

論文の内容の要旨

論文題目 Experience-dependent synaptic maintenance of layer 4–layer 2/3 synapse in the mouse barrel cortex (マウス体性感覚野バレル皮質第4層—第2/3層シナプスにおける経験依存的シナプス機能維持)

氏名 久保田 淳

個体の内部および外部状態の変化に対して適応するために、脳は可塑的な変化を示す。知覚・認知・記憶・行動などを司る大脳皮質においては、可塑性はとりわけ重要である。末梢からの感覚入力の変化に応じてシナプス強度が変化する現象は、大脳皮質における代表的な可塑性である。この現象は経験依存的可塑性と呼ばれ、幼若期において顕著であるものの生涯にわたって継続して起こり、外部環境変化に適応するための基盤と考えられている。しかしながら、発達期に比べて成熟した個体における経験的可塑性のメカニズムについては十分な知見が得られていない。

げっ歯類のヒゲ—大脳バレル皮質は、経験依存的可塑性の代表的なモデル系である。げっ歯類の体性感覚野に存在するバレル構造は頬ヒゲにおける体性感覚を処理する脳部位であり、解剖学的に頬ヒゲと同様の配列で大脳皮質に対応するカラム構造が観察される。ヒゲからの感覚入力はバレル皮質の第4層に入力し、第4層の神経細胞は第2/3層の錐体細胞にシナプス結合（第4層—第2/3層シナプス）を形成する。ヒゲ除去による感覚入力の遮断は対応するバレル皮質での反応性の低下を誘発することが知られており、この第4層—第2/3層シナプスの長期抑圧が主要な要因の一つである。このシナプス長期抑圧のメカニズムは幼若期（生後2週齢付近）において解析が進められ、NMDA型グルタミン酸受容体、代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）、そしてカナビノイド受容体（CB1R）に依存する前シナプス伝達物質放出確率の低下であることが報告されている。しかしながら、より成長した個体におけるメカニズムは不明である。そこで本研究では、生後3週齢以上のマウスを用いて、ヒゲ除去によるバレル皮質第4層—第2/3層シナプス可塑性を担うメカニズムを解明することを目的とした。

まず生後18日齢から20日齢のマウスの片側のヒゲをすべて除去し、5日から7日経過した際の第4層—第2/3層シナプスへの影響を解析した。ヒゲ除去をしたマウスからバレル皮質を含む急性大脳皮質スライス標本を作成し、第2/3層の錐体細胞にホールセルパッチクランプを適用し第4層からの入力に応じた興奮性シナプス後電流（EPSC）を記録した。シナプス機能の変化を評価するため、まず前シナプスからの伝達物質放出確率の指標の一つである paired-pulse ratio の測定を行ったところ、ヒゲ除去群において有意な値の上昇が認められた。このことはヒゲ除去により第2/3層の錐体細胞への第4層からの伝達物

質放出確率の低下を示唆する。さらに NMDA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストである MK-801 を用いた使用依存的結合速度解析、また量子 EPSC の測定を行うことで、前シナプスからの伝達物質放出確率低下を確認した。CB1R のアンタゴニストである AM251 をヒゲ除去マウスに投与したところ、放出確率の低下を回復することはできなかった。以上より、ヒゲ除去により誘発される第 4 層—第 2/3 層シナプスでの可塑性は生後 3 週齢以上においても 2 週齢前後と同様に伝達物質放出確率低下に依存するが、これを担うメカニズムは両者で異なり、成熟期特異的なメカニズムの存在が示唆された。

