

氏名(本籍)	井上雅司(愛知県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第389号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	海馬CA1錐体細胞樹状突起におけるシナプス電位の伝播と減衰：光学的 多点同時膜電位測定法による実像の確認
論文審査委員	(主査) 藤瀬 浩 (副査) 赤堀 文昭 浅利 昌男 宮川 博義(東京薬科大学)

論文内容の要旨

脳を構成する神経細胞は相互にシナプスで結合する。前シナプス軸索線維終末からは神経伝達物質であるアミノ酸が放出され、この伝達物質がシナプス後膜側細胞のイオンチャネル共役型受容体に結合し、シナプス後電位を生起させる。シナプスは生理的・病的に重要な機能単位であり、その異常は動物に重篤な病態を惹起する。また、シナプスに作用する薬物を探索する創薬上の意義も大きい。

中枢神経系神経細胞は数万におよぶシナプス入力とその樹状突起上の異なる部位に受ける。樹状突起上に発生した興奮性後シナプス膜電位(EPSP)は、樹状突起の受動的膜特性(ケーブル特性)および電位依存性チャネルの分布に規定された変容を受けて細胞体に伝播する。その挙動を確認するため、最近、神経細胞の細胞体と樹状突起の両方から同時に膜電位をガラス電極により測定しえるようになった。しかし、ガラス電極による記録法では空間解像度は著しく悪く、また、細い樹状突起の遠位部からの電位を記録することは不可能である。さらに樹状突起の特定のどの部位で電位変化がおこるかというような空間的概観を得ることはできない。他方、光学的測定法は空間的解像度が高く、この方法を用いることで、樹状突起を含む神経細胞の全構成要素の膜電位を同時に測定することができる。本研究では、実験動物としてラットを使用し、電位感受性色素を用いた光学的電位測定法で、海馬CA1野の主要な神経細胞である錐体細胞の基底樹状突起、細胞体、先端樹状突起遠位部の全ての層から、十分な空間、時間解像度で膜電位を計測し、樹状突起遠位部への入力に起因するEPSPの伝播・減衰の微細な実像を記録しようとした。これまで電気生理学的手法による神経細胞の研究に広く用いられてきたラットを試料として用いたので、従来の結果と今回の光学的記録を比較することが可能となった。

4週齢から6週齢のWistar系雄性ラットを麻酔下で安楽死させ、脳を摘出後、厚さ400 μ mの海馬スライス人工脳脊髄液中で作成した。膜電位変動に高速に応答するスチリル系の膜電位感受性蛍光色素

であるJPW1114を色素として用いた。本色素は、細胞膜中に膜外側から入り込み、膜電位の変動に応じて蛍光を変化させるため、膜電位の変化に伴う光学的シグナルを検出できる。光学的シグナルは縦横16列合計256素子からなるフォトダイオードアレイシステムにより0.25 msec間隔で取得した。海馬スライスのCA1網状分子層に刺入した刺激電極により内嗅皮質からの軸索線維束である貫通線維(perforant path)を興奮させCA1、錐体細胞先端樹状突起遠位シナプスに入力を与えEPSPを惹起した。電位依存的イオンチャネルから流出入する電流の影響を極力排除するため、弱刺激プロトコールを用い、神経細胞が発火しない閾値下のEPSPを観察した。非NMDA型グルタミン酸受容体による速いEPSPを測定するために灌流液に、DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) およびビククリンを添加してそれぞれNMDA型受容体およびGABA_A受容体を阻害した条件下で、光シグナルを測定した。この灌流液に、さらに非NMDA型グルタミン酸受容体の阻害剤である6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)を加えた条件下で観察されるシナプス前神経軸索線維の興奮由来のシグナル成分をこの光シグナルから減算し、集合EPSPに対応するCNQX感受性成分、すなわちグルタミン酸受容体から流入する電流に起因するシナプス後膜側の電位成分を分離した。このCNQX感受性成分の樹状突起に沿った伝播と減衰を測定した。

