

論文の内容の要旨

*Modulation of Locus Coeruleus on Hippocampal
CA3 Synaptic Transmission*

論文題目：(青斑核による海馬 CA3 野シナプス伝達の調節)

氏 名：張 寧

海馬 CA3 野は海馬が担っている記憶・学習などの脳高次機能にユニークかつ重要な役割を果たしている。大脳皮質嗅内野から海馬 CA3 野への入力には 2 つの経路がある。古典的な海馬 trisynaptic 回路論では、歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維を経由して、CA3 野錐体細胞の近位樹状突起への間接投射であるが、貫通線維 (perforant path, PP) から遠位樹状突起への直接投射もある。歯状回からの入力を切断しても CA3 野錐体細胞の一定の場所だけ発火する性質は阻害されない、つまり、皮質からの場所情報を正常に coding されていることが報告され、嗅内皮質から海馬 CA3 野への直接投射経路の重要性が示唆された。しかし、この神経経路の生理的な性質や機能はまだ十分に解明されていない。

青斑核は脳幹に位置するノルアドレナリン神経の起始核で、人では 10,000~15,000、ラットではおよそ 1,500 個のニューロンからなり、脳の覚醒や不安などに深く関与していると考えられてきたが、脳の高次機能における役割はまだ明らかにされていない。海馬へのノルアドレナリン神経投射はほとんど青斑核由来であり、免疫染色法で歯状回門 (dentate hilus) や明瞭層 (*stratum lucidum*)、網状分子層 (*stratum lacunosum-moleculare*, SLM) にノルアドレナリン神経終末は数多く存在することがすでに分かっており、海馬機能を調節していることが推測される。海馬機能が情動に関与する扁桃体の活動により調節されていることは当教室の研究などで明らかにされつつあるが、青斑核による調節についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では麻酔下ラットを用い、まず、PP 経由の嗅内野皮質から海馬 CA3 野への単シナプス伝達を *in vivo* で記録し、当経路の可塑性などの性質について調べた。そして、青斑核興奮による海馬 CA3 野シナプス伝達や可塑性への影響、及びそのメカニズムについて解析を行った。

【方法と結果】

雄の SD ラット (340~440 g) をウレタン麻酔し、PP を刺激して、海馬 CA3 野より誘発集合シナプ

ス電位 (fEPSP) を記録した。また同時に青斑核にグルタミン酸を局所注入し、PP-CA3 シナプス伝達に対する影響を検討した。

1. PP 刺激による海馬 CA3 野誘発シナプス電位のプロフィールおよびその電流源密度解析

*in vivo*における PP-CA3 野シナプス電位の解析した研究は少ないので、まずそのプロフィールを明らかにした。PP を刺激し、海馬アンモン角 (海馬 CA1 から CA3 野の総称) 層に対して垂直に記録電極を移動して細胞外電位を記録し、電流源密度解析法を使い、シナプス電位の発生源を求めた。PP 刺激による電流吸い込み (sink) は網状分子層に、電流湧き出し (source) は CA3 錐体細胞層 (*stratum pyramidale*, SP) に観察された (Fig.1)。

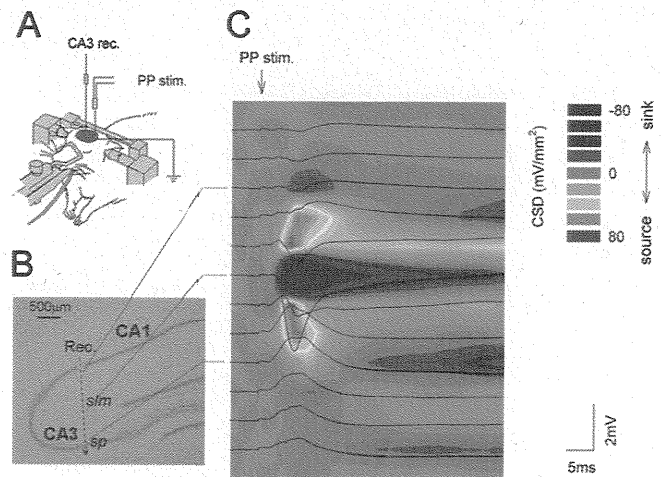


Fig.1 PP 刺激による海馬 CA3 野誘発電位の電流源密度解析

シナプス結合部位は sink の観察された部位、すなわち網状分子層であることが分かった。そして sink や source の潜時は 2-3 ms という短い時間であることから、単シナプス応答であることが推測された。

