

論文の内容の要旨

論文題目 成長ホルモンが海馬興奮性シナプスに及ぼす作用に関する研究

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 19 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 高橋 健二

ヒトが成長する上で必須となる成長ホルモン (growth hormone: GH)は下垂体前葉にある GH 分泌細胞により産生され、血液を介して全身に作用する。GH は胎生期より発現が見られ、生後徐々に分泌量が増加し、思春期にピークを迎え、以降年齢と共に低下していく。このように、GH は成長していく過程で適切な時期に適切に分泌されていることが必要であると考えられており、実際、分泌不全により成長ホルモン分泌不全型低身長症や成人成長ホルモン欠損症が引き起こされる。興味深いことに、これらの患者は成長異常だけでなく、認知機能の低下や不安障害が見られており、その症状は GH 補充療法により改善するという報告がある。このことから、GH はヒトの成長過程だけではなく、認知機能とも密接に関与していることが考えられ、動物実験においては、認知機能の障害を示す野生型老齢ラットに GH を投与することで認知機能が回復したという報告がある。しかし、この再現性については異論とする報告もあり、GH が認知機能に関与しているメカニズムについての一定の見解は得られていな

い。また、GH を欠失させた遺伝子改変マウスの報告は未だないが、GH が成長過程に必要であることを考慮すると、胎性致死であることが予想される。そこで、本研究では、スプライシング異常により GH の産生が大幅に減少している自然発生型矮小ラット (spontaneous dwarf rat: SDR) を用い、内因性の GH が認知機能に及ぼす作用を調べた。中枢神経系の中でも、GH 及び GH 受容体が存在し、認知機能と関わりが深いと考えられている海馬 CA1 領域における興奮性シナプスについて、電気生理学的手法および生化学的手法により解析を行った。本研究の成果により、GH 関連疾患で見られる認知機能低下やその改善メカニズムについての理解を深めることが期待できる。

SDR の体重はコントロールとして用いた Sprague-Dawley ラット (SD) に比べ小さく、海馬重量や海馬のサイズも減少している。海馬のニッスル染色により層構造を観察したところ、大きさは小さいものの、層構造の割合は変化していなかった。続いて、SDR の海馬における基本的なシナプス伝達の特性を見るために、細胞外電位記録法によりイオンチャンネル型グルタミン酸受容体である a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受容体が介するシナプス応答の入出力関係 (input-output relationship) を検討した。その結果、SD と比較すると、SDR におけるシナプス伝達効率が增加していることが示唆された。伝達効率は、量子仮説によれば、シナプス後細胞における応答、すなわち量子サイズ、シナプス前終末における放出確率、そして伝達物質放出部位の数で決定される。海馬抽出液のウェスタンブロット解析を行ったところ、AMPA 受容体の発現量は変わっておらず、またホールセルパッチクランプ記録法による海馬 CA1 領域の錐体細胞における微小シナプ

ス後電流 (miniature excitatory post-synaptic current: mEPSC)の測定では、SD と SDR の間で振幅や kinetics に差が認められなかった。このため、SDR で見られる伝達効率の増加にシナプス後細胞が関与している可能性は低いと思われる。一方、シナプス前終末からのグルタミン酸放出機構に異常が認められるかどうかを調べるために、細胞外電位記録法により 2 発刺激促進 (Paired-pulse facilitation: PPF)を比較検討したところ、SDR において増大が見られた。PPF の増大は放出確率の減少を反映しているとされており、伝達効率の増加とは一見矛盾している。さらに、mEPSC における応答間の時間、すなわち応答の頻度も放出確率を反映することがあるが、SDR においては変化が見られなかった。このような矛盾した結果が得られたひとつの要因として、mEPSC と活動電位により誘発される EPSP では神経伝達物質放出メカニズムに違いがあるという可能性が考えられるが、今後はこのような結果が得られた神経生理学的背景を解明することが必要である。

