

論文内容の要旨

培養スライス標本の海馬 CA1 錐体細胞における樹状突起スパインの 長期形態可塑性の解析

(Long-term structural plasticity of dendritic spines of CA1 pyramidal neurons in slice culture.)

氏名 安松 信明

背景

近年、スパインの形態が機能に密接に関連していることがわかってきた。これらの研究により、より大きな頭部をもつスパインはより強いシナプス結合をつくることが示唆された。従って機能の変化が形態の変化として脳に書き込まれていると考えられる。このことは逆に、形態の変化を系統的に追うことで機能の変化を推測できることも意味している。人工的な刺激を単一スパインに与えたときに、機能変化に対応してスパイン形態が変化するという報告はあるが、自然の神経ネットワークにおいて長い期間の中で活動依存的なスパインの形態変化が起きているのか、起きているとすればどのような特徴があるのか、については未だ不明である。

また近年、2光子励起顕微鏡を用いて生きた動物の樹状突起スパインを観察することが可能となってきた。しかしながら、多くのものが顕微鏡の分解能以下の大きさである樹状突起スパインの形態変化をこの実験系で定量的に調べるには、未だ困難な点が多い。また、長期間試薬を安定して作用させるのは非常に難しい。

そこで私は、スライス培養細胞を用いて同一の樹状突起を長期間繰り返し観察する方法を開発した。スライス培養細胞では生きた動物の組織の構造が基本的に保たれており、細胞の性質、形態が生きた動物のそれらとよく対応することが知られている。また、より高い開口数の対物レンズを使用することができ、静止した状態で厳密に、より詳細にスパインの形態を観察することが可能である。さらに、試薬を長期間安定して作用させることが非常に容易である。私はこの方法により、長期的なスパイン形態の変化を初めて定量的に

詳細に解析した。

実験方法

ラット大脳より海馬を取り出し、スライス培養細胞を作成した。小さな穴の開いた膜の上で6日程度培養した後、ジーンガンにより GFP タンパクの遺伝子導入を行った。その後4日程度培養し、初回の観察を行った。

膜の上にスライス培養細胞をのせたまま記録チャンバーに移し、正立顕微鏡の対物レンズ下まで運んだ。ろ過滅菌した人工脳脊髄液を還流しながら観察した。還流に用いるチューブ等は高温加圧滅菌し、チャンバー等はエタノール、および紫外線で殺菌するなど、細胞を雑菌に感染させないよう様々な注意を払った。観察後、細胞はもとの培地が入ったもとの容器に戻し、再び培養した。数日後、同じ操作により細胞を観察した。薬理作用を見る実験では、初回の観察後細胞をもとの容器へ戻す前に、もとの培地に目的の最終濃度となるよう試薬を加えた。数日経過しても樹状突起の枝分かれの形は変わらなかったため、樹状突起の枝分かれの形を見ることで前回観察した樹状突起の位置を探し出した。

蛍光観察には2光子励起法を用いた。この方法により、組織の深部で細胞障害の程度を抑えて蛍光観察をすることができる。励起波長は955nmを用いた。蛍光は光電子増倍管にとりこんだ。z軸方向に0.5 μ mごとに17-25枚xy画像を取得した。3次元画像再構築のために、各ピクセルでこれらの画像の蛍光値を合計することでスタック（重ね合わせ）をした。

結果、および考察

通常の培養条件下では、スパイク活動が起きていて細胞が盛んに活動していることが知られている。はじめにこの条件でスパインの形態が長期的にどのように変化するかについて検討した。

繰り返し同一の樹状突起を観察した画像を比較すると、大きなスパインは比較的同じ大きさで同じ位置に存在する傾向があるが、比較的小さなスパインは頭部がよく増大、縮小するか、もしくは消滅する傾向があることがわかった。スパインの頭部体積を算出し、数日後の体積をはじめの体積で割った値、すなわち比(%)で体積変化を表した。はじめの頭部体積に対してこの比をプロットすると、小さなスパインでよく増大、もしくは消滅する傾向があることがわかった。

次に、長期増強、長期抑圧等の神経可塑性を引き起こす上での主要な因子である NMDA 受容体の阻害剤を長期間作用させた場合、スパインの形態変化にどのような影響が及ぼされるかについて検討した。上と同様に繰り返し同一の樹状突起を観察した画像を比較すると、特に比較的小さなスパインでその頭部体積の変化を非常に強く抑制することがわかつ

