Haghparast A. Role of D1/D2 dopamine receptors in the CA1 region of the rat hippocampus in the rewarding effects of morphine administered into the ventral tegmental area. *Behav Brain Res.* **231**: 111-116. (2012)

Fanselow MS, Dong HW. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron.* **65**: 7-19. (2010)

Gasbarri A, Packard MG, Campana E, Pacitti C. Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Res Bull.* **33**: 445-452. (1994)

Gasbarri A, Packard MG, Sulli A, Pacitti C, Innocenzi R, Perciavalle V. The projections of the retrorubral field A8 to the hippocampal formation in the rat. *Exp Brain Res.* **112**: 244-252. (1996)

Gasbarri A, Sulli A, Packard MG. The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **21**: 1-22. (1997)

German DC and Manaye KF. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol.* **331**: 297-309. (1993)

Gingrich JA and Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci.* **16**: 299-321. (1993)

Harley CW, Malsbury CW, Squires A, Brown RA. Testosterone decrease CA1 plasticity in vivo in gonadectomized male rats. *Hippocampus.* **10**: 693-697. (2000)

Hattori K, Uchino S, Isosaka T, Maekawa M, Iyo M, Saito T, Kohsaka S, Yagi T, Yuasa S. Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. *J Biol Chem.* **281**: 7129-7135. (2006)

Jackson DM and Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* **64(2)**: 291-370. (1994)

Jay TM. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol.* **69**: 375-390. (2003)

Jia JM, Zhao J, Hu Z, Lindberg D, Li Z. Age-dependent regulation of synaptic connections by dopamine D2 receptors. *Nat Neurosci.* **16**: 1627-1636. (2013)

Kalsbeek A, Voorn P, Buijs RM, Pool Cw, Uylings HB. Development of the dopaminergic innervations in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol.* **269**: 58-72. (1988)

Kerchner GA, Nicoll RA. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci.* **9**: 813-825. (2008).

Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(16)**: 10825-10830. (2002).

Kotecha SA, Oak JN, Jackson MF, Perez Y, Orser BA, Van Tol HH, MacDonald JF. A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron.* **35**: 1111-1122. (2002)

Krabbe S. Duda J. Schiemann J. Poetschke C. Schneider G. Kandel ER. Liss B. Roeper J. Simpson EH. Increased dopamine D2 receptor activity in the striatum alters the firing pattern of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**: 1498-1506. (2015)

Kurotani S, Umegaki H, Ishiwata K, Suzuki Y, Iguchi A. The age-associated changes of dopamine-acetylcholine interaction in the striatum. *Exp Gerontol*. **38**: 1009-1013. (2003)

Larson J and Lynch G. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta-rhythm. *Brain Research*. **441**. 111-118. (1988).

Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev*. **27**: 19-31. (2003)

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, et al. Genome-wide atlas of gene expression in adult mouse brain. *Nature*. **445**: 168-176. (2006).

Leonardo ED, Richardson-Jones JW, Sibille E, Kottman A, Hen R. Molecular heterogeneity along the dorsal-ventral axis of the murine hippocampal CA1 field: a microarray analysis of gene expression. *Neuroscience*. **137**: 177-186. (2006).

Leveque JC, Macias W, Rajadhyaksha A, Carlson RR, Barczak A, Kang S, Li XM, Coyle JT, Huganir RL, Heckers S, Konradi C. Intracellular modulation of NMDA receptor function by antipsychotic drugs. *J Neurosci*. **20**: 4011-4020. (2000)

Li YC, Xi D, Roman J, Huang YQ, Gao WJ. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta is required for hyperdopamine and D2 receptor-mediated inhibition of synaptic NMDA receptor function in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci*. **29**: 15551-15563. (2009)

Lipska BK and Weinberger DR. A neurodevelopmental model of schizophrenia: neonatal disconnection of the hippocampus. *Neurotox Res.* **4**: 469-475. (2002)

Lu WY, Xiong ZG, Orser BA, MacDonald JF. Multiple sites of action of neomycin, Mg^{2+} and spermine on the NMDA receptors of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol.* **512**: 29-46. (1998)

Lu WY, Jackson MF, Bai D, Orser BA, MacDonald JF. In CA1 pyramidal neurons of the hippocampus protein kinase C regulates calcium-dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci.* **20**: 4452-4461. (2000)

Manabe T, Wyllie DJ, Perkel DJ, Nicoll RA. Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol.* **70**: 1451-1459. (1993)

Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RGM. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 9697-9701. (1995).

Mott DD and Lewis DV. The pharmacology and function of central GABA_B receptors.
Int Rev Neurobiol. **36**: 97–223. (1994)

Naber PA and Witter MP. Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double – labeling, retrograde – tracing study in the rat. *J Comp Neurol.* **393**: 284-297. (1998).

Oades RD and Halliday GM. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res.* **434**: 117-165. (1987)

Packard MG and White NM. Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behav Neurosci.* **105**. 295-306. (1991)

Paus T, Keshavan M, Giedd JN. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence ? *Nat Rev Neurosci.* **9**: 947-957. (2008)

Ranck JB Jr. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I . Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol.* **41**: 461-531. (1973)

Rosen ZB, Cheung S, Siegelbaum SA. Midbrain dopamine neurons bidirectionally regulate CA3-CA1 synaptic drive. *Nat Neurosci.* **18**: 1763-1771. (2015)

Ruth RE, Collier TJ and Routtenberg A. Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats. I . Medial and intermediate entorhinal projecting cells. *J Comp Neurol.* **209**: 69-78. (1982)

Segal M, Levin GR, Maggio N. Stress-Induced Dynamic Routing of Hippocampal Connectivity: A Hypothesis. *HIPPOCAMPUS.* **20**: 1332-1338. (2010).

Shen H, Sabaliauskas R, Sherpa A, Fenton AA, Stelzer A, Aoki C, Smith SS. A critical role for alpha 4 beta delta GABA_A receptors in shaping learning deficits at puberty in mice. *Science* **327**: 1515-1518. (2010).

Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* **25**: 11194-11200. (2005)

Smith CC and McMahon LL. Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci.* **25**: 7780-7791. (2005)

Suh J, Foster DJ, Davoudi H, Wilson MA, Tonegawa S. Impaired hippocampal ripple-associated replay in a mouse model of schizophrenia. *Neuron.* **80**: 484-493. (2013)

Thompson CL, Pathak SD, Jeromin A, Ng LL, MacPherson CR, Mortrud MT, Cusick A, Riley ZL, Sunkin SM, Bernard A, et al. Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron.* **26**: 1010-1021. (2008).

Tran AH, Tamura R, Uwano T, Kobayashi T, Katsuki M, Matsumoto G, Ono T. Altered accumbens neural response to prediction of reward associated with place in dopamine D2 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 8986-8991. (2002).

Tritsch NX and Sabatini BL. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*. **76**: 33-50. (2012)

Wang YT, Salter MW. Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature*. **369**: 233-235. (1994)

Watanabe M, Fukaya M, Sakimura K, Manabe T, Mishina M, Inoue Y. Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre-recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. *Eur. J. Neurosci*. **10**: 478-487. (1998)

Witter MP, Van Hoesen GW and Amaral DG. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci*. **9**: 216-228. (1989)

Xu H, Zuo P, Wang S, Zhou L, Sun X, Hu M, Liu B, Wu Q, Dou H, Liu B, Zhu F, Teng S, Zhang X, Wang L, Li Q, Jin M, Kang X, Xiong W, Wang C, ZhouZ. Striatal dopamine release in a schizophrenia mouse model measured by electrochemical amperometry in vivo. *Analyst*. **140**: 3840-3845. (2015)

レジエンド

Figure1

海馬スライス標本における電気生理学記録法と、dorsal および ventral 海馬 CA1 領域におけるシャッフアー側枝刺激により誘発されるシナプス応答

- (a) 海馬スライスの断面と電気生理学的記録の模式図。刺激電極を CA1 領域の放射状層内に刺入してシャッフアー側枝を刺激する。記録電極は放射状層内に刺入し、CA1 領域錐体細胞から、細胞外電位記録法によって (c) のようなフィールド興奮性シナプス後電位(field excitatory postsynaptic potential: fEPSP)を記録した。
- (b) 記録に使用した典型的な海馬 ventral および dorsal の厚さ 400 μ m 海馬スライス。
- (c) 1 μ M CNQX を灌流液に加える前（赤線）と添加 60 分後の波形（青線）。矢頭は電気刺激のアーティファクト、矢印は fiber volley を示す。

Figure2

ventral と dorsal 海馬興奮性シナプスでは input-output relationship に発達に伴う変化は見られない

(a) 25 μ M D-AP5、1 μ M CNQX 存在下における、fiber volley の振幅(mV)に対する、fEPSP slope (mV/ms)の値を平均値 \pm SEM の値で示した。

