

論文の内容の要旨

論文題目 Ablation of NMDA Receptors Enhances the Excitability of Hippocampal
CA3 Neurons

和訳 NMDA 受容体の欠損による海馬 CA3 領域の神経細胞の
興奮性の亢進

指導教員 三品 昌美 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 福島 章顕

脳の一部である海馬は記憶に重要である。中でも CA3 野だけは、CA3 錐体細胞が他の CA3 錐体細胞に投射するという反回性回路を有するため、同期発火を生じやすくなっている。この同期発火は海馬脳波の発生、記憶の形成、てんかん発作の発生に寄与すると思われる。海馬スライスを用いた実験から、NMDA 受容体によるシナプス伝達の強化が同期発火の誘発に必須であると考えられてきた。本研究では、実際の生体内で NMDA 受容体は CA3 野の同期発火に寄与しているのかどうかを明らかにすることを目的とした。

私は遺伝子ターゲティング法を用いて CA3 領域の NMDA 受容体を欠損することを試みた。CA3 領域に強く発現する *GluRγ1* (*KA-1*) 遺伝子座に Cre 組換え酵素をノックインした *GluRγ1-Cre* マウスを新潟大学の崎村建司教授より譲り受けた。このマウスは生後第 1 週から海馬 CA3 領域で選択的に Cre 組換え酵素が発現することが示されている。一方で、NMDA 受容体の必須な遺伝子である *GluRζ1* (*NR1*) 遺伝子座の第 19, 20 エクソンをはさむように *loxP* 配列を挿入した *fGluRζ1* マウスを作成した。これら 2 つの系統を掛け合わせて変異体マウスを作成した。

変異体マウスで NMDA 受容体の発現を *in situ* hybridization 法で調べたところ、生後 7 日から海馬 CA3 領域で選択的に *GluRζ1* mRNA が欠損していた。変異体の CA3 領域に残存する *GluRζ1* mRNA は *GAD67* mRNA と共局在したことから、遺伝子欠損は CA3 領域では興奮性神経細胞で限局して生じていた。さらに、免疫組織化学法により、CA3 領域において生後 14 日までにタンパク質の欠損が生じることが示唆された。最後に、機能的な NMDA 受容体電流が消失していること

を確認するため、CA3 錐体細胞でパッチクランプを行い、NMDA 受容体応答と AMPA 受容体応答を計測したところ、変異体マウスでは NMDA 応答だけが完全に消失していた。以上の結果から変異体マウスでは、生後 14 日から海馬 CA3 錐体細胞の NMDA 受容体が欠損していることが明らかとなった。

次に、変異体マウスの CA3 錐体細胞の形態学的特徴に変化がないかどうかを調べるため、組織学的解析を行った。ニッスル染色、VGluT2、カルビンジン免疫染色から、それぞれ CA3 領域の錐体細胞層、網状分子層、透明層といった層構造に変化は認められなかった。また、ゴルジ染色より、樹状突起の分枝やシナプス密度に有意な変化は認められなかった。ゴルジ染色では必ずしもすべての樹状突起に染色が行渡らず、また複雑に走行する樹状突起の正確なシナプス密度を計測することは難しい。そこで、CA3 領域の単一錐体細胞を EGFP の強制発現により可視化し 3 次元立体再構築により解析した。しかしながら、樹状突起の分枝、スパインの分布、および軸索終末の分布に有意な変化は認められなかった。さらにシナプスのマーカーである GluR1 と PSD-95 の分布、および介在神経細胞のマーカーである GAD67、パルブアルブミン、カルレチニンなどの分布にも明確な差は認められなかった。ゆえに生後 2 週目まで NMDA 受容体の発現が残っていることで、神経回路形成はある程度保たれていると思われた。

カイニン酸は歯状回—CA3 シナプスを強く刺激し、てんかん発作を引き起こすことが知られている。そこで、カイニン酸誘発発作を利用して CA3 領域の興奮性を検討することにした。変異体にカイニン酸を投与したところ、変異体ではてんかん発作の発症閾値が低下していることが明らかになった。また、てんかん発作の発症によって誘発される Fos の発現は変異体マウスで有意に低いカイニン酸濃度で誘導された。以上の結果はこの変異体マウスがてんかん発作になりやすくなっていることを示している。

てんかん発作は神経細胞の同期発火で生じるため、海馬の局所脳波を解析した。ウレタン麻酔下における対照群の海馬では低い振幅の様々な脳波が観察されるのに対して、変異体では振幅の大きな、持続時間が 20-30 ミリ秒のスパイク様の活動（以下、EEG スパイク）が観察された。EEG スパイクは約 5 秒に 1 度の頻度で周期的に生じていた。EEG スパイクの発生源を探るため、海馬から皮質にかけて 16 点同時記録を行い、電流源密度解析を行った。結果、EEG スパイクでは CA3 錐体細胞層、および CA1 錐体細胞層に吸い込みが認められた。しかしながら、CA3 領域の上流に当たる歯状回では吸い込みは認められなかった。以上のことから、EEG スパイクは NMDA 受容体が欠損している CA3 領域で発生し、下流の CA1 領域に伝わっていくということが想定された。

