

論文の内容の要旨

論文題目

発達期の小脳プルキンエ細胞におけるカルシウム放出とシナプス可塑性の解析

指導教員 御子柴克彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

後藤純一

【序論】

細胞内カルシウム上昇をカルシウムの供給源の観点から分類すると、細胞外から形質膜上のカルシウムチャネルを介して供給されるカルシウム流入と、細胞内に存在する小胞体などのカルシウムストアから小胞体膜上のチャネルなどを介するカルシウム放出の 2 種類がある。

小脳プルキンエ細胞は小胞体上に非常に多くのイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (IP₃受容体) を発現し、シナプス刺激によって明瞭な細胞内カルシウム放出が見られる。プルキンエ細胞におけるカルシウム放出は、平行線維-プルキ

ンエ細胞間シナプスの長期抑圧 (long-term depression; LTD) に必要である。小脳 LTD は運動学習の基盤であると考えられており、このことからもプルキンエ細胞におけるカルシウム放出は運動学習機能において重要な役割を担っていると言える。本研究ではプルキンエ細胞樹状突起におけるカルシウムシグナル、特にカルシウム放出に注目し、生後発達過程における変化を調べた。

刺激は平行線維のバースト刺激 (50 Hz の頻度で 5 回) を用いた。この刺激を用いることで、細胞外からのカルシウム流入と細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を時間的に分離して観測できることが知られている (Finch and Augustine, 1998; Takechi et al., 1998)。

また、後シナプスでのカルシウム上昇はシナプス可塑性の成立に極めて重要な役割を果たしているが、可塑性の誘導刺激時におけるカルシウム上昇を測定し、同一の細胞においてシナプス効率の変化と直接比較した研究はこれまでほとんどなかった。ラット小脳スライスを用いた実験では、本研究で用いたのと同じバースト刺激を反復することで LTD が誘導されることが知られていたので (Eilers et al., 1997)、この刺激条件を用いて LTD 誘導時のカルシウム上昇と誘導される LTD の確実性・大きさを同一の細胞において初めて直接比較した。

【材料と方法】

マウス小脳急性スライスを用い、プルキンエ細胞の細胞体からパッチクランプを行った。ACSF 溶液 (124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 20 mM D-glucose, 26 mM NaHCO₃, 10 μM bicuculline

methochloride, 95% O₂ / 5% CO₂ 混合ガスで飽和) で記録チャンバー内を灌流しながら、全細胞記録モードで細胞内にカルシウム感受性色素 (bis-fura-2) を含んだ電極内液 (140 mM KCl, 10 mM Hepes, 4 mM NaCl, 4 mM MgATP, 4 mM NaGTP, 0.2 mM bis-fura-2; pH 7.3) を導入し、電気記録と同時にカルシウムイメージングを行った。

シナプス刺激にはスライス表面に置いたガラス電極を使用し、平行線維を刺激した。

カルシウムイメージングは対物レンズからの落射照明で励起光を照射し、樹状突起における蛍光強度変化を CCD カメラで記録することで行った。

カルシウムイメージング実験では電位固定モードで実験を行った。

LTD 及び STP (short-term potentiation) の実験では電流固定モードで平行線維を単発刺激することで興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential; EPSP) を記録し、可塑性誘導刺激時のカルシウムイメージングの実験と同様に電位固定モードで刺激を行った。シナプス効率の変化は EPSP 強度の変化で表した。

【結果】

(1) カルシウム放出の生後発達に伴う変化

(1-1) 平行線維のバースト刺激 (50 Hz の頻度で 5 回) によって誘導されるカルシウム上昇は、カルシウム流入によって構成される早いピークとそれに続くカルシウム放出によって主に構成される遅いピークからなる (Finch and Augustine, 1998; Takechi et al., 1998)。マウスの週齢を様々に変えて実験を行うと、

2 週齢前後の幼若な時期では遅いピークが早いピークに対して相対的に大きく、
4 週齢以降の小脳皮質が比較的成熟した時期では遅いピークは小さいことが分
かった。

(1-2) 薬理学実験によって細胞外からのカルシウム流入と細胞内カルシウムス
トアからのカルシウム放出を区別することを試みた。代謝型グルタミン酸受容
体 (mGluR) のアンタゴニストである MCPG (1 mM) を投与することでカルシ
ウム放出による遅いピークは消失した。MCPG 投与前後のカルシウムパターン
を比較することでカルシウム流入とカルシウム放出を分離して調べた結果、カ
ルシウム放出は幼若期のプルキンエ細胞では高く、より成長した細胞では低い
ことが示された。

(2) 平行線維のバースト刺激で誘導される LTD

(2-1) 幼若期である 2 週齢では、平行線維バースト刺激の反復 (50 Hz 5 回を 1
秒毎に 10 回反復) によって平行線維-プルキンエ細胞間シナプスに LTD が見ら
れたが、より成長した 4 週齢では LTD が誘導されなかった。