(b) input-output relationship の解析における dorsal 側と ventral 海馬興奮性シナプスでの代表的な波形。波形は、異なる刺激強度で誘発された応答を重ねて表示した。

Figure3

ventral および dorsal のいずれでも発達に伴い PPF が減少する

(a) 25 μ M D-AP5 存在下において、50、100、200、300 ms 間隔で 2 発連続刺激をした際の paired-pulse ratio (2^{nd} EPSP slope / 1^{st} EPSP slope)。データは平均値 \pm SEM の値で示した。

(b) ventral および dorsal 海馬興奮性シナプスにおける PPF の代表的な波形。波形は、 1^{st} EPSP と各刺激間隔によって誘導された 2^{nd} EPSP を重ねて表示した。

Figure4

ウェスタンブロッティングにより解析した ventral と dorsal 海馬での PSD95 および GluA1 のタンパク質発現量は、発達に伴い増加する

(a) ウェスタンブロッティングによって得られた典型的なバンドの図。

(b) 抗 PSD95 抗体でウェスタンブロットを行い、バンドの濃度を測定し、ventral と dorsal 海馬それぞれの adult に対する比を求めグラフ化した。

(青: pre-adolescence, 赤: adolescence, 緑: adult)

(c) 抗 GluA1 抗体でウェスタンブロットを行い、バンドの濃度を測定し、ventral と dorsal 海馬それぞれの adult に対する比を求めグラフ化した。

(青: pre-adolescence, 赤: adolescence, 緑: adult)

n はサンプル数で、ventral 側、dorsal 側それぞれ 1 匹あたり 6 枚のスライスを作製し、CA1 領域のみを取り出して、3 匹分を 1 サンプルとした。

Figure5

NMDA/AMPA 比は思春期 ventral 側海馬で減弱する

(a) ventral および dorsal 海馬における AMPAR eEPSC (黒線) と NMDAR eEPSC (赤線) の代表的な波形。

(b) ventral および dorsal 海馬における N/A ratio の発達に伴う変化。

(c) ventral および dorsal 海馬における NMDAR eEPSC の減衰時定数が発達による変化。

(青: pre-adolescence, 赤: adolescence, 緑: adult)

Figure6

ウェスタンブロッティングにより解析した ventral と dorsal 海馬での GluN2A、GluN2B、GluN1 のタンパク質発現量は、発達に伴い変化する

(a) 抗 GluN2A 抗体でウェスタンブロットを行い、バンドの濃度を測定し、

ventral と dorsal 海馬それぞれの adult に対する比を求めグラフ化した。

(b) 抗 GluN2B 抗体でウェスタンブロットを行い、バンドの濃度を測定し、

ventral と dorsal 海馬それぞれの adult に対する比を求めグラフ化した。

(c) 抗 GluN1 抗体でウェスタンブロットを行い、バンドの濃度を測定し、ventral

と dorsal 海馬それぞれの adult に対する比を求めグラフ化した。

(青: pre-adolescence, 赤: adolescence, 緑: adult)

n はサンプル数で、ventral 側、dorsal 側それぞれ 1 匹あたり 6 枚のスライスを作

製し、CA1 領域のみを取り出して、3 匹分を 1 サンプルとした。

Figure7

思春期では思春期前、思春期後に比べて ventral 側の LTP が減弱している

(a) dorsal および ventral 海馬興奮性シナプスにおける LTP の時間経過。0 分時に

TBS (100 Hz 4 発を 5 Hz で 5 回の train を 10 秒間隔で 10 回) を与え、LTP を

誘導した。

(b) 各週齢の ventral および dorsal 海馬における、TBS 前（青線）と 60 分後の代表的な波形（赤線）。

Figure8

本研究で用いた TBS の刺激パターンと、TBS により誘発された脱分極の解析方法

(a) TBS パターン：100 Hz 4 発を 5 Hz 間隔で 5 回の train を 10 秒ごとに 10 回加えた。

(b) TBS 中の第 1 train における典型的な波形。

(c) (b)の最初 4 発の拡大図。脱分極によるベースラインからの最大振幅を計測（赤矢印）した。

(d) (c)で測定した値を、TBS を与える直前に記録した fEPSP10 トレースの振幅の平均で標準化し、経時変化をプロットした。

Figure9

思春期では思春期前、思春期後に比べて ventral 側で TBS 中の脱分極が減弱している

(a) ventral および dorsal 海馬興奮性シナプスにおいて、TBS における第 1 train で

の脱分極の最大振幅を標準化し、経時変化をプロットした。(青: pre-adolescence, 赤: adolescence, 緑: adult)

(b) TBS 第 1 train の最後である 20 発目における fEPSP の標準化した最大振幅の発達による変化。

Figure10

思春期 ventral 海馬でみられる LTP の減弱に、GABA_A 受容体は関与していない

(a) PTX 存在下と PTX 非存在下での、思春期 ventral 側海馬興奮性シナプスにおける LTP の時間経過。0 分時に TBS を与え、LTP を誘導した。

(b) 各条件における、TBS 前(青線)と TBS から 60 分後の代表的な波形(赤線)。

(c)(a)の際に加えられた TBS における第 1 train での脱分極の最大振幅を標準化し、経時変化をプロットした。

Figure11

ウェスタンブロッティングにより解析した ventral と dorsal 海馬での D₁R のタンパク質発現量は発達に伴い増加し、D₂R のタンパク質発現量は ventral の思春期に増加している。

(a) 抗 D₁R 抗体でウェスタンブロットを行い、バンドの濃度を測定し、ventral 側と dorsal 側海馬それぞれの adult に対する比を求めグラフ化した。

(b) 抗 D₂R 抗体でウェスタンブロットを行い、バンドの濃度を測定し、ventral 側と dorsal 側海馬それぞれの adult に対する比を求めグラフ化した。

(青: pre-adolescence, 赤: adolescence, 緑: adult)

n はサンプル数で、ventral 側、dorsal 側それぞれ 1 匹あたり 6 枚のスライスを作製し、CA1 領域のみを取り出して、3 匹分を 1 サンプルとした。

Figure12

思春期 ventral 海馬において D₂R アンタゴニスト存在下で LTP が誘導される

(a) 左図 ; 思春期前 ventral 海馬興奮性シナプスにおける、LTP の時間経過。0 分時に TBS を与え、LTP を誘導した。(黒: D₂R アンタゴニスト存在下, 青: control)

(b) 左図 ; 思春期 ventral 海馬興奮性シナプスにおける、LTP の時間経過。0 分時に TBS を与え、LTP を誘導した。(黒: D₂R アンタゴニスト存在下, 赤: control)

(c) 左図 ; 思春期後 ventral 海馬興奮性シナプスにおける、LTP の時間経過。0 分時に TBS を与え、LTP を誘導した。(黒: D₂R アンタゴニスト存在下, 緑: control)

全ての右図；各週齢における TBS 前（青線）と TBS から 60 分後の代表的な波形（赤線）。

Figure13

思春期 dorsal 海馬において D_2R アンタゴニスト存在下で LTP に変化はない

(a) 左図；思春期前 dorsal 海馬興奮性シナプスにおける、LTP の時間経過。0 分

時に TBS を与え、LTP を誘導した。（黒: D_2R アンタゴニスト存在下, 青: control)

(b) 左図；思春期 dorsal 海馬興奮性シナプスにおける、LTP の時間経過。0 分

時に TBS を与え、LTP を誘導した。（黒: D_2R アンタゴニスト存在下, 赤: control)

(c) 思春期後 dorsal 海馬興奮性シナプスにおける、LTP の時間経過。0 分時に TBS

を与え、LTP を誘導した。（黒: D_2R アンタゴニスト存在下, 緑: control)

全ての右図；各週齢における TBS 刺激前（青線）と 60 分後の代表的な波形（赤線）。

Figure14

思春期 ventral 側海馬において D_2R アンタゴニスト存在下では脱分極が増加している

- (a) 思春期 ventral および dorsal 海馬興奮性シナプスにおいて、D₂R アンタゴニスト存在下と control で LTP を誘導した際に加えられた TBS における第 1 train での脱分極の最大振幅を標準化し、経時変化をプロットした。(黒: D₂R アンタゴニスト存在下, 赤: control)
- (b) TBS 第 1 train の最後である 20 発目における fEPSP の標準化した最大振幅を、アンタゴニスト存在下と control で比較した。

