

## 論文の内容の要旨

論文題目        **Roles for nociceptin in synaptic transmission and plasticity in the CA1 region of the hippocampus**  
海馬 CA1 領域でのシナプス伝達及び可塑性における  
ノシセプチンの役割

指導教員    真鍋俊也教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 15 年 4 月入学  
医学博士課程  
脳神経医学専攻  
ボンバンパーパックディー    サクナン  
**Bongsebandhu-phubhakdi Saknan**

中枢神経系の海馬は、記憶と学習において中心的な役割を果たしている。海馬における興奮性シナプス伝達の長期増強（LTP）はシナプス可塑性の一つであり、細胞レベルでの記憶形成モデルであると考えられている。記憶の形成機構を理解するためには、LTP に伴って海馬内の神経活動がどのように変化するか、また、どのような機構によりその変化がもたらされるかを明らかにすることが重要である。

所属研究室では、神経ペプチドであるノシセプチンが海馬に豊富に存在し、海馬 CA1 領域の LTP と個体レベルの学習能力に対して抑制的な作用があることをノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスの解析によって明らかにした。ノシセプチン受容体はオピオイド受容体の塩基配列をベースに新規オピオイド様オーファン受容体としてクローニングされたが、典型的なオピオイド・リガンドに対する親和性が極めて低かった。その後、この受容体の内在性リガンドはノシセプチンという神経ペプチドであり、これまでのオピオイド受容体に全く効果を示さ

ず逆に痛覚のシグナルを増幅することが明らかになっている。ノシセプチンは 17 残基のペプチドから成り、他のオピオイド・リガンドの特徴的な構造である N 末のチロシン残基が欠落している。ノシセプチンとその前駆体は海馬を含む中枢神経系に広く発現しており、ノシセプチン受容体も海馬の錐体細胞や介在ニューロンに多く発現している。これにより内在性ノシセプチンは海馬内の興奮性シナプス伝達及び可塑性を制御する可能性が示され、その機構の解明が望まれていた。

以前の研究で、ノシセプチンは海馬培養ニューロンにおいて  $\text{Ca}^{2+}$  電流を抑制し、G タンパク活性型内向き整流性  $\text{K}^+$  チャンネル (GIRK) を介して過分極電流を引き起こすことが報告された。また、「ノシセプチンは海馬 Schaffer 側枝—CA1 の回路においてシナプス伝達と可塑性を抑制する」と結論付けた報告がある。ただ、当時ノシセプチン受容体に対して特異性の高いアンタゴニストが無かったため、その抑制効果がノシセプチン受容体を介したものであるかどうかは不明である。

上述のように、所属研究室ではノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスと野生型マウスの比較実験を行い、海馬 CA1 錐体細胞における LTP の増大と個体レベルにおける学習能力の向上を示した。ところが、ノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスと野生型マウスでは基本的なシナプス伝達、シナプス前終末からの神経伝達物質の放出、シナプス後細胞の神経伝達物質に対する感受性のいずれにおいても有意差が認められなかった。ノシセプチン受容体は基本的なシナプスの性質に影響を及ぼすことなく LTP 形成において抑制的な役割を果たしていることが明らかになった。そこで、ノシセプチンによる制御機構の詳細を明らかにするという課題が残った。

以上の研究背景と課題を踏まえ、本研究ではノシセプチンによる海馬シナプス伝達の制御機構と記憶形成におけるノシセプチンの役割を解明することを目指した。以前、ノシセプチンの投与により海馬の錐体細胞が GIRK を介して過分極電流を引き起こすことが報告された。

したがって、海馬 CA1 領域ではシナプス前終末から内在性のノシセプチンの放出が起こり、CA1 錐体細胞に作用してシナプス可塑性に影響を与える可能性がある。本研究では、ノシセプチン受容体のアンタゴニストを適切に使用しながら、主に電気生理学的な手法によりこの可能性を検討し、シナプス伝達と可塑性における内在性ノシセプチンの役割を明らかにすることができた。

まず、シナプス伝達と可塑性に対するノシセプチンの役割を検討するために、成熟マウスより海馬スライスを作製し、細胞外電位記録法により CA1 領域の放線状層において興奮性シナプス後電位 (EPSP) を記録した。0.1 Hz でシャプファー側枝を電気刺激して誘発される EPSP がノシセプチンやノシセプチン受容体のアンタゴニスト (UFP-101) の投与により変化するかどうかを観察した。その結果、ノシセプチンと UFP-101 投与では、EPSP に影響がないことを見出した。また、ノシセプチンや UFP-101 存在下に高頻度刺激 (100Hz、1 秒) を与え、LTP に対する効果を観察した。その結果、ノシセプチン存在下で LTP は変化しなかったが、UFP-101 存在下では LTP が亢進することが明らかとなった。

次に、CA1 錐体細胞の興奮性に対するノシセプチンの役割を検討するため、細胞外電位記録法により CA1 領域の細胞体層において集合電位を記録した。ノシセプチン投与により CA1 錐体細胞の集合電位が抑制された。この抑制は UFP-101 存在下で消失するため、ノシセプチン受容体を介した効果である。これらの結果により、内在性ノシセプチンは CA1 錐体細胞の興奮性を抑制し、シナプス可塑性に影響を与えることが明らかになった。

さらに、ノシセプチンの作用機構を検討した。免疫組織化学を用いた研究により、ノシセプチンは CA1 領域の放線状層の介在ニューロンに多く存在することが知られている。介在ニューロンが活動電位を発生すると、シナプス前終末から GABA を放出する。ここでは、AMPA

受容体及び NMDA 受容体のアンタゴニスト存在下に放線状層に刺激電極を置き、錐体細胞に GABA 性シナプス結合をする介在ニューロンを電気刺激した。そして、ホールセル・ボルテージクランプ記録法により錐体細胞で誘発される GABA<sub>A</sub> 性と GABA<sub>B</sub> 性の抑制性シナプス電流に対するノシセプチンや UFP-101 投与の効果を記録した。その結果、GABA<sub>A</sub> 性のシナプス電流は抑制を受けなかったが、GABA<sub>B</sub> 性のシナプス電流はノシセプチン投与により抑制されることを見出した。この抑制は UFP-101 存在下で消失するため、ノシセプチン受容体を介した効果であることを確認した。これらの結果は、ノシセプチンが GABA<sub>B</sub> 受容体と同じ GIRK チャンネルに作用することを示唆する。

さらに、CA1 領域における内在性ノシセプチンの放出の可能性を検討した。ここでは、ホールセル・ボルテージクランプ記録法により CA1 錐体細胞から膜電流記録した。CA1 錐体細胞を -70 mV に電位固定し、グルタミン酸受容体及び GABA 受容体アンタゴニスト存在下に高頻度刺激を与えると、膜電流の変化を観察することができた。この膜電流の変化は UFP-101 により抑制されたので、ノシセプチン受容体活性化によるものであることが確認できた。また、この膜電流の変化はエンケファリン ( $\mu, \delta$ -オピオイド受容体アンタゴニストで、介在ニューロンの働きを抑制することが知られている試薬) によっても抑制を示した。これらの結果は、CA1 領域における内在性ノシセプチンは介在ニューロンより放出される可能性を示すものである。

本研究の結果により、(1) 内在性ノシセプチンによって活性化したノシセプチン受容体はシナプス後細胞の GIRK チャンネルを活性化させる。(2) これにより、内在性ノシセプチンは LTP を抑制的に調節することが明らかとなった。さらに、(3) 高頻度刺激で活性化した CA1 領域の介在ニューロンから内在性ノシセプチンが放出される可能性を示すことができた。