2. PP-CA3 経路における両方向性のシナプス可塑性

PP を単発刺激すると網状分子層で下向きの fEPSP を記録できた。PP に 200Hz 10 発の高頻度刺激

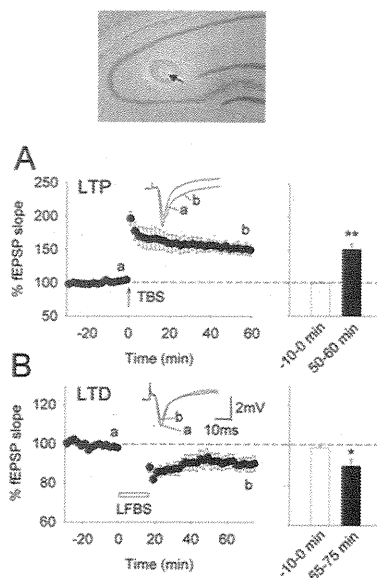


Fig.2 網状分子層で記録した fEPSP の両方向性可塑性

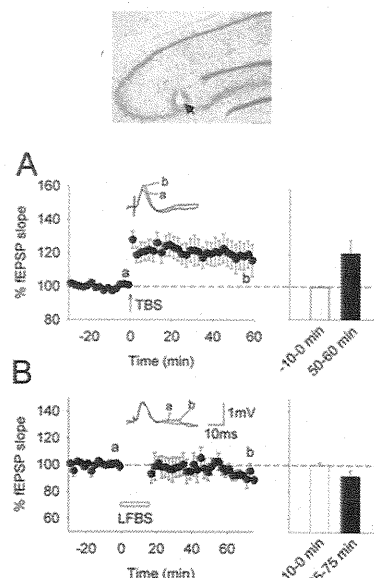


Fig.3 錐体細胞層で記録した fEPSP の LTP

を 5Hz で 5 回与える θ バースト刺激 (TBS) を 4 回繰り返すと、PP-CA3 シナプス伝達に長期増強 (LTP) が誘導された (Fig.2A)。同様に、1Hz 900 発の低頻度バースト刺激 (LFBS) を PP に与えると、PP-CA3 シナプス伝達が長期に減少する

LTD が誘導された (Fig.2B)。本研究は *in vivo* で PP-CA3 経路の両方向性のシナプス可塑性を初めて示したものである。次に CA3 錐体細胞層で上向きの fEPSP を記録した。400Hz の強い TBS を与えても、わずかな LTP が誘導されるだけで (Fig.3A)、LTD は誘導されなかった (Fig.3B)。短期可塑性 (short-term plasticity, STP) について検討も行った。入力線維を数 10ms~数 100ms の間隔で 2 回刺激すると、2 発目のシナプス応答が 1 発目に比べて大きくなる paired-pulse facilitation (PPF)、小さくなる paired-pulse depression (PPD) という短期可塑性が見られる。この短期可塑性はシナプス前終末からの伝達物質放出確率の変化に依存する現象であるとされている。PP-CA3 シナプスにおいては網状分子層にて 150ms 間隔以下で PPF が観察され、150ms 間隔以上で PPD が観察されたが、錐体細胞層にて PPF が観察されず、PPD しか観察されなかった。

これらの結果からシナプス部位とシナプスを離れた部位で記録した fEPSP の性質が異なることが示唆された。したがって、従来の多くの研究でなされてきた細胞体部位での記録はシナプス伝達の大事な性質が検出できていない恐れがあり、本研究で初めて行ったシナプス近傍での記録はより正確にシナプス伝達の性質を反映していると考えられる。以降の研究では網状分子層にて記録電極を置き、PP-CA3 シナプス伝達を記録し、青斑核の調節作用を観察した。

