

## 審査の結果の要旨

氏名 高橋 健二

本研究は、動物が成長する上で必須となる成長ホルモン(growth hormone: GH)が、認知機能に与える影響を明らかにするため、自然発生的に成長ホルモンが減少したラット (spontaneous dwarf rat: SDR) において海馬興奮性シナプスを電気生理学的、生化学的に解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. GHが減少しているSDRは、11-13週齢時点での体重でSprague-Dawley rat (SD)に比べ20%程度と大幅な減少を示すことを再確認した。海馬重量及び海馬の長さは70%程度であった。SDRで見られる海馬サイズの減少が海馬の各層構造に与える影響を調べるため、ニッスル染色による評価を行った。その結果、CA1領域の厚さに対する各層構造の割合に変化はなく、単純に層構造を保ったまま大きさが小さくなっていることが明らかとなった。
2. SDRの海馬スライスを用い、SDをコントロールとした電気生理学的解析を行った。まず、細胞外電位記録において入出力関係(input-output relationship)を測定したところ、SDRで有意な増大が見られた。SDRの海馬興奮性シナプスにおいて、伝達効率が増大していることが明らかとなった。
3. 伝達効率の増大が何に由来するかを調べるため、細胞外電位記録により2発刺激促進(paired pulse facilitation: PPF)を測定したところ、SDRで有意な増大が観察された。PPFは伝達物質の放出確率を示しているとしてされており、この場合放出確率はむしろ減少している可能性が示唆された。続いて、ホールセルパッチクランプ法により、微小興奮性シナプス後電流(miniature excitatory postsynaptic current: mEPSC)を調べた。その結果、振幅に変化はなく、応答の頻度も差は見られなかった。細胞外電位記録で観察されたInput-output relationshipやPPFとの結果に矛盾が生じるが、その原因の一つとして、mEPSCと活動電位依存性の細胞外電位記録とは神経伝達物質の放出メカニズムに違いがある可能性が考えられた。
4. 海馬抽出液によるウェスタンブロットにて、シナプス関連タンパク質の発現量を単純比較した。シナプス後細胞におけるAMPA受容体やpost synaptic density protein 95(PSD95)はSDRで差はなく、シナプス前終末に存在する、放出関連タンパク質であるシナプシン1やシナプトタグミン、シナプトフィジンにも差は見られなかった。一方、もうひとつのグルタミン酸受容体であるNMDA受容体のサブユニットであるGluN2A及びGluN1はSDRにおいて有意な増加が見られた。さらに、NMDA受容体の発現が多い

と考えられている CA1 領域を取り出し、ウェスタンブロットを行ったところ、上記 NMDA 受容体のサブユニットの他、GluN2B も発現の増加が見られ、SDR では NMDA 受容体の発現が増加していることが示された。

5. NMDA 受容体発現の増加が NMDA 受容体シナプス電流を増加させているかを調べるため、ホールセルパッチクランプ法により、NMDA 受容体電流と AMPA 受容体電流の比を測定したところ、SDR で NMDA 受容体電流の有意な増大を観察した。SDR では NMDA 受容体の発現の増加に伴い、NMDA 受容体シナプス電流が増加していることが明らかとなった。
6. SDR における可塑性の変化を調べるため、細胞外電位記録により、長期可塑性のひとつである長期増強 (long term potentiation: LTP) を測定した。その結果、NMDA 受容体が増加している SDR において、LTP は有意に増大していた。
7. これらの SDR で見られた電気生理学的な変化が、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) の投与により回復するかどうかを調べた。SDR の海馬スライスに対し灌流投与を行い、GH や IGF-1 の急性効果を観察した。GH の急性投与により、fEPSP は増大し、これまで言われていた急性効果を再確認した。またこの変化は IGF-1 では見られなかったことから GH 特有のものであり、SD と SDR 間での差は見られなかった。しかし、GH、IGF-1 の急性投与により LTP に影響は見られなかった。
8. 続いて、慢性投与による効果を見るために、8 週齢の SDR に対し週に 3 回、3 週間、GH 及び IGF-1 の皮下注射を施行した。3 週間後の体重増加率はコントロールである生理食塩水投与群と比較し、GH、IGF-1 投与群ともに有意な増加を認めた。投与後の SDR 海馬スライスを用い、電気生理学的解析を行った。SDR で増大が見られた input-output relationship や PPF は変化がなかった。海馬のウェスタンブロットでは各シナプス関連タンパク質に変化はなく、SDR で増加していた NMDA 受容体も変化は見られなかった。NMDA 受容体シナプス電流も回復は認めなかった。
9. 慢性投与後の LTP は、GH 投与群においてのみ、さらなる増大が観察される結果となった。GH の慢性的な作用としての LTP の増大が考えられた。慢性投与による回復を認めなかった点は、投与時期の妥当性や他の補償機構が考えられた。

以上、本論文は GH が減少している SDR の海馬興奮性シナプスにおいて伝達効率や長期可塑性の変化を明らかにした。また、NMDA 受容体の増加や、それに伴う NMDA 受容体シナプス電流も増加していることが示された。投与による完全な回復は認めなかったが、SDR で見られたこれらのシナプス伝達の異常が、GH が認知機能に与える影響の一因となっている可能性が示唆された。SDR での中枢神経についての研究は本研究が最初であり、GH の中枢神経への関与の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。