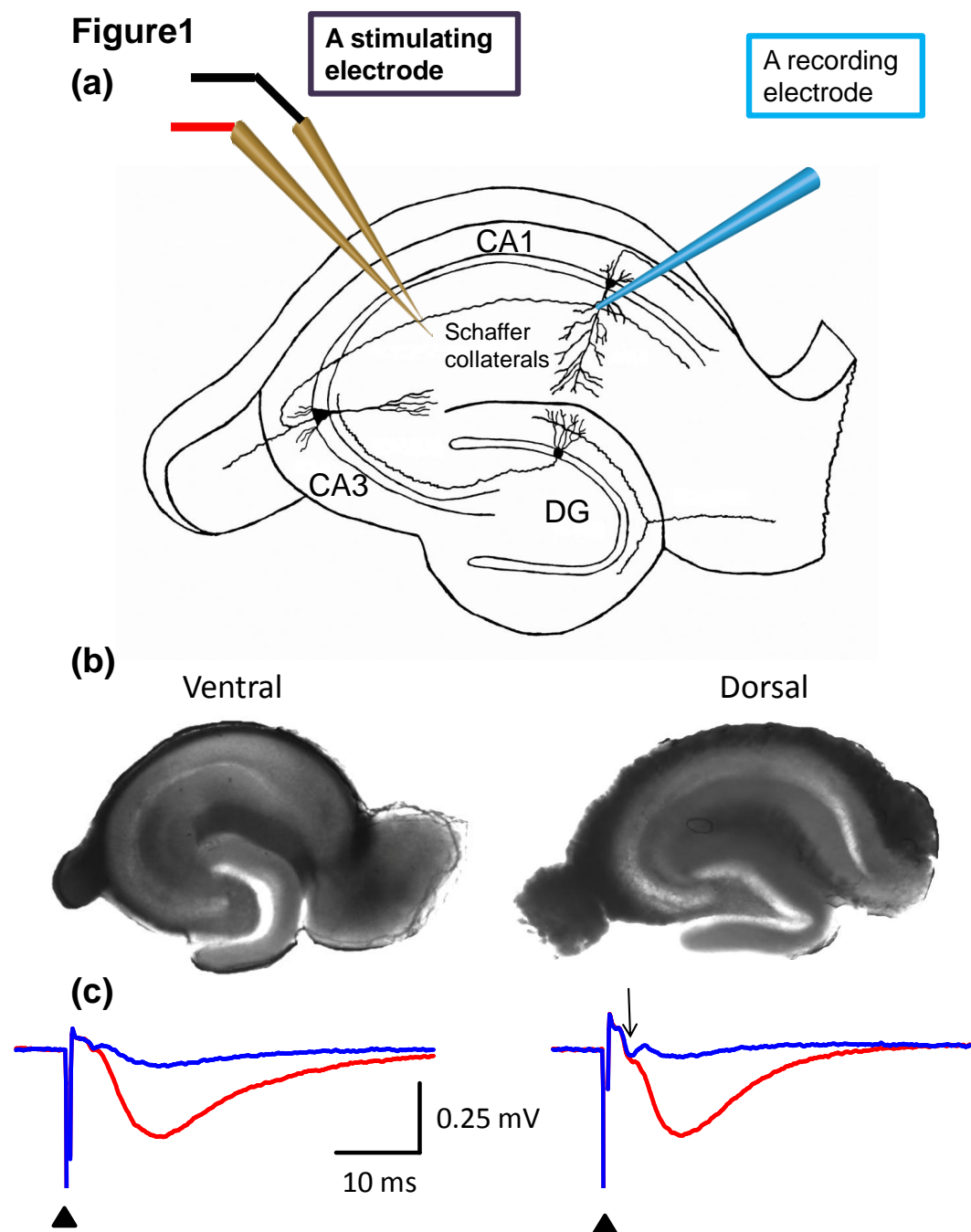
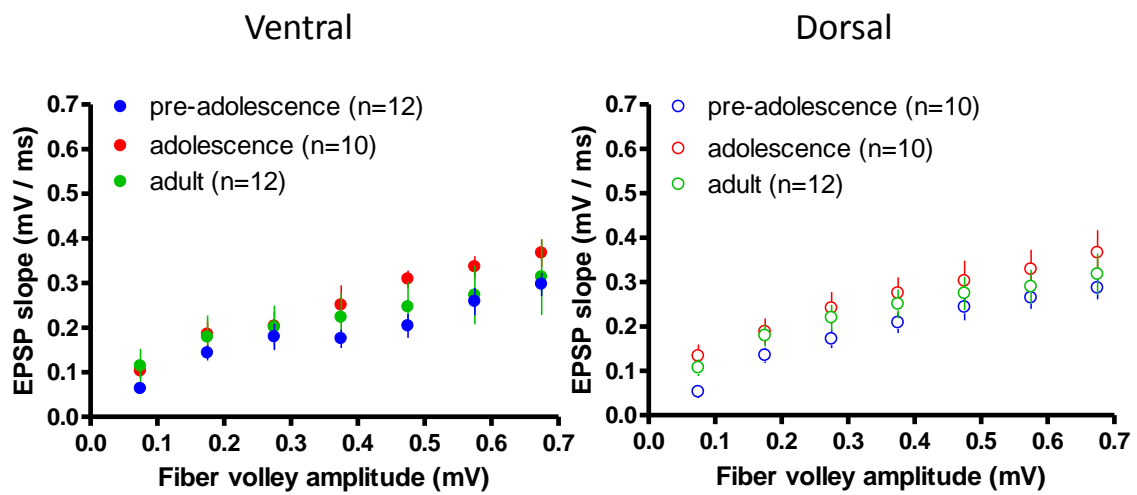


Figure2

(a)



(b)

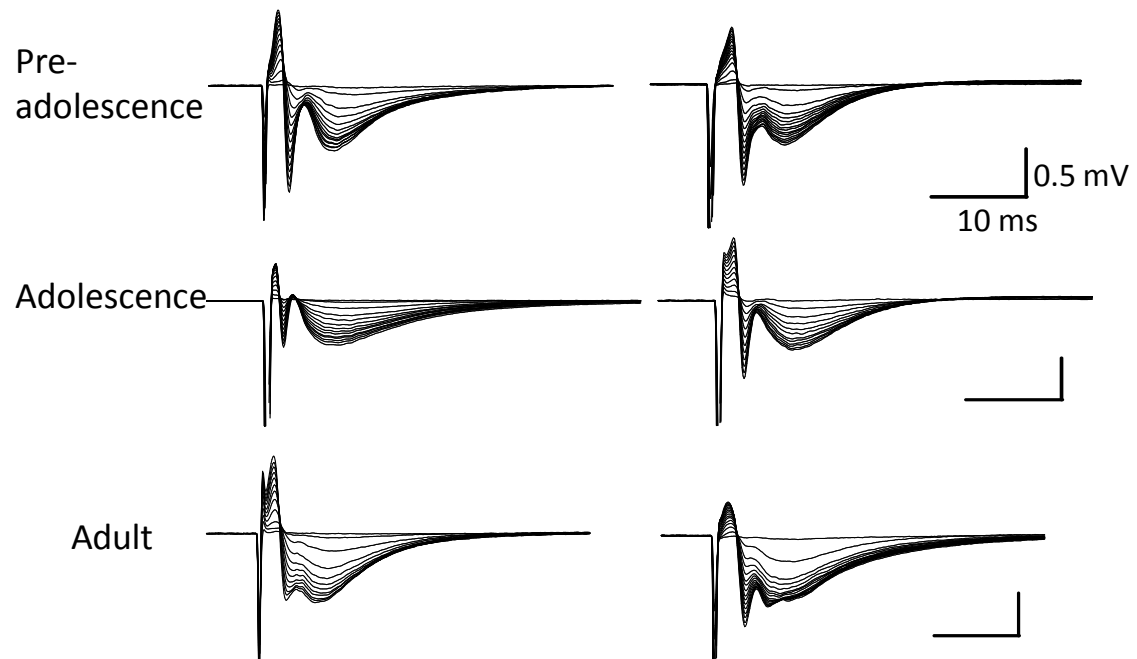
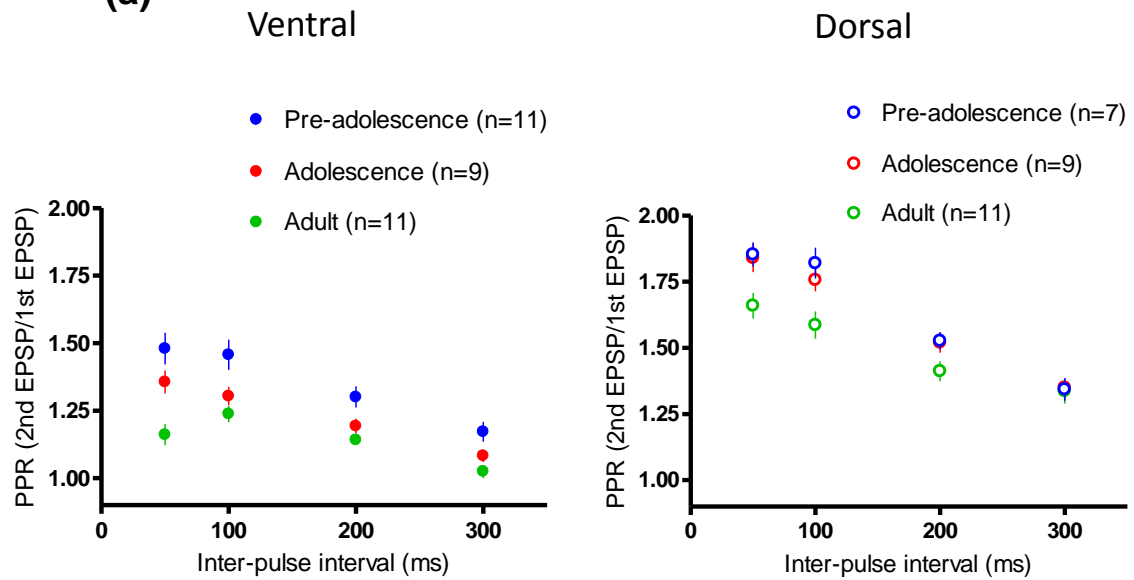