EEG スパイクが CA3 領域でどのように生じているのかどうかを明らかにするため、ガラス微小電極を用いて EEG スパイクとマルチユニット活動を同時に計測した。EEG スパイクを基準にして観測されたマルチユニット活動を並べる PETH 解析を行ったところ、EEG スパイクが生じているときにマルチユニット活動が非常に多くみられることが明らかになった。この結果は、EEG スパイクが CA3

領域の神経細胞が多数同期発火することで発生することを示唆している。また、**EEG** スパイクは **CA1** 領域のマルチユニット活動とも強く相関しており、**CA3** 領域で引き起こされた同期発火は下流の **CA1** にも同様に同期発火をもたらすことが示唆された。一方で歯状回では相関は認められず、歯状回の神経細胞は **EEG** スパイクと同期して発火していなかった。以上から、変異体マウスは **CA3** 領域の神経細胞が過剰に同期発火していることが明らかになった。

変異体の錐体細胞にどのような変化があるのかを検討した。まず、**CA3** 錐体細胞の基本的な発火特性である入力抵抗、静止膜電位、膜容量をホールセルパッチクランプ法で調べたところ、有意な変化は認められなかった。次に興奮性・抑制性シナプス電流のバランスに変化があるかどうかを、**AMPA** 作動性電流と **GABA** 作動性電流を解析したところ、そのバランスにも変化は認められなかった。これに合致して、**AMPA** 受容体や **GABA** 合成酵素の発現量に大きな変化は認められなかった。最後に後過分極電流を計測したところ、変異体マウスにおいて非常に減少していた。この電流は、細胞内に **Ca** イオンのキレーターを投与すること、あるいは **K** イオンを **Cs** イオンで置換することで消失したことから、後過分極電流だと確認された。ゆえに **NMDA** 受容体は興奮性シナプス電流のほかに、後過分極電流による抑制を引き起こすことができ、この抑制も変異体で減少していることが明らかになった。

変異体マウスでは **CA3** 錐体細胞の **NMDA** 受容体が幼若期（生後 14 日）から欠損しているため、その表現型は錐体細胞の発達異常で生じた可能性が想定される。そこで、ウイルスを用いて成熟したマウスでの遺伝子欠損を試みた。アデノ随伴ウイルスに **Cre** 組換え酵素をコードさせ、8 週令の **fGluR ζ 1** マウスの **CA3** 領域に投与した。投与後 14 日目のマウス **CA3** 領域を免疫染色したところ、投与部位では 9 割以上の神経細胞で **Cre** 組換え酵素の発現が認められ、**GluR ζ 1** の免疫反応はほぼ完全に消失していた。同様の方法で **CA3** の 10 箇所ウイルスを投与したところ、**CA3** 領域全体の 4 - 7 割の領域で **NMDA** 受容体が欠損させることができた。ウイルスを投与した半数以上の実験群のマウスで、**EEG** スパイクに似た脳波が認められた。ウイルス投与マウスは **EEG** スパイクの振幅に個体間のばらつきが認められたが、これは **NMDA** 受容体の欠損領域の広さのばらつきが原因だと考えられる。観察されたスパイクの電流源密度解析を行った結果、**CA3** 錐体細胞層に吸い込みが認められ、**CA3** 領域の神経活動がその発生源であることが明らかになった。一方で、同じウイルスを投与した野生型マウスでスパイク様活動はまったく観察されなかった。この実験では **CMV** プロモータを用いて **Cre** 組換え酵素を発現させているため、表現型が興奮性神経細胞上の **NMDA** 受容体の欠損によるのか、あるいは抑制性神経細胞上の受容体の欠損によるのかは明確には区別できていない。しかしながら、以上の結果は、**EEG** スパイクの発生に、発達期からの **CA3** 領域の **NMDA** 受容体の欠損は必ずしも必須ではないことを示唆している。

本研究により、**CA3** 領域の **NMDA** 受容体は、生体内ではリカレントネットワーク全体の興奮性を抑制していることが明らかになった。このような現象は

CA1 領域での欠損では認められず、CA3 領域に特徴的なものである。この現象の機構は完全には明らかではないが、以下の3つの理由が考えられる。第一に、発達期からの NMDA 受容体の欠損による異常である。しかしながら発達期からの欠損は必ずしも興奮性の亢進に必須ではないことを実験的に明らかにした。第二に、NMDA 受容体依存的なシナプス可塑性の阻害に原因がある可能性が考えられる。生体内の CA3 シナプスでは長期抑圧が絶えず起こり、興奮性を抑制している可能性がある。最後に、NMDA 受容体からの抑制性のシグナルがネットワークの興奮性を抑えている可能性があり、その説明のひとつとして NMDA 受容体の活性は後過分極電流を誘発することを検討した。