CNQX感受性成分は、細胞体部位でシナプス入力部位に比べて 17.08 ± 1.64 msecのピークの遅延が生じ、ピーク振幅値は約35%に減衰した。他方、CA1領域上昇層刺激で、基底樹状突起にシナプス入力を与えたところ、CNQX感受性成分は細胞体から先端樹状突起に向かって逆方向に伝播した。このとき、細胞体から $495 \mu\text{m}$ 離れた先端樹状突起遠位部では、細胞体に比べて 15.11 ± 1.29 msecのピーク遅延が生じ、ピークのシグナル振幅は20%まで減少した。伝播方向によるシグナル伝播を比較すると、従来の受動的性質のみを有し、かつ膜抵抗が均一に分布する樹状突起膜モデルによる理論的予測と異なり、細胞体から樹状突起に向かって逆方向に伝播するときCNQX感受性成分の減衰はより急峻であった。これらの観測は、多点同時光学的電位測定法を光軸と鉛直に細胞が重積する組織構築をもつ海馬スライスに適用することによって可能になったもので、EPSPの樹状突起に沿った伝播の微細な動態を初めて確認した実験結果である。

次に、これらの光学的電位測定データから先端樹状突起のケーブル特性値をシミュレーションにより求めた。シミュレーションには、コンパートメント・モデルに基づく現実的な神経細胞シミュレーション・ソフトである“NEURON”を用いた。算出された樹状突起の見かけ上の膜特性値は、先端樹状突起遠位部へのシナプス入力時には、膜の比容量を細胞体において $1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、樹状突起において $1.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ と仮定すると、膜の比抵抗(R_m)は $27.8 \pm 2.1 \text{k}\Omega\text{cm}^2$ となり細胞内の比抵抗(R_i)は $76.0 \pm 4.2 \Omega\text{cm}$ となった。これらの値はガラス微小電極、パッチ電極を用いた旧来の報告値と一致した。他方、基底樹状突起へシナプス入力を与えた場合、見かけの受動的な膜特性値はこれと異なり、先端樹状突起遠位入力に比べて高い R_i 値および低い R_m 値を示した。この伝播方向による膜特性値の違いは、シミュレーションの条件に樹状突起の膜抵抗が一定と仮定したことに起因し、実際は樹状突起は膜抵抗が不均一で、遠位部では膜抵抗が低いことによると考えられる。陽イオンチャネルであ

る I_h チャンネルは細胞膜の過分極によって活性化され、静止膜電位近傍でなお開放している。この I_h の樹状突起における不均一な分布が膜抵抗を不均一にする一因である可能性がある。シミュレーションによる膜特性値の決定は、今後理論的に神経細胞における膜電位の挙動を確定する際に必要な基礎特性を与える意義がある。樹状突起の膜抵抗が不均一である可能性のシミュレーションによる検討、 I_h のEPSP伝播に対する役割の実験的確定が残された課題である。

本研究の結果から、樹状突起遠位部に入力したEPSPは減衰し、ピーク遅延を生じながら細胞体に到達すること、基底樹状突起に入力したEPSPはより速やかに細胞体に到達したのちに先端樹状突起に伝播するが、反対方向に比べて急峻に減衰することが明らかになった。この特性から、樹状突起遠位部における情報処理は細胞体の活動の影響を受けにくく相対的に独立して行われており、また樹状突起遠位への入力は数10ミリ秒規模の比較的長い経過の時間的加算 (temporal integration) に貢献する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

1. 研究の背景

中枢神経系神経細胞は数万におよぶシナプス入力をその樹状突起上の異なる部位に受ける。樹状突起上に発生した興奮性後シナプス膜電位 (EPSP) は、樹状突起のケーブル特性および電位依存性チャンネルによる修飾を受けて細胞体に伝播する。しかし、EPSPがどのように樹状突起を伝播し、空間的時間的に加算されるかその実像の詳細は不明である。とりわけ、細胞体から離れた部位で発生したEPSPは、樹状突起のケーブル特性によって減衰することが予測され、その有効性に疑問が呈されてきた。この問題への回答として以下の2つの可能性が考えられている。ひとつは、樹状突起遠位で発生したEPSPは樹状突起の電位依存性チャンネルにより増幅され、細胞体でもシナプス入力部位と同等の電位変化が得られるという説であり、他は、樹状突起の遠位部へ離れるにつれて発生するEPSPの振幅を大きくすることでシナプス入力の場所依存性を克服しているという説である。これらの説の根拠となった従前の研究はガラス電極法によるものであった。この方法による電位記録の空間解像度は著しく悪く、また、細い樹状突起の遠位部からの電位を記録することは不可能であった。さらに樹状突起の特定のどの部位で電位変化がおこるのかというような空間的概観を得ることはできなかった。