Figure3

(a)



(b)

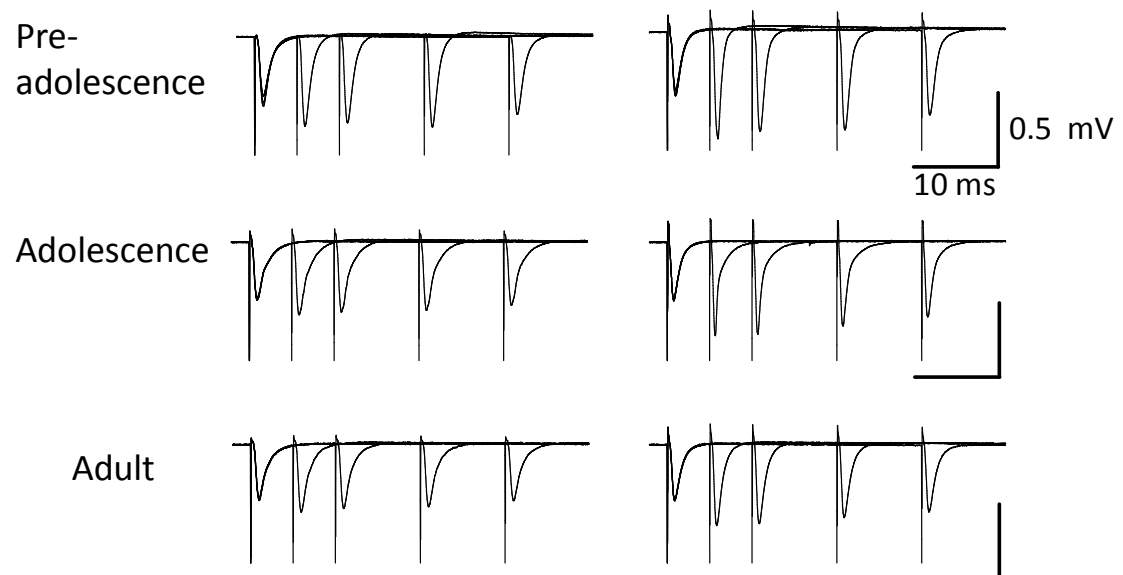


Figure4

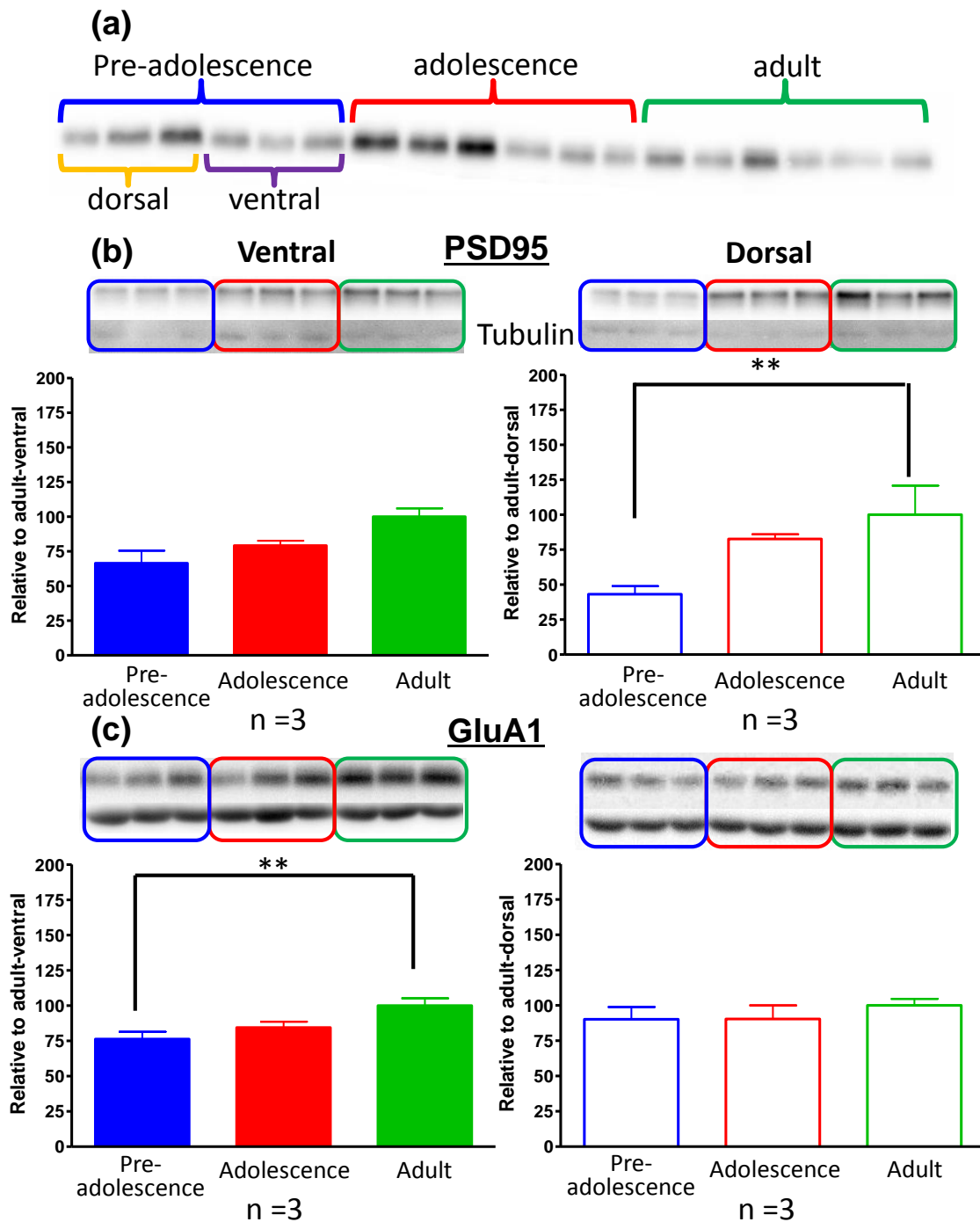
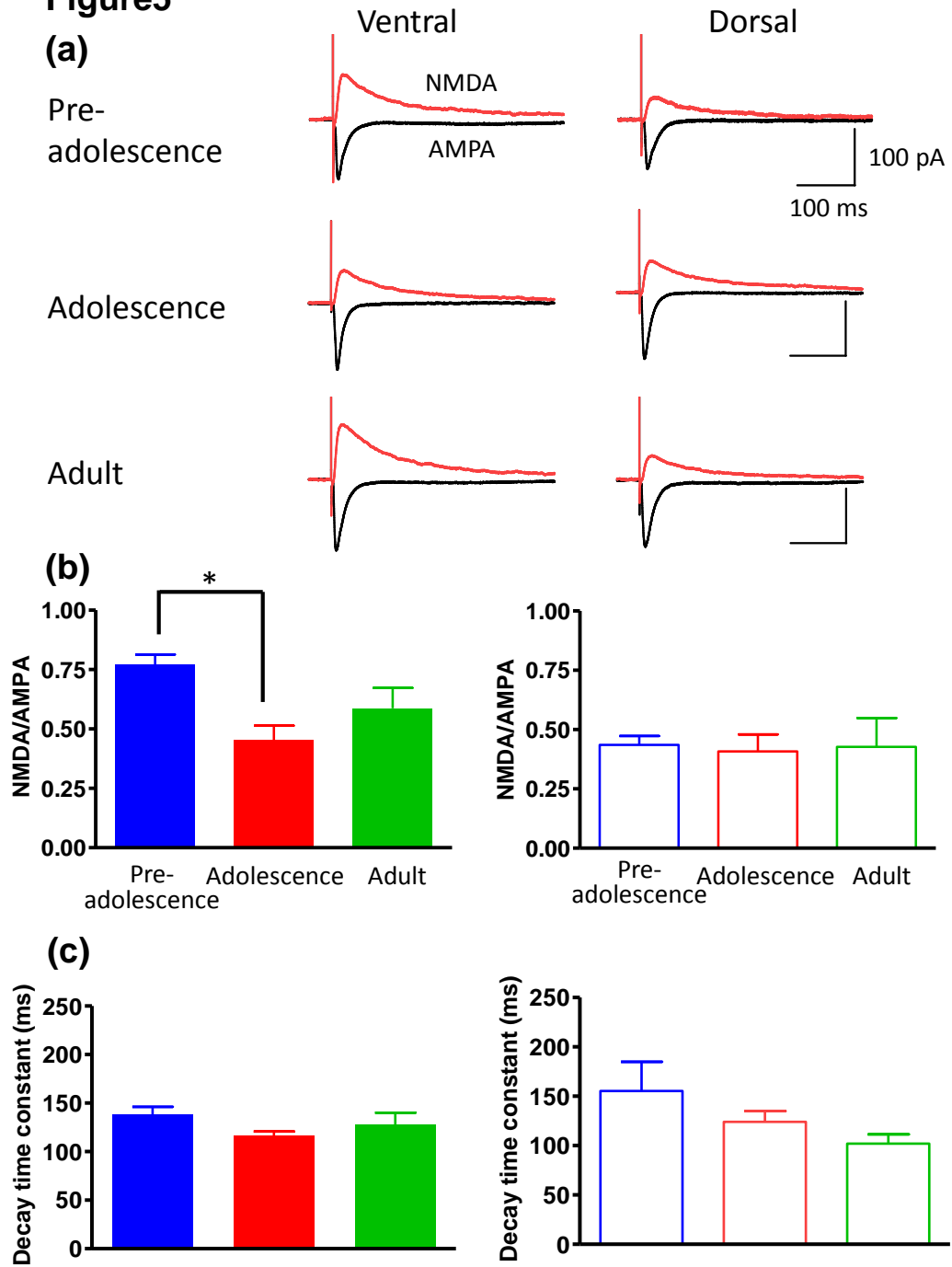