3. 青斑核 (LC) 活性化による PP-CA3 シナプス伝達の調節

グルタミン酸 (Glu) を LC に局所投与すると LC ニューロンの phasic の発火を引き起こすことがすでに報告され、そこで LC を興奮させるため Glu を選んだ。まず、グルタミン酸注入により LC が活性化されることを確認した。LC に Glu 注入 2 時間後に神経活動の指標であると考えられている c-Fos 発現を解析した。その結果、Glu 注入群において LC で多くの c-Fos 発現細胞が観察され、LC が活性化されたことが認められた。

LC に Glu 50 nmol を局所注入すると PP-CA3 シナプス伝達がすぐに増大し (Fig.4A,

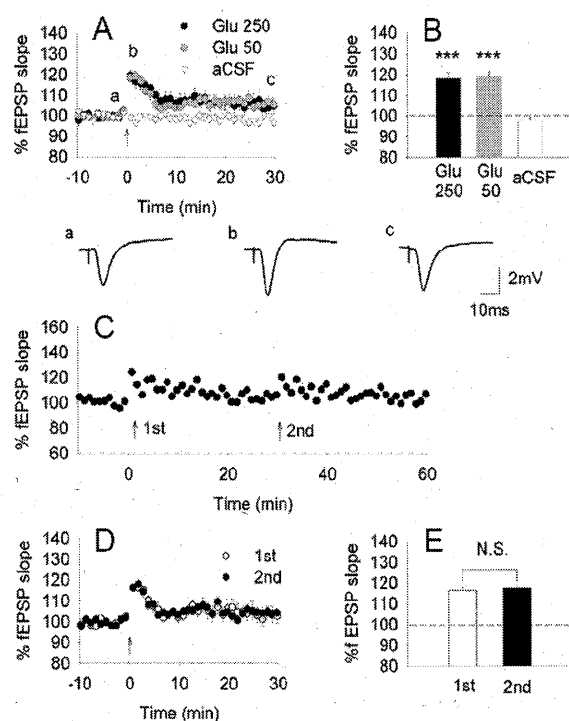


Fig.4 LCにGlu注入することによるPP-CA3シナプス伝達への影響

4B)、その後徐々に元に戻った。250 nmol に用量を上げて大きさが変わらず、30 分以上の間隔をおいた 50 nmol の反復投与が同程度の増強を誘発したので (Fig.4C、D、E)、以後の実験では 50 nmol を用いた。

LC 活性化によるシナプス伝達増大のメカニズムを薬理的に解析した。まず、 β -アドレナリン受容体拮抗薬であるプロプラノロール

(Prop.) やチモロール (Tim.)、そして、 α -アドレナリン受容体拮抗薬であるフェントラミン (Phent.) を脳室内投与した。これらの薬物はいずれも LC 活性化による PP-CA3 シナプスの増強を有意に減少させた (Fig.5 左)。そして、ノルアドレナリン神経毒の一つである 6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA) を記録電極に貼り付けているカニューレにより、記録部位すなわち網状分子層に局所注入し、LC 活性化による PP-CA3 シナプス伝達増大の影響について調べた。6-OHDA 局所投与により、LC 活性化による PP-CA3 シナプス伝達の増大が有意に抑制された (Fig.5 右)。これらの結果から LC 活性化によるノルアドレナリンの放出、特にシナプス近傍への放出は PP-CA3 伝達の増強に関与している可能性が示唆された。

