

論文審査の結果の要旨

氏名 安松 信明

脳神経系において、シナプス伝達の効率が変化するという現象が知られている。この現象を含む、脳が新たな刺激に対して柔軟に対処する現象は総称して神経可塑性と呼ばれている。このシナプス伝達効率が変化する現象は細胞レベルでの記憶、学習のモデルとされている。一方で、樹状突起スパインは錐体神経細胞上の主要な興奮性シナプス入力部位である。近年の研究で、スパインの頭部体積とシナプス伝達効率が相関することが示唆されている。従ってスパインの形態を観察することでシナプス伝達効率の変化を推測することが可能であると考えられる。過去に人工的な刺激によりスパインの形態が変化し、これに伴いシナプス伝達効率が変化するという現象が報告されているが、自然の状態では活動依存的なスパインの形態変化が起きているかは不明である。

そこで、論文提出者はスライス培養細胞を用いて同一の樹状突起スパインを一週間繰り返し観察する方法を開発した。ラット海馬スライス培養細胞を作成した後、ジーンガンにより GFP 蛍光タンパクの遺伝子導入を行った。発現した細胞を 2 光子励起法により蛍光観察することでスパインの形態観察を行った。正立顕微鏡を用い、人工脳脊髄液で還流しながら樹状突起スパインの観察を行った。観察後、細胞はもとの培地が入った容器に戻し、再び培養した。数日後、初回に観察したものと同一の樹状突起を探し出し、観察した。観察時に細胞が雑菌に感染すると問題となるため、感染させないよう様々な工夫をした。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。スパインの頭部体積の算出では、まず一つの画像中で最も大きくて丸いスパインを選び、デコンボリューションの考え方から直径、および体積を求めた。次にスパインの頭部体積がスパイン頭部全体の蛍光値に比例するとし、頭部体積を算出した。

論文提出者はまず活動が盛んな通常の培養条件下でのスパイン形態変化を測定した。数日間隔で取得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存在する傾向があるが、比較的小さなスパインは頭部体積がよく増大、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。数日後の体積をはじめの体積で割った値、すなわち比 (%) で体積変化を検討した。はじめの頭部体積に対してこの比をプロットすると、小さい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、神経可塑性を引き起こす上での主要な因子である NMDA 受容体の阻害剤を作

用させた場合に、スパインの形態変化がどのような影響を受けるかについて検討した。数日間隔で取得した画像を比較すると、特に比較的小さい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った。上と同様にはじめの頭部体積に対する体積変化を比(%)でプロットすると、この傾向はよりあらわとなった。NMDA 受容体の阻害剤に加えて、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、3日後の体積(V_3)からはじめの体積(V_0)を差し引いた値、すなわち差($v = V_3 - V_0$)の値として体積変化を表した。はじめに、体積の絶対的な変化の大きさを差の2乗の平均値(\bar{v}^2)で表わし、はじめの体積に対してプロットしてその体積依存性について検討した。ここで階級分けを行い、 $0-0.1\mu\text{m}^3$ のスパインを small spine、 $0.1-0.2\mu\text{m}^3$ を middle spine、 $0.2-0.3\mu\text{m}^3$ を large spine、 $0.3\mu\text{m}^3$ 以上を giant spine とした。体積が小さい small spine、middle spine では通常の培養条件下(コントロール)と NMDA 受容体阻害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。

次に、体積が増大したか減少したかの変化の方向性を含んだ大きさを差の平均値(\bar{v})で表わし、その体積依存性について上と同様に検討した。通常の培養条件下では、中間あたりの大きさの middle spine、large spine で有意に減少していた。一方、NMDA 受容体阻害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 受容体阻害下でも形態変化はある程度残った。はじめの頭部体積が $0.15-0.3\mu\text{m}^3$ のスパインの日ごとの体積変化について検討すると、NMDA 受容体阻害下の方が体積が $0.3\mu\text{m}^3$ を超えて大きくなるスパインの割合が大きかった。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。また、スパインが消滅する割合と新生する割合を測定すると、NMDA 受容体阻害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かった。NMDA 受容体を阻害することで抑制される部分と抑制されない部分が存在し、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。また NMDA 受容体を阻害することで、スパイン形態の分布は有意に影響を受けた。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。

以上の結果から、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。この発見は、神経可塑性の主要因子である NMDA 受容体を阻害した状態と比較することで支持された。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、形態変化は残った。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を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ると考えられる。本研究が明らかにしたスパインダイナミクス、および NMDA 受容体非依存的な可塑性は、記憶の機構の解明に大きく貢献するものである。

この論文は、松崎政紀博士、河西春郎教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、提出者の寄与が十分であると認められる。従って審査員一同は同提出者に博士(理学)の学位を授与出来ると判断する。