Figure5



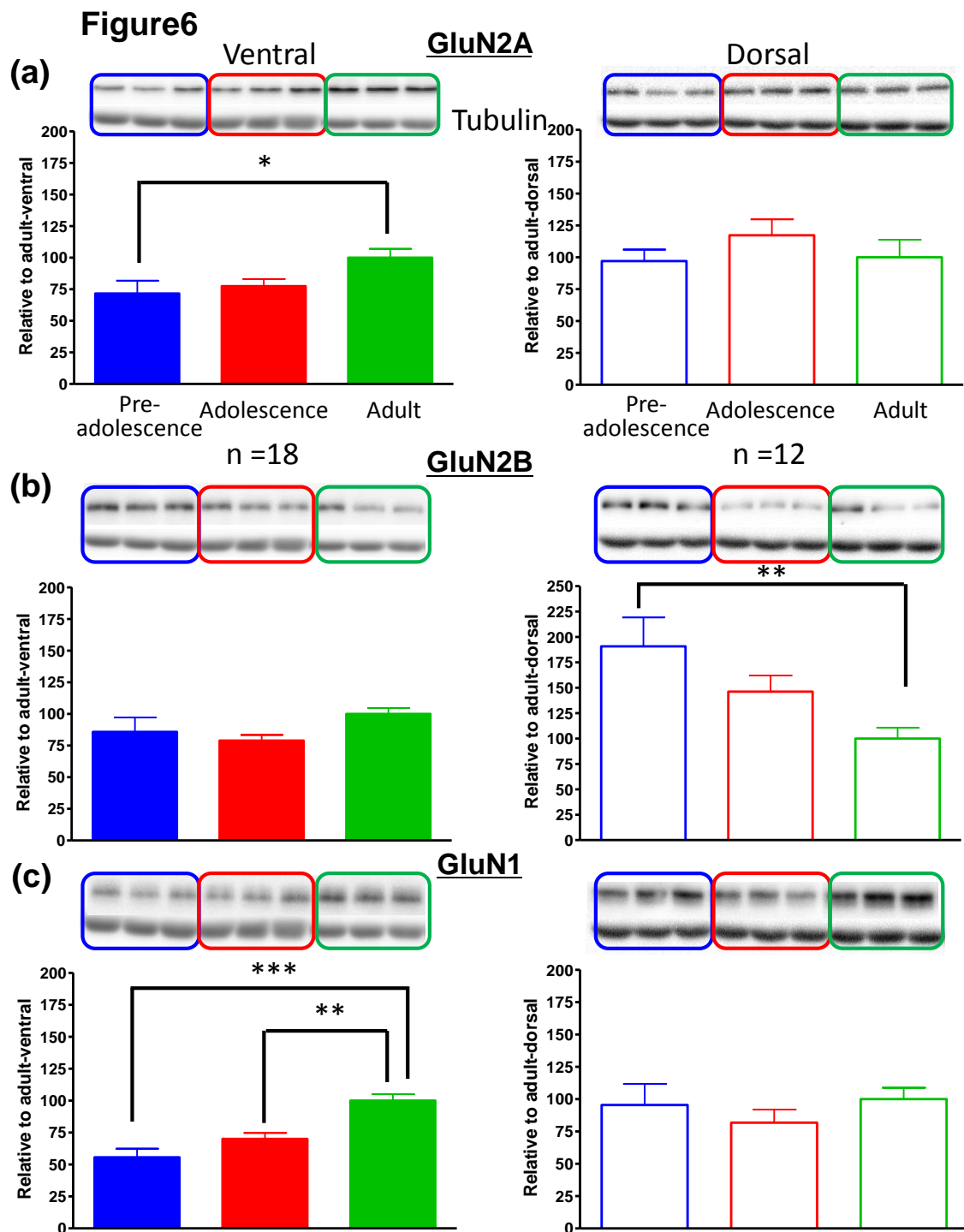
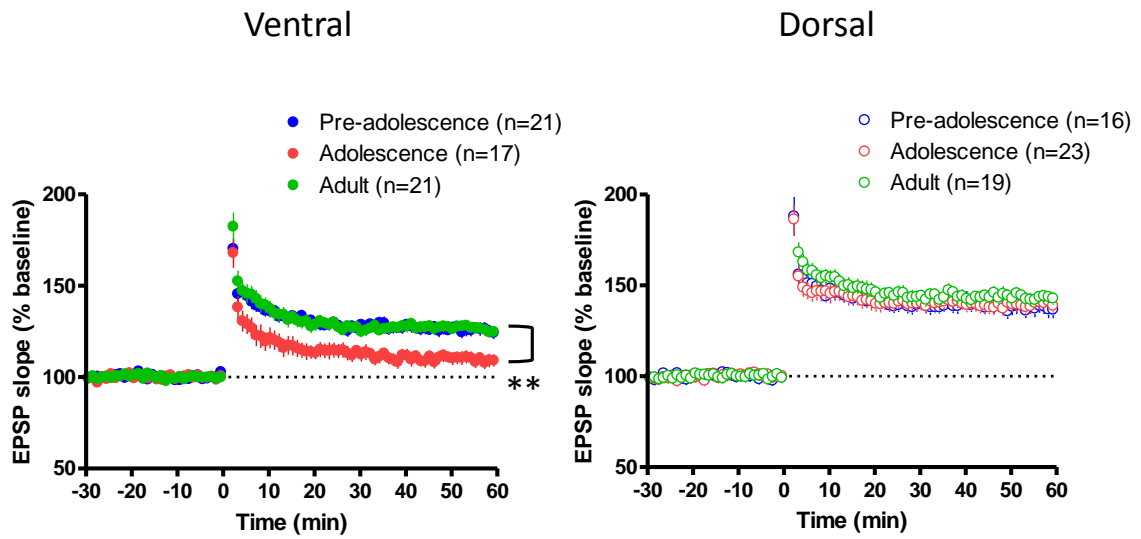


Figure7

(a)



(b)