4. LC 活性化による PP-CA3 シナプス可塑性への影響

LC に aCSF あるいは Glu 50 μ mol を局所注入し、すぐに 200Hz 10 発の高頻度刺激を 5Hz で 5 回繰り返す TBS を 4 回 PP に与えて LTP を誘導した。LC 活性化による LTP への影響は観察されなかった。1Hz 900 発の LFBS を PP に与えて LTD を誘導した。Glu 群は刺激後 30 分以内の early phase において LTD を抑制する傾向があったが、30~60 分の late phase においては LTD を抑制しなかった。そして、10Hz 900 発 LFBS を PP に与えた場合、0~30 分の early phase で Glu 群は aCSF 群より大きな potentiation が観察されたが、late phase では両方の差が認められなかった。従って、PP-CA3 シナプスに誘発した強い可塑性に対しては LC 活動の影響は小さいものの、弱い LTP の early phase において、促進作用が観察された。青斑核活性化の PP-CA3 シナプス可塑性の early phase における作用は、青斑

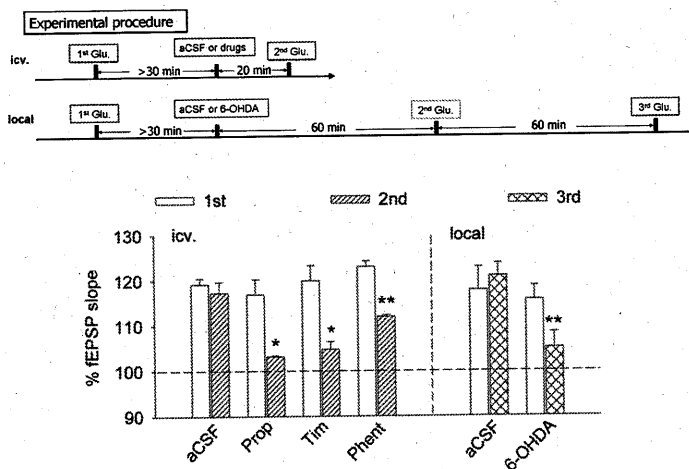


Fig.5 α 、 β -アドレナリン拮抗薬脳室内投与、およびノルアドレナリン神経毒海馬局所投与による、LC 興奮による PP-CA3 シナプス伝達の増強の阻害

核活性化の PP-CA3 伝達一過性増強作用の加算によるものと推測された。

5. PP-CA3 シナプス長期可塑性を誘導した後に LC 活性化による PP-CA3 伝達への影響

TBS を PP に与え、60 分後に 50 μmol Glu を LC に局所注入し、PP-CA3 シナプス伝達を観察した。Glu 注入により、伝達が一過性に増強したが、増強の程度は TBS の 30 分前の Glu 注入時と比べ、わずかに減弱したが有意ではなかった。LFBS を PP に与え、60 分後に Glu を LC に注入し、PP-CA3 シナプス伝達を観察した。Glu 注入により伝達が一過性に増強したが、LFBS の 30 分前の Glu 注入時と比べほぼ同程度であった。LTP や LTD を誘導するとベースのシナプス応答が変化するので、PP 刺激電流を調節してシナプス可塑性時とほぼ同じ大きさのシナプス伝達にした場合でも、LC 活性化の影響が観察された。従って、LC 活性化によるシナプス伝達増強メカニズムはシナプス可塑性と異なるユニークなものであることが示唆された。

【総括】

本研究において、私は以下の点を明らかにした。① *in vivo* において、PP-CA3 シナプスは両方向性の可塑性が存在する。また、シナプス結合部位とシナプスを離れた部位で記録した fEPSP は違う性質を有している。② LC 活性化により、PP-CA3 シナプス伝達が増強される。この増強は青斑核より投射しているアドレナリン作動性神経から遊離したノルアドレナリンがアドレナリン α 、 β 受容体を介して作用したものと考えられる。③ PP-CA3 シナプスに誘発した弱い長期増強の early phase において LC 活動により early phase の LTP が促進される。④ LC 活性化による PP-CA3 シナプス伝達の増強はシナプス可塑性とは異なるメカニズムによる。

以上の結果から、嗅内野皮質から海馬 CA3 野への直接投射は自身の可塑性を持つうえに、青斑核の活動による修飾を受けることが明らかになった。海馬の機能を知る上で重要な知見と考えられる。今後は記憶・学習などの高次機能との関連を解明していく必要がある。