さらに 2 週齢においては LTD の大きさには細胞ごとに差異があり、LTD の大
きさはカルシウム放出の相対的な活性 (カルシウム放出の大きさをカルシウム
流入の大きさで正規化した値) と有意な相関を示した。

(2-2) マウス 1 型 IP₃受容体の機能を阻害するモノクローナル抗体 18A10 をパ
ッチ電極から細胞内に注入した所、カルシウム放出は減弱した。また、18A10
導入によって LTD 誘導が阻害された。すなわち、バースト刺激による LTD は古
典的な平行線維と登上線維の組み合わせ刺激による LTD と同様、その誘導はカ

ルシウム放出に依存していることが示唆された。

(3) 平行線維のバースト刺激で誘導される STP

(3-1) バースト刺激の反復回数を増やすと (50 Hz 5 回を 90 回反復)、2 週齢小脳スライス中の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいて、著明な短期増強 (short-term potentiation; STP) が観測された。

(3-2) STP 誘導によって Paired-pulse facilitation ratio (PPF 比) は刺激直後に上昇し、およそ 20 分間かけてゆっくりと刺激前の値に戻った。これはシナプス効率 (EPSP の大きさ) の変化と同様の経過であり、STP の発現が前シナプス性に起こっていることを示唆している。

(3-3) この STP はプルキンエ細胞への BAPTA 導入によっても阻害されないこと、及び P/Q 型カルシウムチャネルノックアウトマウスにおいても野生型と同様に観測されることから、後シナプスのカルシウム上昇に依存しないことが分かった。

この結果と上記の PPF 実験から、バースト刺激による STP が前シナプス性に発現されることが強く示唆された。

【考察】

本研究から以下のことが明らかにされた。

(1) プルキンエ細胞樹状突起において平行線維のバースト刺激で誘導されるカルシウム放出は、幼若期 (2 週齢前後) では大きく、成長とともに低下する。

(2-1) カルシウム放出が大きい 2 週齢前後では、バースト刺激の反復によって

平行線維-プルキンエ細胞間シナプスに LTD が誘導された。一方、カルシウム放出が小さい 4 週齢では LTD は見られなかった。

(2-2) LTD の計測と誘導刺激時のカルシウム上昇の計測を初めて同一の細胞において行い、直接比較した。その結果、2 週齢における LTD の大きさはカルシウム放出の活性と有意な相関を示した。

(3) 平行線維バースト刺激の反復回数を増やすと、前シナプス性の STP が誘導された。このシナプスにおいて、LTD のような長期の可塑性と PPF のような非常に短期の可塑性の間に位置する長さを持つ可塑性を初めて明らかにした。

本研究で用いた刺激条件の範囲内では、生後 2 週齢以降はカルシウム流入に見かけ上、大きな変化は見られなかった。すなわち、樹状突起内のカルシウムシグナルに占めるカルシウム放出の寄与は幼若期に大きく、成長に伴って低下する。バースト刺激を反復することで、幼若期では LTD が誘導され、より成熟した時期では誘導されないことから、幼若期の大きなカルシウム放出活性は小脳皮質の発達、回路網やシナプスの形成・制御などに重要な役割を果たしていることが示唆された。

成熟した平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの LTD 誘導によく用いられる平行線維と登上線維の同時刺激とは異なり、平行線維バースト刺激を 60-120 回反復することでも LTD が誘導され得ることが示されていた (Eilers et al., 1997)。本研究では、幼若期においては 10 回の反復でも LTD が起こることから、このもう一つの LTD 誘導経路が幼若期においては活発に機能していることを示した。また、カルシウム放出活性と LTD の大きさが相関することから、幼若期の高い

カルシウム放出活性がこの時期のシナプス可塑性により大きな役割を果たしている可能性が示唆された。このバースト刺激による LTD 誘導の経路は、2 週齢前後的小脳皮質における活発な神経回路の成長を支える重要な機構の一つである可能性が考えられる。

このバースト刺激のタイミングは、感覚刺激によって誘起される生体内での平行線維の発火パターンと類似しており、実際にこのような可塑性が生体内で起こりうる可能性がある。また、このバースト刺激の反復回数を増やすと STP が前シナプス性に誘導されることは、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスはバースト刺激によって重層的に制御されていることを示している。

本研究で明らかにしたカルシウム放出活性の生後変化に関する知見は、今後の研究において、小脳皮質における回路網の形成や調節、樹状突起や棘突起の形態変化などへのカルシウムシグナルの関わりを知るための重要な基礎となり得る。また、誘導刺激時のカルシウム上昇と LTD の大きさの関係を示したこと、及びバースト刺激の反復回数の違いによって持続時間の異なる複数の可塑性が誘導されることを示したことは、今後のシナプス可塑性の研究にとって重要な知見である。