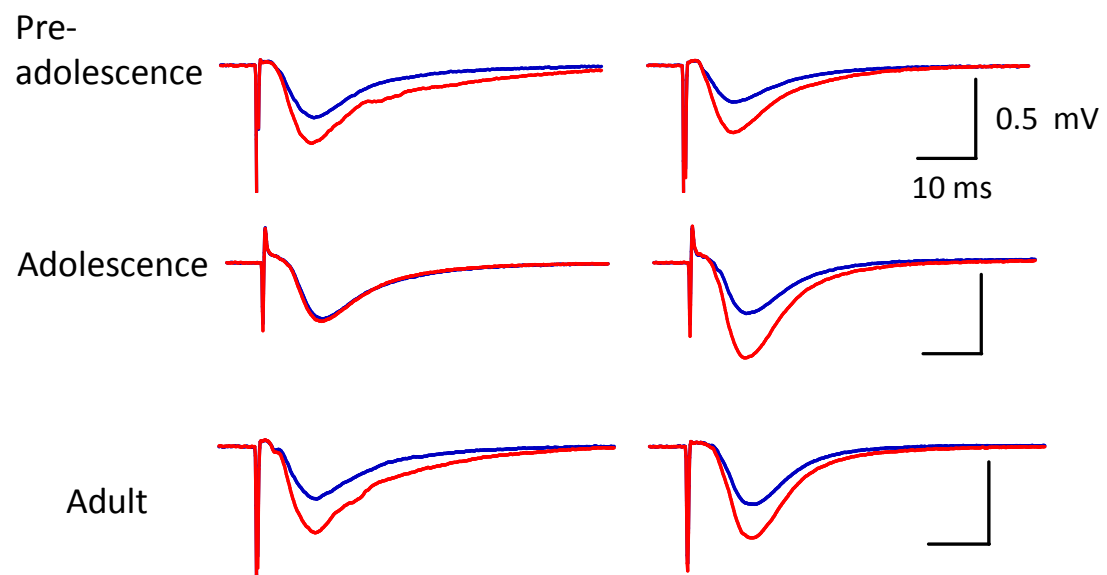


Figure8

(a) TBS: 10 trains (4 pulses at 100 Hz repeated 5 times at 5 Hz)

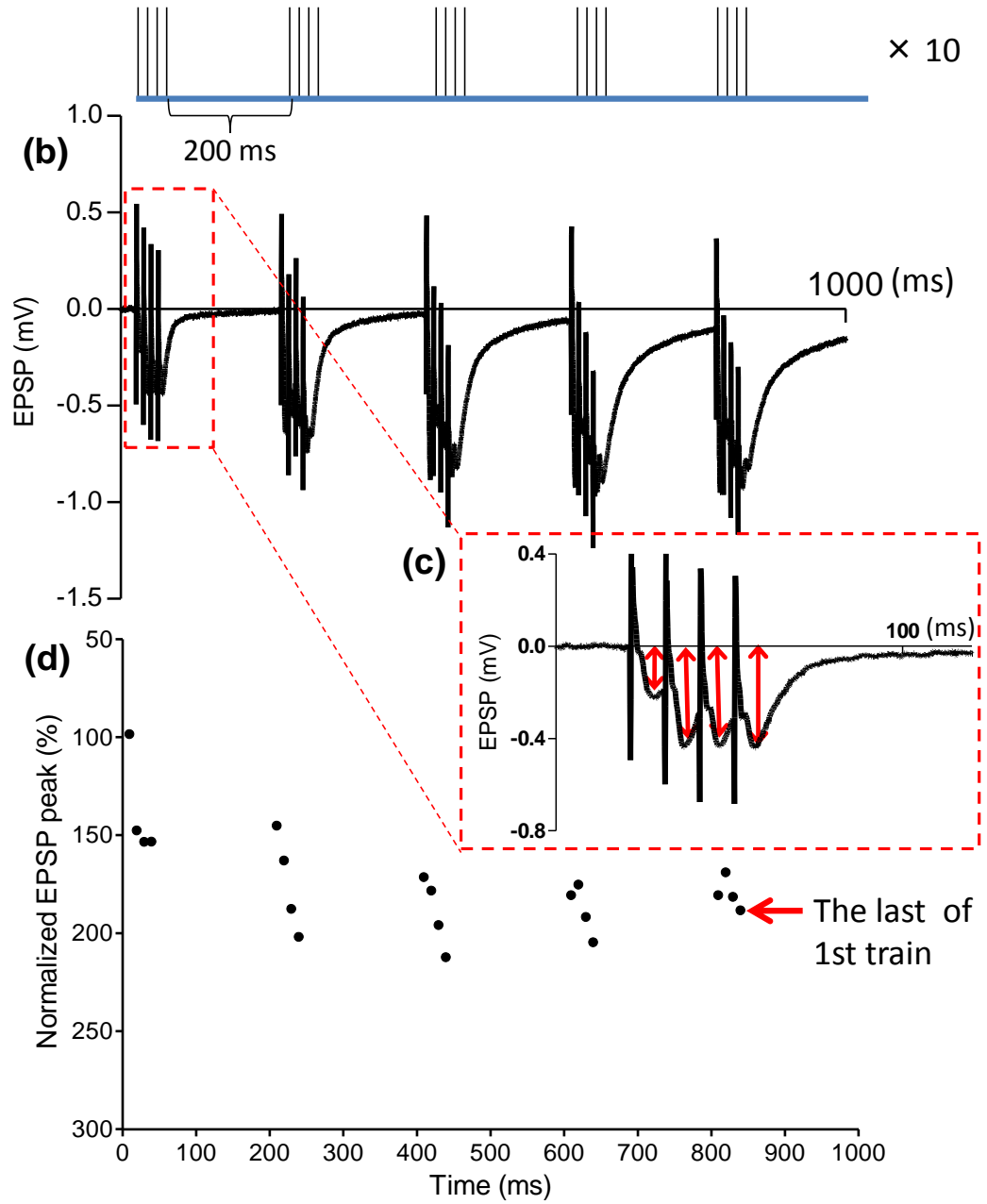
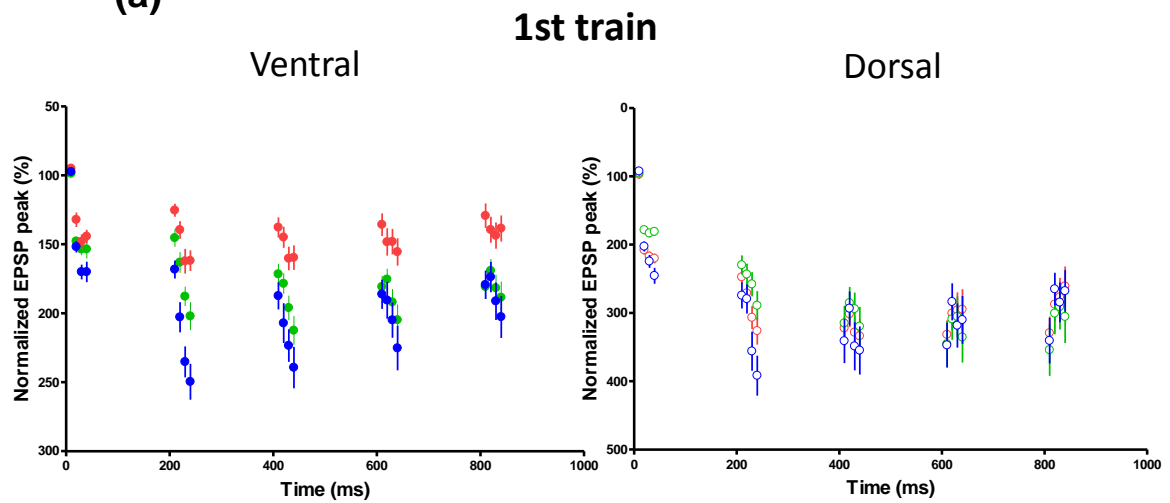


Figure9

(a)



(b)

The last of 1st train

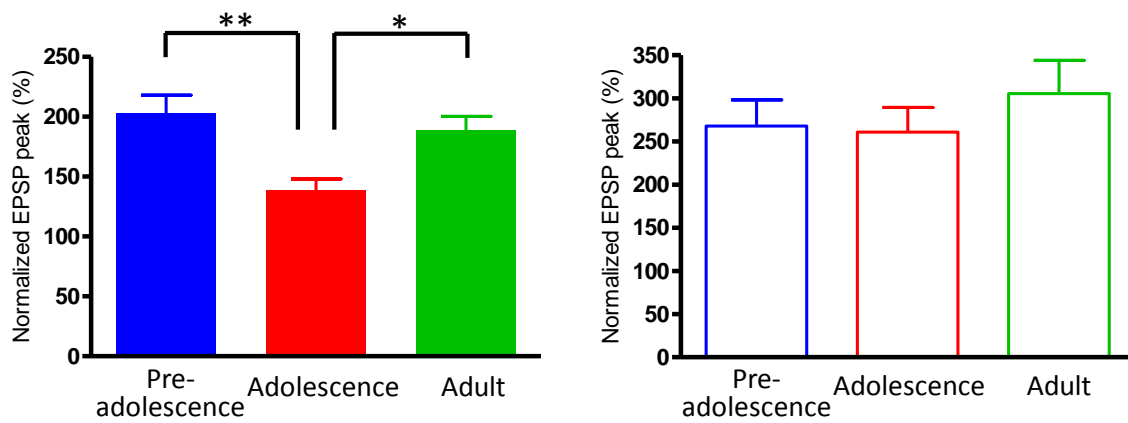


Figure10 Ventral (adolescence)

