HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	VGluT3を発現するCCK陽性バスケット細胞はマウスの脳の特定の皮質及び皮質様扁桃体領域において内因性カンナビノイドシグナル関連分子を豊富に備えた陥入型シナプスを形成する［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	大宮, 友貴
Description	配架番号：2138
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11656号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59083
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Omiya_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　大宮　友貴

学 位 論 文 題 名

VGluT3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞はマウスの脳の特定の皮質及び皮質様扁桃体領域において内因性カンナビノイドシグナル関連分子を豊富に備えた陥入型シナプスを形成する

（VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling molecules in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains）

【背景と目的】

中枢神経系の神経回路におけるカンナビノイドシグナル伝達は、脱分極誘発性の Ca^{2+}イオン濃度の上昇、$G\alpha_{q/11}$ 蛋白共役型受容体の活性化、またはその両者によって、eCB がポストシナプスニューロンから産生・放出され、神経終末上に発現する 1 型カンナビノイド受容体（CB_1）に逆行性に働き、伝達物質放出の短期及び長期抑制を誘導する。脳において、2-アラキドノイルグリセロール（2-arachidonoylglycerol、2-AG）は、*sn*-1 ジアシルグリセロールリパーゼα（diacylglycerol lipase α、DGLα）によって合成される主要な eCB である。本研究室では、ユニークなシナプスを扁桃体基底核において発見しており、その特異な形状から陥入型シナプスと命名した。陥入型シナプスでは、CB_1 を発現する CCK 陽性バスケット細胞の神経終末が錐体細胞の細胞体に対して陥入構造を形成している。皮質領域では、CCK 陽性バスケット細胞には 3 型小胞性グルタミン酸トランスポーター（vesicular glutamate transporter-3、VGluT3）を共発現するものと、血管作動性腸管ポリペプチド（vasoactive intestinal polypeptide、VIP）を共発現する二群に分けられるが、陥入型シナプスを形成する扁桃体基底核のバスケット細胞がそのどちらかであるかは不明である。さらに、陥入型シナプスは扁桃体の中では基底核に特異的に形成されるが、皮質領域に存在するかも未だ不明である。本研究では、これら 2 つの疑問点を解明することを目的とした。

【材料と方法】

成熟（2-4 月齢）雄性 C57BL/6 マウスを用いた動物実験は、全て「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定（平成 19 年 4 月 1 日）」を遵守して行った。経心潅流固定を行った固定脳または瞬間凍結した新鮮凍結脳を用い、それぞれ、*in situ* ハイブリダイゼーション、蛍光免疫染色、免疫電子顕微鏡法に用いる目的で、マイクロスライサーまたはクライオスタットを用いて切片を作成し、免疫電子顕微鏡法では樹脂ブロックに包埋した組織標本をウルトラミクロトームを用いて超薄切片（80nm）とした。*In situ* ハイブリダイゼーションでは、フルオレセインまたはジゴキシゲニン標識の cRNA プローブを調製して用いた。蛍光免疫染色及び免疫電子顕微鏡法では過去に抗原特異性を確認している一次抗体を用いて行った。観察はそれぞれ、光学顕微鏡（BZ-9000；Keyence、Japan）、共焦点レーザー走査型顕微鏡（FV1200、Olympus）、電子顕微鏡 H-7100（Hitachi、Tokyo、Japan）または JEM1400（JOEL、Tokyo、Japan）を用いて行った。

【結果】

扁桃体基底核において見出された陥入型シナプスは、脳の主要な eCB である 2-AG シグナル伝達分子が集まるユニークな GABA 作動性シナプスである。このシナプスでは、CB_1 を強発現する CCK 陽性バスケット細胞の軸索終末が錐体細胞の細胞体に陥入し、この陥入部位の錐体細胞膜に 2-AG 合成酵素である DGLαが集積する。扁桃体基底核において、小胞性グルタミン酸トランスポーターVGluT3 は、CB_1 を強発現する GABA 作動性ニューロンの約 4 分の 1 に発現していた。VGluT3 陽性の CB_1 陽性バスケット細胞終末の大多数が DGLαのクラスターと対向するのに対して、VGluT3 陰性の多くは対向しなかった。電子顕微鏡で観察すると、VGluT3 陽性のバスケット細胞終末のほとんどは陥入構造を形成するのに対して、VGluT3 陰性のバスケット細胞終末は陥入構造を作らなかった。陥入型シナプスのポストシナプス膜は、GABA 受容体 $GABA_AR\alpha1$ を発現したが、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA2 は検出されなかった。一方、$G\alpha_{q/11}$ タンパク共役型の代謝型グルタミン酸受容体 $mGluR_5$ は錐体細胞のシナプス外膜に広く発現し、$G\alpha_{q/11}$ タンパク共役型の CCK 受容体である CCK_2R も錐体細胞に高いレベルで発現していた。VGluT3、CB_1、DGLαの 3 者の分子集合体を備えた錐体細胞は、運動野、体性感覚野、内嗅領皮質などの皮質領域にも豊富に観察され、海馬や内側前頭前野などには乏しかった。内嗅領皮質を電子顕微鏡で観察すると、陥入構造を有するシナプスは VGluT3 陽性終末により形成され、そこに DGLαが集積し、扁桃体基底核と同様の陥入型シナプスを確認することができた。

【考察】

今回明らかになった陥入型シナプスの神経化学的・解剖学的特性から、次の 3 つの可能性が示された。1）共放出されるグルタミン酸と CCK が $G\alpha_{q/11}$ タンパク共役型の $mGluR_5$ と CCK_2R の活性化を介して 2-AG の産生を促進し、GABA 作動性の抑制性伝達を逆行性に抑制している。2）狭い細胞外空間を挟んだ CB_1 と DGLαとの極端な近接性から、陥入型シナプスでは 2-AG を介した持続的な放出抑制が起こりやすく、持続的抑制の誘導や解除を介して錐体細胞の興奮性や発火パターンを強力に制御している。3）陥入型シナプスは、CB_1 の活性化によって CCK 伝達を効果的にシャットオフするためのシナプス装置として、錐体細胞の振動制御に対して活動依存的および状況依存的な微調整を行う。本研究では、カンナビノイドシグナル伝達に関与する分子集団をもつ陥入型シナプスの分子解剖学的特性を調べ、そこに VGluT3 が存在することを発見したが、この生理的あるいは病理的機能については不明のままである。また、VGluT3 陽性 CCK バスケット細胞による、陥入型シナプス形成の機序及び形成される発達時期、また陥入型シナプスの機能的意義については、未だ推測の域を超えない。これらの解明を通して、VGluT3 及び陥入型シナプスの機能的意義の解明が今後の研究課題となる。

【結論】

2-AG シグナル伝達分子が集まる陥入型シナプスは、終脳の皮質領域や皮質様扁桃体領域の VGluT3 を発現する CCK 陽性バスケット細胞が形成することが明らかとなった。また、3 種類の伝達物質の共放出によるシナプス性および非シナプス性の作用を介して特異なシナプス機能を発揮するものと考えられる。さらに皮質領域特異的な陥入型シナプスの構築は、2-AG を介した逆行性伝達の誘導、制御、協同性メカニズムに対するニューロン間での異なる要求性を反映しているものと考えられる。