

## 審査の結果の要旨

氏名 中西 康 介

脳は神経細胞間に複雑な神経回路網を形成することにより高次機能を発揮している。そして、神経回路網は神経と神経間の連絡、すなわちシナプス結合の形成に依存している。神経細胞が軸索を伸ばし、目的の神経細胞にシナプスを形成するためには、様々な生体内因子が関与すると考えられている。近年の研究により、軸索をガイドする分子として神経軸索に直接接触して働く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誘引的に働くネトリンや反発的に働くセマフォリンなどが明らかとなってきた。しかし、脳においては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回路網を形成しており、軸索ガイダンスにはこれら必須の因子に加えて、神経活動に依存して局所的に修飾する因子の存在が示唆される。

本研究ではこうした因子として脳由来神経栄養因子 (BDNF : brain derived neurotrophic factor) に注目し、記憶学習などに重要や役割を果たしている海馬の分散培養神経細胞を用いて BDNF が抑制神経のシナプス形成を特異的に促進することを明らかにした。

BDNF は神経活動に依存して放出されることが既に明らかにされているが、その受容体の TrkB についての局在は知られていない。胎生 18 日齢のラット脳より調整した海馬神経細胞に対して、神経細胞全般に特異的な抗 MAP2 抗体、抑制性神経特異的な抗 GABA 抗体を用いて二重免疫染色を行ったところ、TrkB は抗 GABA 抗体陽性細胞を含む全ての神経細胞に発現していることを確認した。BDNF を約一週間適用すると、神経細胞総数及び抑制性神経細胞の数には影響しなかったが、抑制性細胞の細胞体面積及び神経突起数を有意に増加させた。従って、BDNF は抑制性神経細胞に作用することが示唆された。

神経伝達物質放出機構に関与する SNARE 蛋白質群の発現に対する作用をウェスタンブロット法で解析した。BDNF 存在下で約一週間培養すると、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いて高 $K^+$ 脱分極刺激で誘発されるグルタミン酸及び GABA の遊離量を測定した。BDNF はグルタミン酸の放出量には作用しなかったが、GABA の放出量を約 80% 増大させた。このことから BDNF は抑制性の伝達を特異的に増強することが示唆された。

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。BDNF は AMPA および NMDA 型グルタミン酸受容体のサブユニットである GluR1, NR1 の発現には影響しなかったが、GABA<sub>A</sub> RP2/3 の発現量を約 2 倍に上昇させた。興奮性のシナプスは樹状突起のスパイン上に、抑制性のシナプスは樹状突起のシャフト上に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 DiI を用いてスパインの形態を観察した。その結果、BDNF はスパインの数をむしろ約 30% 減少させた。シナプス総数に対する

作用をエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれると発色し機能的なシナプス終末が検出できる FM1-43 を用いて検討した。その結果、BDNF はシナプス総数には影響しないことを明らかにした。GABA の合成酵素(GAD)に対する抗体染色を行ったところ、BDNF 慢性処置によってクラスター状の斑点が約2倍以上増加した。GAD は主として抑制性神経の終末に存在するので、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。

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おり、上記の結果から 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。そこで細胞外のカリウム濃度を上げて(高  $K^+$ )神経活動を上昇させた。高  $K^+$ 処理は BDNF と同様に抗 GABA 抗体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。L型  $Ca^{2+}$ チャネル阻害薬、Nicardipine、Trk 型チロシンキナーゼ阻害薬、K252a の作用を検討したところ、高  $K^+$ の効果は Nicardipine と K252a、BDNF の効果は K252a によってのみ抑制された。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起こること、またこの作用に BDNF が関与することが示唆された。

以上、本研究において培養海馬神経細胞に対する BDNF の作用を検討し、シナプス数及び放出関連蛋白質の発現を増加させること、GABA の遊離を促進すること、抑制性神経細胞に対して特異的な栄養効果を示すこと、GABA<sub>A</sub> 受容体の発現を増加させること、抑制神経終末を増加させること、神経活動を高めると BDNF と同様の作用が得られることなどを明らかにした。従って、抑制性神経のシナプス構築に BDNF が重要な役割を果たしていることが示唆された。脳の神経回路網構築に関する新しい知見であり、治療薬開発の新しい方向性を示したことから、博士(薬学)の授与に値すると判断した。