

## 論文内容の要旨

論文題目 「脳由来神経栄養因子 (BDNF) の抑制性シナプス形成促進作用」

氏名 中西 康介

### 序論

ヒトの脳は少なくとも数百億といわれる神経細胞からなるが、これらの神経細胞はその突起を介するシナプス結合によって複雑で多岐にわたる神経回路網を形成している。このような複雑な神経回路網がどのようにして形成されるのだろうか？近年の研究によりこれら神経回路形成を制御する軸索ガイド分子として神経軸索に直接接触して働く分子群であるラミニンやカドヘリンといった細胞接着因子、標的細胞から分泌されて遠距離に作用するもので誘引的に働くネトリンや反発的に働くセマフォリンといったものが明らかとなっている。こういった遺伝情報に基づく神経回路の制御に加え、神経活動に依存した神経回路の修飾も精緻な神経回路網の完成のためには必須なプロセスであるといえる。記憶・学習を調節する部位である海馬においては主にグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスと $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を伝達物質とする抑制性シナプスが緻密に神経ネットワークを形成し情報処理機構の基となっている。私はこれら神経ネットワーク形成を制御する因子として脳由来神経栄養因子 (BDNF :brain-derived neurotrophic factor) に注目した。BDNF の産生は神経活動に伴って上昇することから神経活動に依存した神経回路形成を制御する可能性がある。そこで本研究では培養海馬神経細胞を用いて神経回路網構築の基となるシナプス形成に対する BDNF の作用を検討した。

### 1. シナプス関連小胞蛋白質発現及び伝達物質放出に対する影響

培養海馬神経は *in vitro* におけるシナプス形成のモデル実験系としてよく使われる。胎生 18 日齢のラットより海馬神経細胞を単離し、10%血清含有培地で 24 時間培養した後、無血清培地 Neurobasal+B27 にて培養し実験に用いた。シナプス部には神経伝達物質放出機構に関与する SNARE 蛋白質群が存在している。これら蛋白質の発現を western blot 法にて検討した。BDNF (50 ng/ml) を約一週間慢性適用することにより synaptophysin, synaptobrevin, syntaxin などの SNARE 蛋白質の発現が 2-3 倍に増大した。そこで神経伝達物質の放出量にも影響があるのではと考え、高速液体クロマトグラフィーを用

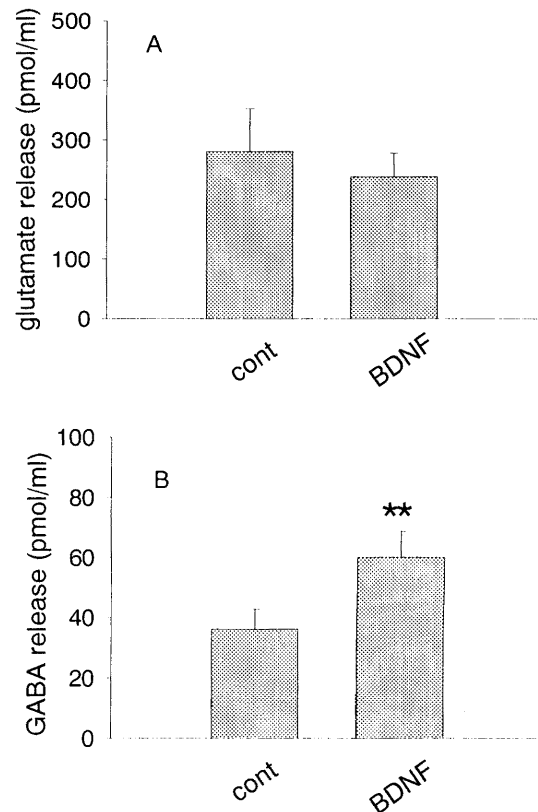


Fig. 1 グルタミン酸 (A) 及び GABA 放出 (B) への BDNF 慢性処置の影響 \* $P < 0.05$  vs control

いて高 K<sup>+</sup>刺激で誘発されるグルタミン酸、及び GABA の放出量を定量した。BDNF を慢性処置してもグルタミン酸の放出量には影響が認められなかったが、GABA の放出量は約 80%程増大していた (Fig. 1)。このことから BDNF は抑制性の伝達物質である GABA の放出を特異的に増強すると考えられた。