た。上と同様にはじめの頭部体積に対する体積変化を比(%)で表すと、この傾向はよりあらわとなった。また、NMDA 受容体の阻害剤のみでなく、活動電位の発生を阻害する TTX を加えても同様の結果となった。

スパインの形態変化の特徴をより詳細に調べるため、数日後の体積からはじめの体積を差し引いた値、すなわち差($v = V_3 - V_0$)として体積変化を表した。はじめの頭部体積に対してこの差をプロットすると、通常の培養条件下では、体積が $0.1\mu\text{m}^3$ 以下の small spine で大きくなるものが多く、体積が $0.1-0.2\mu\text{m}^3$ の middle spine および $0.2-0.3\mu\text{m}^3$ の large spine では体積が減少するものが多く、さらに大きい体積が $0.3\mu\text{m}^3$ 以上の giant spine では顕著な体積減少が見られない傾向があることがわかった。一方、NMDA 受容体阻害剤存在下では体積変化が増大、もしくは減少のどちらかに偏るような傾向は見られなかった。

次に階級分けを行い、スパインの頭部体積変化を差の平均値(\bar{v})、もしくは差の2乗の平均値(\bar{v}^2)でプロットした。差の2乗の平均値で見ると、体積が比較的小さい部分では通常の培養条件下(コントロール)とNMDA 受容体阻害剤存在下で大きな差があるが、体積が大きくなると差は有意ではなくなった。このことから、NMDA 受容体を介した活動は体積が小さいスパインで大きな役割を果たしていると考えられる。

差の平均値で見ると、はじめの頭部体積が $0.1-0.3\mu\text{m}^3$ の部分で有意に0から小さかった。一方、NMDA 受容体阻害剤存在下では差の平均値ははじめの頭部体積に関わらず一定で、0からほとんど変わらなかった。このことからNMDA 受容体を介した活動は middle spine、および large spine の縮小に大きな役割を果たすと考えられる。

NMDA 受容体阻害剤存在下で強く形態可塑性が抑制されるものの、形態変化はある程度残る。はじめの頭部体積が $0.15-0.3\mu\text{m}^3$ のスパインの毎日の体積変化を見てみると、NMDA 受容体阻害剤存在下の方が体積が $0.3\mu\text{m}^3$ を超えてくるスパインの割合は大きい。NMDA 受容体非依存的な可塑性は、middle spine、および large spine を giant spine に変えることができると考えられる。

giant spine では差の平均値においても差の2乗の平均値においてもコントロールとNMDA 受容体阻害剤存在下とで有意に差がないことから、giant spine はNMDA 受容体を介した活動の影響をあまり受けないと考えられる。

スパインが消滅する割合と新生する割合を測定したところ、NMDA 受容体阻害剤存在下ではコントロールと比べて消滅する割合は大きく減少するが、新生する割合はあまり変わらないことがわかった。NMDA 受容体阻害剤は全ての変化を抑制するのではなく、抑制する部分と抑制されない部分、NMDA 受容体依存的な可塑性とNMDA 受容体非依存的な可塑性の両方が存在することがより明らかとなった。

NMDA 受容体阻害剤は、スパイン形態の分布に対しても有意に影響を与えた。small spine、giant spine の割合はコントロールと比較して増大し、頭部体積が $0.1-0.3\mu\text{m}^3$ のスパイン (middle spine、large spine) の割合は減少した。

通常の培養条件下では、スパインの形態はその頭部体積に依存してダイナミックに変化していることがわかった。この現象は、NMDA 受容体の阻害剤を加えることでよりはっきりとした。スライス培養細胞と生きた動物の細胞の性質、形態がよく対応すると言われていることから、この変化は自然の状態におけるスパインダイナミクスを表していると考えられる。また、NMDA 受容体を阻害した場合でも、抑制されない部分が存在し、形態変化は残る。さらに TTX を加えて活動電位の発生を阻害し、細胞の活動を強く抑えても同様の形態変化が残る傾向がある。NMDA 受容体依存的な可塑性と合わせてこの NMDA 受容体非依存的な可塑性も理解することが記憶のメカニズムを知る上で必要であろう。