他方、本研究で用いた光学的測定法は空間的解像度が高く、この方法を用いることで、樹状突起を含む神経細胞の全構成要素の膜電位を同時に測定することが可能であり、樹状突起全体にわたるEPSPの挙動を確定することができる。EPSPの伝播を決定する要因である樹状突起における膜の比抵抗などの膜特性値の算定についても、従来は細胞体から、ガラス電極法によって推定する手法が用いられてきたが、光学的実験データからそれらを算定することができれば、より直接的で信頼性が高い値が得られるものと考えられる。

2. 研究の目的

電位感受性色素とフォトダイオード・アレイを用いた光学的電位測定法で、ラット海馬CA1錐体細胞の基底樹状突起、細胞体、先端樹状突起遠位部の全ての層から、十分な空間、時間解像度で膜電位を計測し、樹状突起遠位部へのシナプス入力に起因するEPSPの伝播・減衰の微細な実像を記録する。次に、シミュレーションによって、得られた光学的計測値から錐体細胞樹状突起の膜の比抵抗などの膜特性値を試算する。

3. 研究の成果

1) 光学測定法の改良による信号(S)/雑音(N)比(S/(N)比)の改善

光学的計測法が、神経細胞の生理学的研究において汎用されてこなかったのは、主に光学測定装置の時間的解像力および S/N 比が高速記録に十分でなかったことによる。本研究では、市販の高速フォトダイオード・アレイ装置（浜松フォトニクス）を改良し100M Ω のフィードバック抵抗を実装し光電流の初段増幅率を高めた。A/D 変換素子を高速素子に変更することで、4kHzのサンプリング速度を実現した。また高い照度を得るために300Wハロゲンランプを光源として実用化した。予備実験で各種の電位感受性色素の検討を行い、最も S/N 比の良いJPW1114を選択した。こうして従前の光学測定装置と比べて高速かつ高 S/N 比を実現したので、閾膜電位以下の膜電位変動を観察することに成功した。

2) シナプス後膜側細胞のEPSP由来光シグナルの薬理学的手法による分離

非NMDA型グルタミン酸受容体による速いEPSPを測定するために灌流液に、DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) およびビククリンを添加して、それぞれNMDA型受容体およびGABA_A受容体を阻害した条件下で、光シグナルを測定した。この灌流液に、さらに非NMDA型グルタミン酸受容体の阻害剤である6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX)を加えた条件下で観察されるシナプス前神経軸索線維興奮由来のシグナル成分をこの光シグナルから減算し、集合EPSPに対応するCNQX感受性成分、すなわちグルタミン酸受容体から流入する電流に起因するシナプス後膜側の電位成分を分離した。蛍光色素を用いることで、吸光色素使用時にみられる退色に伴う蛍光強度比の減衰を排除し平均加算およびシグナル減算操作を可能にした。

3) 光学データの空間的線形性の確認

異なるフォトダイオード素子間の光シグナルの電位応答に対する線形性を確認するために、樹状突起を逆伝播する活動電位を発生させその光学的応答を既報告値と比較した。海馬CA1錐体細胞の先端樹状突起が分布する放線層では、光学記録はパッチ電極による膜電位変化と一致することを確認した。

4) 樹状突起遠位部に入力したEPSPの伝播と減衰

海馬CA1錐体細胞の樹状突起遠位部にシナプス入力を与えEPSPを誘起した。集合EPSPに対応する光シグナルのCNQX感受性成分は、細胞体部位でシナプス入力部位に比べて17.08 \pm 1.64 msecのピークの遅延が生じ、ピーク振幅値は約35%に減衰した。他方CA1領域上昇層刺激で、基底樹状突起にシナプス入力を与えたところ、CNQX感受性成分は細胞体から先端樹状突起に向かって逆方向に伝播した。

