The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	孤立培養皮質ニューロンのシナプス活動に対する脳由来神経栄養因子の促進作用
Author(s)	谷口, 暢章
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41748
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【14】

氏　　名	谷口暢章（たにぐち のぶあき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15219　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	**孤立培養皮質ニューロンのシナプス活動に対する脳由来神経栄養因子の促進作用**
論文審査委員	（主査） 教授　津本　忠治 （副査） 教授　福田　淳　　教授　吉川　秀樹

論文内容の要旨

【目的】

神経栄養因子は、発達期のニューロンの分化や突起の伸長、また、成熟後は、ある種のニューロンの生存・維持に、重要な役割を果たしていると考えられている。しかるに、最近、神経栄養因子は、中枢神経及び末梢神経系において、シナプス伝達効率を急速に変えるという急性の作用をもつことが報告された。この神経栄養因子の中でも、特に、脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor, BDNF）は、海馬や大脳皮質視覚野のスライス標本における急性実験で、シナプス長期増強（long-term potentiation, LTP）の誘発に深く関わっていることが示唆されている。大脳皮質視覚野の構造と機能は、生後発達期の視覚体験によって、経験依存的に、可塑的変化を来しうることが知られているが、LTPは、その現象の細胞レベルでの素過程と考えられている。したがって、神経栄養因子のシナプス伝達への急性作用のメカニズムの解明は、発達脳の可塑性のメカニズムを明らかにする最初のステップとして、重要であると思われる。

本研究では、新生仔ラットの大脳皮質視覚野から培養した孤立神経細胞標本を用いて、BDNFが、シナプス伝達効率の急性変化を引き起こすことが出来るのかどうかを、引き起こすとすれば、どのようなメカニズムによるのかを、主に自発性の興奮性後シナプス電流（Excitatory Postsynaptic Currents, EPSCs）の解析から、明らかにしようとした。

【方法】

孤立神経細胞標本を作成するために、生後0－3日齢のSDラットの視覚野に相当する領域の大脳皮質を一塊として切り出し、これをpapainを用いて個別のニューロンに分離した。次に、前もって作成したglia islandの上に、1個のニューロンを培養し、孤立神経細胞標本を作成した。孤立神経細胞標本から記録されるEPSCs は全て、その1個の神経細胞に由来するシナプス（autapseとも云う）から生じるものであるから、細胞体を電位固定し、活動電位が発生しない状況で自発的に発生するEPSC（miniature EPSC, mEPSC）は、活動電位によって生じる誘発性EPSCと起源が同じである。したがって、シナプス伝達効率の変化は、mEPSC の変化に反映されることになる。電気生理学的な実験は、10－28日間の培養期間後に行った。

ホールセルパッチ電極法で、細胞体を－70mVに電位固定し、patch-clamp amplifier（Axoclamp 2 B, Axon Instruments）を用いて、mEPSCsを記録した。まずコントロールとして10－15分間、mEPSCsを記録した後に、局所

灌流システムを用いて、記録している細胞に、BDNFを200ng／mlの濃度で20－30分間投与した。Trk receptor Tyrosine kinaseの特異的な阻害剤であるK252a、及び抗BDNF抗体は、それぞれ、灌流液の中に200nM、5μg／mlの濃度で溶解させた。

【成績】

ホールセルパッチ電極法を用いて、計43個の孤立神経細胞からmEPSCsを記録した。BDNF単独投与群（n＝20）においては、全てのニューロンにおいて、BDNF投与開始後5分以内に、mEPSC出現頻度が増大し、約15－20分後にプラトーに達した。BDNF投与後、5、10、15、20経過後のmEPSC出現頻度は、コントロール期間と比較して、それぞれ、155.5±11.2、185.4±11.9、199.3±15.4、202.4±15.4、207.1±22.8%（mean±S.E.M）であった。一方、BDNFの受容体であるTrk受容体の機能を阻害するK252a（n＝12）、または、抗BDNF抗体（n＝11）を投与した場合には、BDNFによるmEPSC出現頻度の増加作用は、ほぼ完全に阻止された。BDNF投与後20分経過値は、それぞれ、92.9±8.3、103.1±5.9%であった。これらの結果から、BDNFがTrkB receptorの活性化を通じて、mEPSC出現頻度を増加させていると、解釈することができた。一方、mEPSCsの振幅には、有意な変化がみられなかった。BDNF単独投与実験では、投与前の振幅は28.6±16.6pAであったが、投与後17－20分経過値は28.0±16.5 pAであった。このように、有意な変化が生じないことは、K252a、抗BDNF抗体投与実験でも見られた。この件は、mEPSCsの振幅分布を、累積確率のグラフになおし、Kolmogorov-Smirnov testで統計学的検定を行うことで確認した。

【総括】

以前、BDNFは抑制性シナプスに直接的に作用し、興奮性シナプスへの作用は間接的なものであるとの報告があったが、今回、抑制性シナプスが全く含まれていない興奮性孤立神経細胞標本を用いることにより、BDNFが直接に、興奮性シナプスに効果を及ぼしていることが示された。また、本研究によって、BDNFはmEPSCの出現頻度を増加させたが、その振幅には有意な変化を起こさないことが明らかになった。シナプス後部に何らかの変化が生じた場合、mEPSCsの振幅に有意な変化が起こることが期待されるので、今回の実験結果は、BDNFの作用部位はシナプス前部であることを示している。

論文審査の結果の要旨

神経栄養因子は、特に脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor, BDNF）は、ニューロンの分化、突起の伸長や、生存・維持に関与していると考えられていたが、最近になって、シナプスの伝達効率を変えるという急性の作用をもつことが報告された。しかしながら、その急性作用のメカニズムは明らかではなかった。本研究では、ラットの大脳皮質視覚野から培養した孤立神経細胞標本を用いて、BDNFが、シナプス伝達効率の急性変化を引き起こすことが出来るのかどうか、引き起こすとすれば、どのようなメカニズムによるのかを、主に自発性の興奮性後シナプス電流（Excitatory postsynaptic currents, EPSCs）の解析から、明らかにしようとした。

その結果、BDNFは自発性EPSCの出現頻度を増加させたが、その振幅には有意な変化を起こさなかった。また、これらの作用は、シナプス前終末側のTrk receptor tyrosine kinaseの活性化を介することが示唆された。さらに、シナプス前部の脱分極によって発生する誘発性EPSCの振幅を、培養日数が15日以下では増大させるが、16日以上になると、増大させないことが明らかになった。両者のグループとも、自発性EPSCの出現頻度は増加したので、以上の結果は、シナプス前終末から自発的に神経伝達物質が放出されるメカニズムと、シナプス前終末の脱分極に応じて放出されるメカニズムは、必ずしも同一ではないこと、及び、BDNFの誘発性伝達物質放出増大作用は、ニューロンの成熟につれて、消失することを示唆している。

以上の結果は、脳由来神経栄養因子がシナプス伝達を促進するという急性作用のメカニズム解明に寄与するものであり、学位に値するものと考えられる。