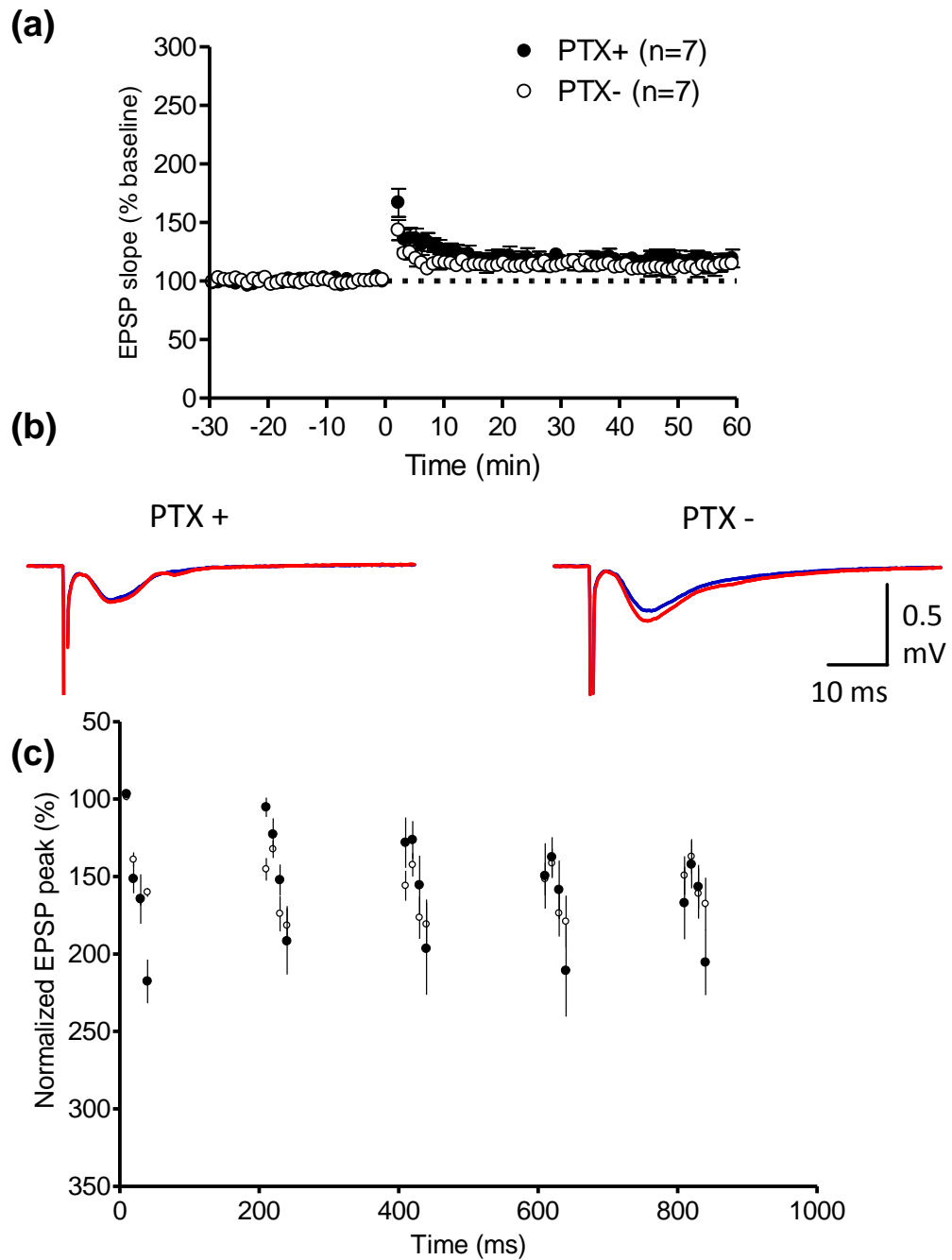


Figure11

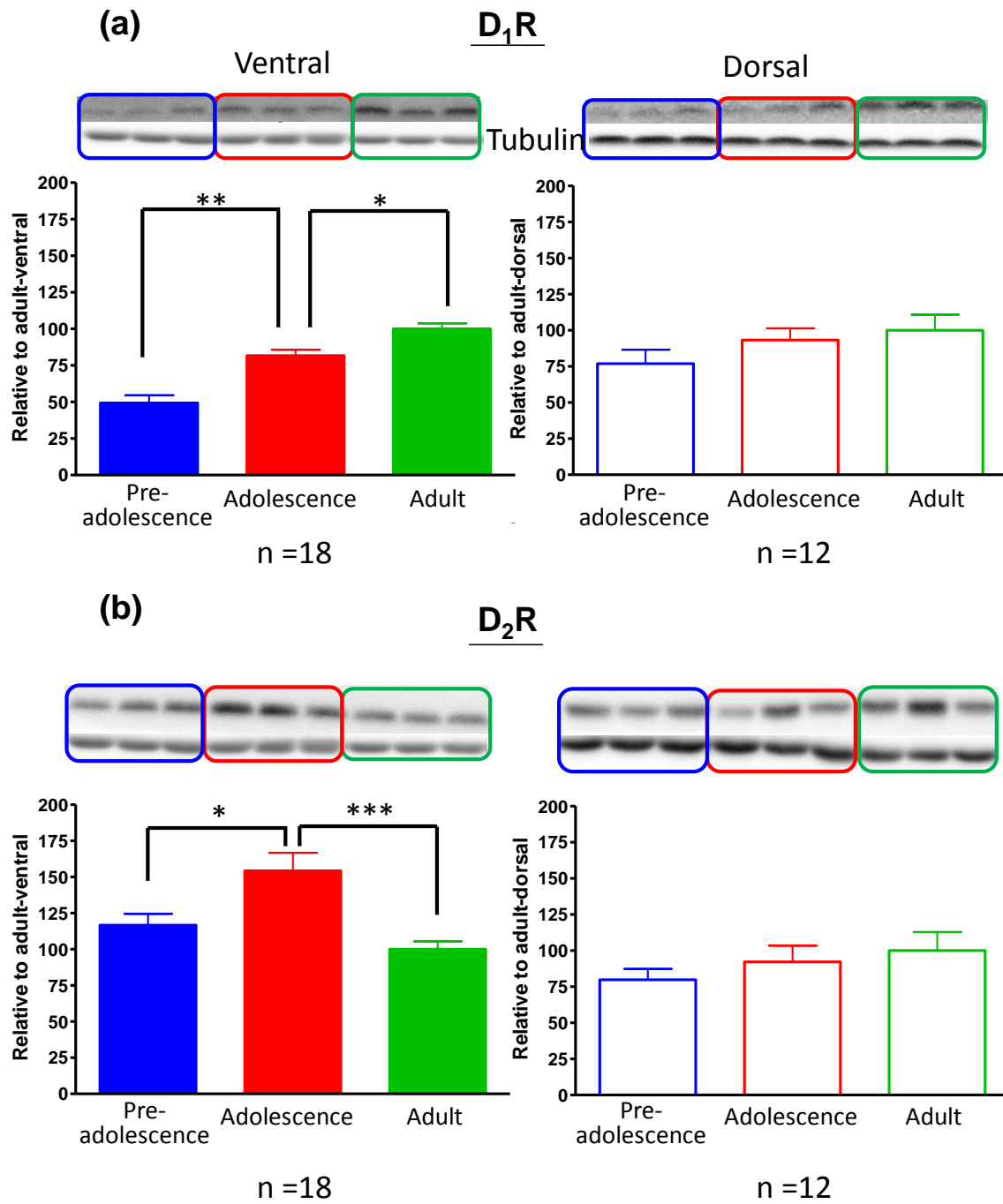


Figure12

Ventral

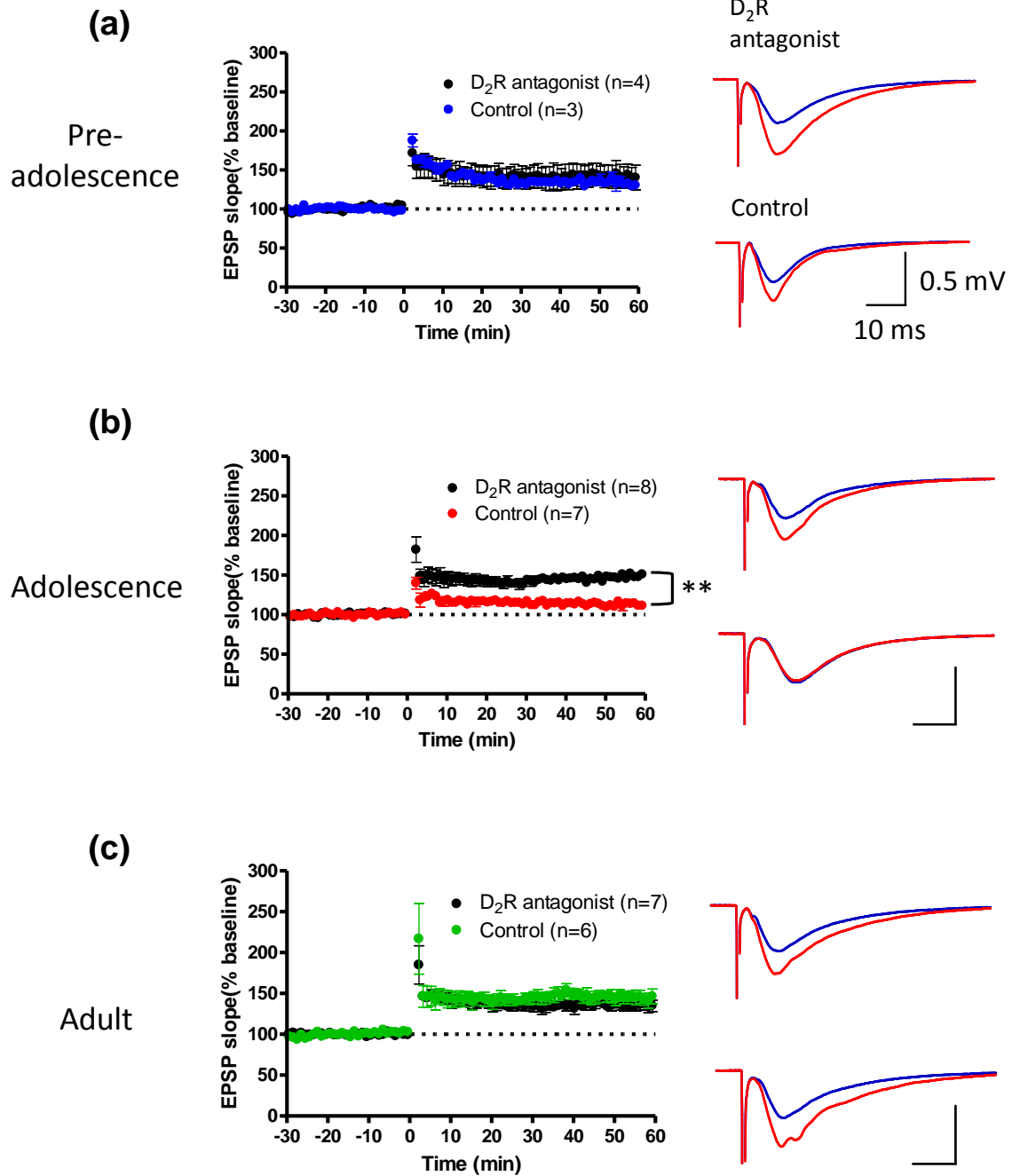