## 2. 受容体発現及び樹状突起形態への影響

次にシナプス後部側における受容体発現への影響を検討したところ、グルタミン酸受容体 AMPA、NMDA のサブユニットである GluR1、NR1 の発現に変化は認められなかったが、GABA<sub>A</sub>R β2/3 の発現は約 2 倍に上昇した。興奮性のシナプスは樹状突起の spine 上に、抑制性のシナプスは樹状突起の shaft 上にシナプスを形成することが知られている。そこで細胞膜表面を染色する蛍光色素 Dil を用い spine の形態を観察したところ、BDNF の効果を検討したところ spine の数が約 30%程減少した (Fig.2B)。このことから BDNF は抑制性シナプスを特異的に増強していると考えられた。

## 3. BDNF の総シナプス数及び抑制性シナプス終末への影響

次に BDNF 慢性処置によりシナプス数が実際に変化しているかを蛍光色素 FM1-43 を用いて検討した。FM1-43 はエンドサイトーシスの機構により細胞内に取り込まれると発色することから機能的なシナプス終末を染める方法として用いられている。FM1-43 を用いた解析からシナプス総数には影響が認められなかった。そこで抑制性シナプス数への選択的な作用を観察するために抗 GAD 抗体を用いた蛍光免疫染色像の解析を行った。GAD は GABA 合成酵素で抑制性の神経終末に比較的多く存在し抑制性シナプスのマーカーとして使われる。BDNF 慢性処置によって GAD の免疫蛍光強度が上昇し、cluster 状の斑点の数が約 2 倍以上増加した (Fig. 2)。これらのこと

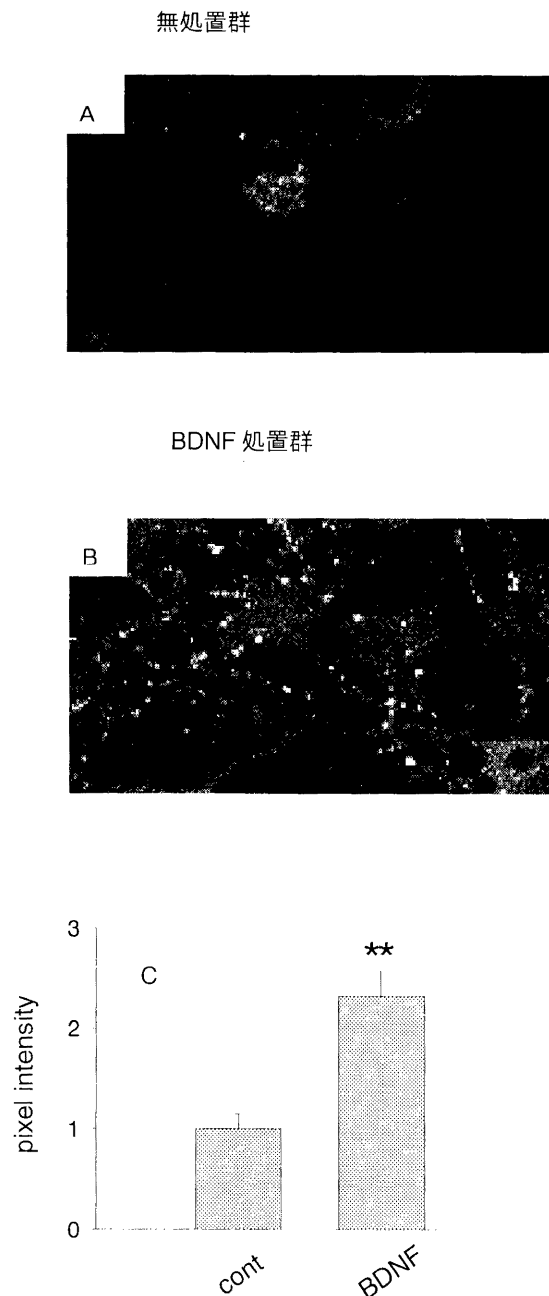


Fig. 2 抗 GAD 抗体を用いた抑制性シナプスの観察 (A, B)。BDNF 慢性処置の抑制性シナプス数への影響 (C)。\*\*P<0.01vs control

から BDNF は抑制性のシナプス形成を実際に促進することが明らかとなった。

#### 4. BDNF 作用の抑制性神経選択性

BDNF の抑制性シナプスへの作用の特異性の理由として BDNF の内在的な受容体である TrkB の偏りが考えられる。そこで TrkB の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用い神経細胞を特異的に染める MAP2、抑制性神経を特異的に染める GABA と二重免疫染色で検討したところ GABA 陽性細胞を含めすべての神経細胞に TrkB が発現していた。そこで BDNF の作用を明確にするために免疫組織化学的手法を用いて細胞数、形態への影響を検討した。BDNF 慢性処置によっても MAP2、GABA 陽性細胞数には変化はなかったが、GABA 陽性細胞の細胞体面積および神経突起数が有意に増加した (Fig. 3)。MAP2 陽性細胞ではこのような形態変化はみられなかった。これらのことから TrkB 受容体はすべての神経細胞に発現しているにもかかわらず BDNF は抑制性の神経に選択的に作用することが明らかとなった。

