HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	中枢神経系における軸索の興奮性制御機構に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	大浦, 峻介
Description	配架番号：2442
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13428号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74235
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shunsuke_Oura_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　大浦　峻介

学 位 論 文 題 名
中枢神経系における軸索の興奮性制御機構に関する研究
（Studies on regulatory mechanisms of axonal excitability in central nervous system）

【背景と目的】軸索は、神経細胞の出力として重要な役割を担っている。これまで、軸索は軸索起始部で発生した活動電位を減衰させることなく終末部まで伝播させる構造と考えられてきた。一方で、特に中枢神経系の軸索では、活動電位を伝播させる過程でその振幅や持続時間に変調が起こると報告されている。この軸索活動電位の変調は、シナプス強度に影響を与えると考えられる。軸索の機能解析には電気生理学的計測が有効な手法の 1 つである。しかし、中枢軸索の径はきわめて細く、活動電位の直接記録は困難とされてきた。本研究では、例外的に大型の軸索終末を有する海馬苔状線維終末から軸索活動電位の直接記録を試みることによって、軸索における興奮性の制御機構の解明を目指した。海馬苔状線維は形態的ならびに機能的特性に関する知見が蓄積し、中枢神経系の軸索研究のモデル系の一つと考えられている。第一章では、軸索の活動電位に特徴的な後脱分極の発生機構の検討を行った。第二章では、新たに見出した活動依存的な軸索活動電位の抑圧現象における後脱分極の役割について検討した。第三章では、後脱分極が軸索終末への Ca^{2+}流入に与える影響について検討した。

第一章　海馬苔状線維終末における後脱分極の発生機構
【材料と方法】C57BL/6J マウスの海馬から急性スライス標本を作製した。微分干渉顕微鏡下にて直径 3〜5 μm の苔状線維終末を同定した。苔状線維の起始細胞である顆粒細胞への電気刺激、もしくは苔状線維終末への電流注入によって活動電位を誘発し、ホールセル電流固定法にて苔状線維終末から軸索活動電位を記録した。また、記録部位周辺に局所的な薬液投与を行うことで、軸索での薬物作用を評価した。これに加え、シミュレーションにより後脱分極の発生機構について解析を行った。
【結果】顆粒細胞層を電気刺激すると、軸索活動電位とそれに引き続く後脱分極が誘発された。また、苔状線維終末への電流注入によっても同様の波形が記録された。膜電位を-80 mV から軽度脱分極させると、後脱分極の振幅が減少した。この結果は、電位依存性チャネルの活性化が後脱分極に関与することを示唆する。電位依存性チャネルの候補として、先行研究にて後脱分極発生に関与しているとされた電位依存性 Na^+チャネルの関与を検討した。電位依存性 Na^+チャネルの活性化薬として働くベラトリジンを投与すると後脱分極の振幅は増加し、Na^+チャネルの阻害薬であるテトロドトキシン（TTX）を投与すると減弱した。これらの結果から、ある種の Na^+チャネルが後脱分極に寄与すると考えられた。一方で、TTX によって電位依存性 Na^+チャネルを阻害した条件において後脱分極の残存を認めたことから、Na^+チャネル以外の機構によっても後脱分極が制御されていると考えられた。TTX に加え、電位依存性 K^+チャネルの阻害薬である 4-aminopyridine（4-AP）を投与したところ、脱分極の振幅と持続時間の増加が認められ、電位依存性 K^+チャネルが後脱分極を制御している可能性が示された。これに加え、シミュレーションを用いた解析か

ら、後脱分極は近位軸索の活動電位が受動的に伝播した容量性成分を反映すると推定された。
【考察】本研究ではこれまで詳細に検討されていなかった後脱分極の発生機構の解明を目指した。Na^+チャネルは機能的に、不活性化が速い transient 型と、活性化状態が持続する persistent 型、膜電位の再分極に応じて再び活性化する resurgent 型に分類される。近年、persistent 型、resurgent 型の Na^+チャネルが後脱分極発生に関与する可能性が報告されている。今後は苔状線維終末からの Na^+電流を記録し、後脱分極に関与する電位依存性 Na^+チャネルを検索することが必要である。
【結論】後脱分極の発生機構には軸索細胞膜の容量性成分に加え、電位依存性 Na^+チャネルと K^+チャネルが関与していることが示された。

第二章　軸索活動電位の活動依存的な制御における後脱分極の役割
【材料と方法】ルースパッチクランプ法を用いて、単一の苔状線維終末から活動電位を記録した。
【結果】苔状線維終末からルースパッチクランプ法により記録した活動電位は短い間隔で二回刺激を加えると二発目の軸索スパイクの振幅が軽度減弱する二発刺激抑圧（paired-pulse depression: PPD）を示し、この現象は 200 ミリ秒ほど持続した。活動電位による電位依存性 Na^+チャネルの不活性化は、膜電位の再分極に応じて十ミリ秒程度で解除されることから、PPD には Na^+チャネルの不活性化の蓄積以外のメカニズムが関与すると推定した。PPD の持続時間は、第一章で示した後脱分極の時間経過に相当することから、緩徐な脱分極に従い電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化が生じ、二発目の活動電位が減弱するという可能性が想定された。後脱分極の振幅を増加させるベラトリジンを投与したところ、PPD が亢進した。また、後脱分極の振幅を低下させる低濃度の TTX は PPD を軽度に減弱させた。これらの所見から、後脱分極が PPD のメカニズムに関与していると考えられた。
【考察】苔状線維軸索における活動電位の PPD は、後脱分極の緩徐な脱分極による電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化によって生じると推定された。これに加え、後脱分極は電位依存性 Na^+チャネルを制御することで活動電位発生までの潜時を調整すると考えられた。
【結論】二発刺激によって軸索での活動電位が減少する二発刺激抑圧（PPD）を発見し、後脱分極による電位依存性 Na^+チャネルの定常的な不活性化が関わると推定した。

第三章　海馬苔状線維終末への Ca^{2+}流入に対する後脱分極の役割
【材料と方法】ホールセルパッチクランプ法を用いて、苔状線維終末から Ca^{2+}電流の測定を行った。
【結果】後脱分極が神経伝達物質放出の調節に関与する可能性を検討するため、軸索終末部への Ca^{2+}の流入量に与える後脱分極の影響について検討を行った。二発刺激により Ca^{2+}の流入量は軽度に増加することが示された。一方で、後脱分極を抑止すると Ca^{2+}の流入量に増加を認めなかった。この結果から、後脱分極は Ca^{2+}の流入量を活動依存的に増加させると考えられた。
【考察】後脱分極は引き続く活動電位に伴う Ca^{2+}の流入量を増大させることが示された。軸索終末への Ca^{2+}流入量の増加は神経伝達物質の放出量を増加させるため、後脱分極は短期シナプス可塑性の一因を担う可能性が想定された。
【結論】後脱分極は活動依存的に Ca^{2+}の流入量を増加させると考えられた。