Figure13

Dorsal

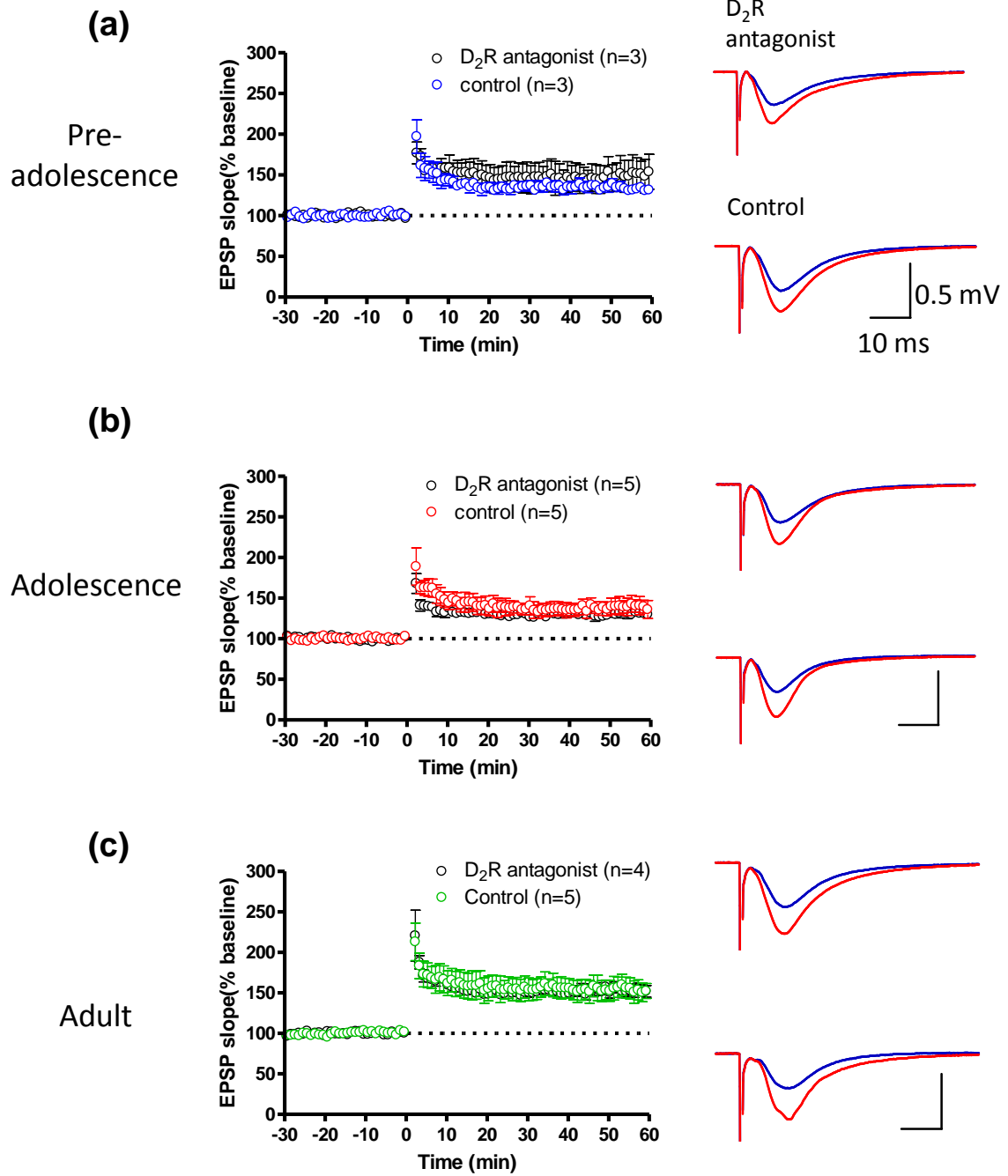
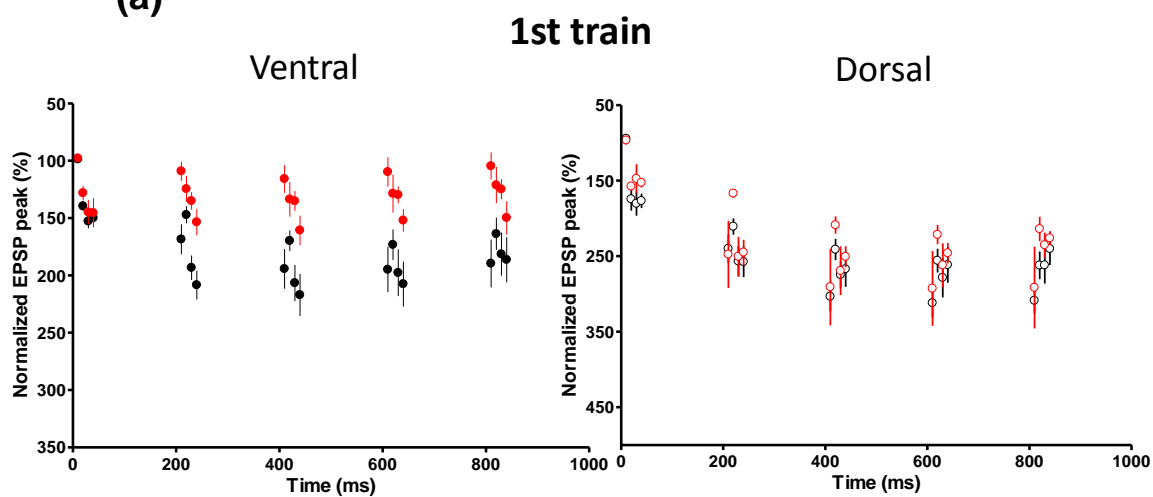


Figure14

(a)



(b)