#### 5. 神経活動による抑制性神経制御と BDNF の関与

神経活動が高まると BDNF の産生が亢進することが知られている。上記の結果より BDNF は抑制性神経に選択的な作用を示すことが明らかとなっている。そこで神経活動依存的に抑制性神経に選択的可塑的变化が起こりうるのではないかと考え、高  $K^+$  刺激の影響を検討した。高  $K^+$  は BDNF 処理同様に GABA 陽性細胞の細胞体面積、神経突起数を選択的に増加させた。次に高  $K^+$  及び BDNF の効果に対する L 型  $Ca^{2+}$  channel 阻害剤である Nicardipine, Trk の阻害剤として使われる k252a の作用を検討したところ高  $k^+$  の作用は Nicardipine, k252a 両阻害剤により抑制されたが、BDNF の効果は k252a によってのみ抑制された (Table1)。以上より神経活動依存的に抑制性神経に可塑的な変化が引き起こること、またこ

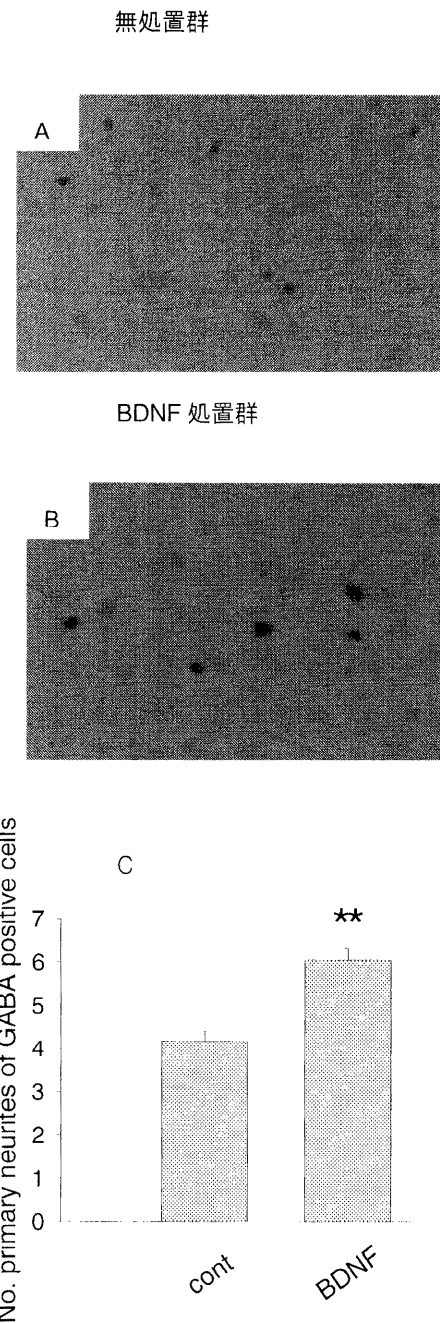


Fig. 3 K 抗 GABA 抗体による免疫染色像 (A, B)。抗 GABA 抗体陽性細胞突起数への BDNF 慢性処置の影響 (C) \*\*P<0.01 vs control

の作用に BDNF が関与していることが示唆された。

---

Table1 Effects of k252a and nicardipine on high k<sup>+</sup> or BDNF induced GABAergic growth

---

	soma area (%)	primary neurites
control	100±4.97	2.90±0.18
high K <sup>+</sup>	154±6.67**	4.41±0.24**
+nicardipine	109±4.70	3.33±0.21
+k252a	103±4.86	3.33±0.20
BDNF	147±7.16**	4.04±0.25**
+nicardipine	149±6.04**	4.00±0.23**
+k252a	107±5.58	3.00±0.14

---

#### まとめ

本研究は BDNF のシナプス形成に対する影響を検討し、①GABA 放出量を増加させる。②GABA<sub>A</sub> 受容体の発現を上昇させる。③spine の数を減少させる。④GAD 染色終末を増加させる。などから BDNF は抑制性シナプス形成を選択的に促進していることを明らかにした。また神経活動依存的な抑制性神経形態変化の作用に BDNF が関与している可能性も示唆された。本研究は興奮性、抑制性のシナプスが複雑なネットワークを形成する神経回路網構築のメカニズムに新知見を与えるものと思われる。