我々の研究室では、小脳皮質平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおいて、シナプス後膜の mGluR が持続的に活性化されることでシナプス伝達効率が維持されており、mGluR 阻害により伝達物質放出確率が低下することを既に報告している。そこで、mGluR 活性の低下によるシナプス維持の破綻が成熟期におけるヒゲ除去依存性可塑性を担うメカニズムである、という作業仮説に基づき解析を行った。生後 18 日齢から 20 日齢でヒゲ除去したマウスに mGluR5 のポジティブアロステリックモジュレーターである CDPBB を投与したところ、ヒゲ除去による放出確率の低下が完全に回復した。さらに、ヒゲを除去していないマウスに mGluR のアンタゴニストである AIDA (グループ I mGluR 選択的) もしくは MPEP (mGluR5 選択的) を投与し、第 4 層—第 2/3 層シナプスの機能を評価したところ、ヒゲ除去と同様の放出確率の低下を再現した。以上と同様の結果は生後 1 か月齢以降のマウスにおいても観察された。つまり生後 3 週齢以上の個体では、ヒゲ入力により第 4 層神経細胞からのグルタミン酸入力が入り続け、シナプス後膜の mGluR が活性化され続けることで、第 4 層—第 2/3 層シナプスの機能が維持されていることが強く示唆された。

脳内ではバレル皮質第 2/3 層錐体細胞に限らず、様々な部位の神経およびグリア細胞で mGluR5 が発現しており、以上の解析における mGluR5 活性の薬理的な操作では作用点が不明である。そこで mGluR5 と共役するイノシトール 1,4,5 三リン酸 (IP₃) シグナリングに注目した。IP₃ 分解酵素である IP₃ 5-phosphatase (5ppase) を用いた細胞選択的 IP₃ 産生阻害法により、第 2/3 層錐体細胞選択的に mGluR5-IP₃ シグナリングを阻害し、その効果を解析した。興奮性細胞特異的プロモータを有するアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、5ppase をバレル皮質第 2/3 層錐体細胞に導入した。ヒゲを除去してしない生後 1 か月齢のマウスのバレル皮質にウイルス液を注入し、14 日から 18 日後に電気生理学的解析を行った。5ppase 発現による IP₃ シグナリングの阻害により、ヒゲ除去もしくは mGluR 阻害で見られたものと同様の伝達物質放出確率の低下が認められた。よって第 2/3 層錐体細胞における mGluR5-IP₃ シグナリングがヒゲ除去依存性可塑性に関与することが示された。また第 2/3 層から第 4 層への逆行性因子の存在が示唆され、この因子の消失が放出確率の低下を招いていると考えられる。

一連の実験により、マウス体性感覚野バレル皮質において、経験依存的なシナプス機能維持機構の存在とその分子機構が明らかになった (図)。3 週齢以上の個体では持続的なヒゲ入力により第 4 層神経

細胞から放出されたグルタミン酸は第 2/3 層錐体細胞の mGluR5-IP₃ シグナリングを活性化し、逆行性因子を介して第 4 層神経細胞軸索終末からの伝達物質放出確率が維持されている。ヒゲ除去、mGluR5 阻害、IP₃ シグナリング阻害でこの維持機構が破綻すると、前シナプスからの伝達物質放出確率が低下することが考えられる。本研究で明らかにされたこれらの知見は、幼若期以降の個体での大脳皮質における可塑性だけでなく、シナプス機能維持機構という未だ解析が十分でないメカニズムにも光を当てるものであると考えられる。

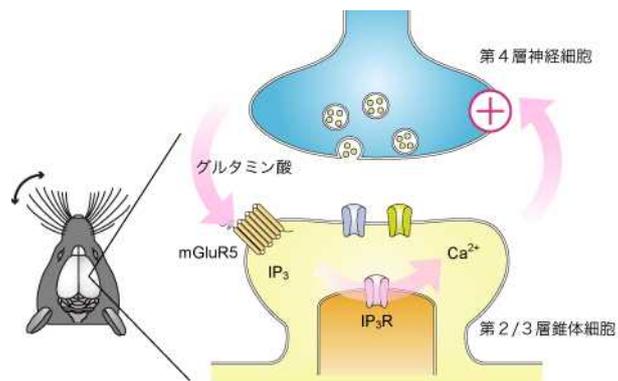


図 本研究にて示唆されたバレル皮質第 4 層—第 2/3 層シナプスにおける機能維持に関する機構の模式図