このとき、細胞体から $495\mu\text{m}$ 離れた先端樹状突起遠位部では、細胞体に比べて 15.11 ± 1.29 msecのピーク遅延が生じ、ピークのシグナル振幅は20%まで減少した。伝播方向によるシグナル伝播を比較すると、従来の受動的性質のみを有し、かつ膜抵抗が均一に分布する樹状突起膜モデルによる理論的予測と異なり、細胞体から樹状突起に向かって逆方向に伝播するときCNQX感受性成分の減衰はより著しかった。

5) シミュレーションによる膜特性値の試算

光学的電位測定データから先端樹状突起の膜の特性値をシミュレーションにより求めた。シミュレーションには、コンパートメント・モデルに基づく現実的な神経細胞シミュレーション・ソフトである“NEURON”を用いた。算出した樹状突起の見かけ上の膜特性値は、先端樹状突起遠位部へのシナプス入力時には、膜の比容量を細胞体において $1.0\mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、樹状突起において $1.6\mu\text{F}/\text{cm}^2$ と仮定すると、膜の比抵抗 (R_m) は $27.8 \pm 2.1\text{k}\Omega\text{cm}^2$ となり細胞内の比抵抗 (R_i) は $76.0 \pm 4.2\Omega\text{cm}$ となった。これらの値はガラス微小電極、パッチ電極を用いた従来の報告値と一致した。

6) EPSPの伝播方向によるシミュレーション試算値の差異

基底樹状突起へシナプス入力を与えた場合、見かけの受動的な膜特性値は、先端樹状突起遠位入力に比べて高い R_i 値および低い R_m 値を示した。この伝播方向による膜特性値の違いは、シミュレーションの条件に樹状突起の膜抵抗が一定と仮定したことに起因し、実際は樹状突起は膜抵抗が不均一で、遠位部では膜抵抗が低いことによると考えられる。陽イオンチャネルである I_h チャネルは細胞膜の過分極によって活性化され、静止膜電位近傍でなお開放している。この I_h の樹状突起における不均一な分布が膜抵抗を不均一にする一因である可能性を示唆した。

7) 結論

本研究の結果から、樹状突起遠位部に入力したEPSPは減衰し、ピーク遅延を生じながら細胞体に到達すること、基底樹状突起に入力したEPSPはより速やかに細胞体に到達したのちに先端樹状突起に伝播するが、反対方向に比べて著しく減衰することが明らかになった。この特性から、樹状突起遠位部における情報処理は細胞体の活動の影響を受けにくく相対的に独立して行われており、また樹状突起遠位への入力は数10ミリ秒規模の比較的長い経過の時間的統合に貢献する可能性を示した。

4. 研究の評価

本研究は、1) 高速かつ高い S/N 比で、光学的に多点同時に膜電位を測定し、ラット海馬スライス標本の樹状突起に入力した閾膜電位以下のEPSPの挙動を明らかにした。海馬CA1錐体細胞の先端樹状突起の遠位部に入力したシナプス入力はEPSPを発生させるが、このEPSPが減衰しながら細胞体に伝播する様子を記述することに成功した。2) 樹状突起遠位部へのシナプス入力により誘起されたEPSPは、受動的膜モデルに従い顕著な減衰とピーク遅延を伴いながら細胞体に伝播することを示し、電位依存性チャネルがシナプス入力の場所依存性を克服するという説は再検討を要することを明らかにした。3) 樹状突起は膜抵抗が不均一で、遠位部では膜抵抗が低く電流漏れが大きい可能性を示唆した。

以上の発見は、シナプス入力 of 樹状突起における統合という重要な問題に関して、根源的な回答を与えるものであり、独創的研究であると評価できる。また、従来の光学的手法による研究では、神経細胞の種々の電位応答に由来する光学シグナルを、「興奮の伝播」として、総括的かつ定性的に記述するのみであったが、本研究は、この手法を独創的に深化させ、異なる神経細胞の光シグナルを分離し、さらにその特性を定量的に記述することに成功した。本研究で開発された手法は獣医学領域における正常動物の神経生理機能の解明、神経障害の病態解明、あるいは神経系への薬理作用ほか治療研究手段として極めて有用である。本研究は新しい手法により新知見を得た独創的な研究であり、獣医学上有意義なものである。したがって、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいと判定した。