さらに、海馬抽出液のウェスタンブロット解析により、SDR においてもひとつのイオンチャンネル型グルタミン酸受容体である N-methyl-D-aspartate (NMDA)型受容体の発現が増加していることが明らかとなった。また、ホールセルパッチクランプ記録法により、NMDA 受容体を介した電流と AMPA 受容体を介した電流の比 (NMDAR/AMPA 比)が SDR で増大しており、SDR では NMDA 受容体を介した電流が増加していることが明らかとなった。このように、SDR では生化学的にも電気生理学的にも NMDA 受容体の増加が認められた。続いて長期可塑性のひとつである長期増強 (Long-term potentiation: LTP)を調べたところ、SDR において有意に増大していた。単純に NMDA 受容体の増加による可能性が高いが、GH が成長に関する因子であるこ

とを考慮し、SDR でシナプスの発達が未熟であるとすれば、幼若期に多く見られ NMDA 受容体のみを発現するサイレントシナプスの増加が LTP の増大の原因である可能性も考えられる。この他、GH の分泌を制御している因子である、胃から分泌される ghrelin や、性ホルモンのひとつである estradiol の外部投与により、LTP の増大やスパイン密度の増加が報告されていることから、これら GH 関連因子により LTP が増大している可能性も考えられた。

続いて、SDR におけるシナプス可塑性の亢進が GH や下流因子であるインスリン様成長因子 1 (insulin-like growth factor-1: IGF-1) の投与によってどのように変化が見られるかを調べたところ、灌流による急性投与では GH による fEPSP の増大を過去の報告と同じく再確認した。IGF-1 投与では fEPSP に変化が見られず、GH 受容体を介した応答であると考えられた。一方、GH、IGF-1 の急性投与では LTP に変化は見られなかった。SDR への皮下投与による 8 週齢から 3 週間の慢性投与では、基本的シナプス伝達の異常は回復せず、GH 投与時のみ LTP がさらに増大するという結果となった。GH 投与により IGF-1 シグナルが活性していると考えられ、IGF-1 投与により LTP に変化が見られなかったことから、LTP の増大には、GHR により活性化する MAPK や PI3K の他、GH の分泌制御に関わる ghrelin など、GHR のみที่เกี่ยวข้องするシグナル系や各制御因子が関与している可能性が強いと考えられる。

GH や IGF-1 の慢性投与でシナプス伝達異常の回復を認めなかったことは、投与時期や期間が妥当でなかった点や、生後より GH の減少している SDR において、何らかの補償機構が働き、それによるシナプス応答の変化が考えられた。その場合、若齢で投与開始することにより、補償機構については GH による全身成長の回復程度に

より完全には否定できないが、SDR と GH、及びシナプス伝達で見られた異常の関係を明らかにすることができると思われる。もうひとつの可能性として、SDR が自然発生的であることから、GH 以外の遺伝子における変異も考えられる。この場合、他の GH 関連遺伝子のノックアウトマウスを用い、SDR で行った実験と同様の実験を行うことで明らかになるとと思われる。

GH 関連疾患に認知機能低下などの精神症状が見られることから、GH 及び関連因子の中枢神経への作用が長年議論されている。今回は SDR における海馬の興奮性シナプスに着目したが、SDR に関わらず、様々な GH 関連遺伝子の改変動物を用い、抑制性シナプスをはじめ、海馬全体に対して、GH 及び GH 受容体がどのような作用を及ぼしているのかを検討すべきであろう。また、海馬以外の中枢神経系にも GH 受容体は発現しており、認知機能には海馬以外の部位も深く関わっていることから、中枢神経系全体における GH、及び関連因子の作用についても調べるべきであると思われる。GH は年齢と共に分泌が低下することから加齢に伴う認知機能や記憶の低下との関連も指摘されている。中枢神経系における GH の作用に関する研究は未だ十分発展していないが、高齢者への GH 投与による認知機能改善の可能性の検討など、本研究が将来的に GH 関連疾患や高齢による認知機能低下のメカニズムの解明、ならびにその治療への第一歩となることを期待する。