

Title	Brain-Derived Neurotrophicfactor Increases Inhibitory Synapses, Revealed in Solitary Neurons Cultured from Rat Visual Cortex
Author(s)	惣谷, 和広
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45436
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	惣 谷 和 広
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19096 号
学位授与年月日	平成 17 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	Brain-Derived Neurotrophic factor Increases Inhibitory Synapses, Revealed in Solitary Neurons Cultured from Rat Visual Cortex (ラット大脳視覚野の孤立神経細胞培養標本で見出された脳由来神経栄 養因子の抑制性シナプス増強作用)
論文審査委員	(主査) 教授 津本 忠治 (副査) 教授 福田 淳 教授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

脳神経由来栄養因子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor: BDNF) は、中枢神経細胞の分化や神経突起形成に関与する分子として知られているが、近年、シナプス可塑性に関与することが見出され、興奮性神経細胞を中心にその作用およびメカニズムについて多くの研究がされている。しかし、その中で、BDNF は興奮性神経細胞と抑制性神経細胞でのその作用の違いがあるなど、未だ神経細胞ごとの作用やそのメカニズムについて、詳細は明らかになっておらず、特に、抑制性神経細胞に対する BDNF の効果についてはさまざまな報告がされている。このように研究結果が一致しない理由として、今まで使用されてきた実験試料には、急性スライス標本や分散培養標本など興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の混在するものが用いられ、神経細胞の種類による純粋な BDNF の効果を正確に評価することができなかったことが挙げられる。そこで、本研究では、BDNF の純粋な抑制性神経細胞への効果を調べるためにラット大脳皮質視覚野由来の孤立神経培養標本を用いて、ただ一個の抑制性神経細胞を同定し、BDNF の慢性投与が抑制性神経細胞のシナプス伝達およびその形態にどのような作用を及ぼすかを調べた。

〔方法ならびに成績〕

1. BDNF は TrkB 受容体を介して、誘発抑制性後シナプス電流 (eIPSCs) の振幅を増強させた。

実験は、生後直から一日後の Sprague-Dawley ラットの脳皮質視覚野由来の孤立神経培養標本を作製し、Neurobasal A Medium に B27 を添加した人工無血清培地を normal な培地として、これを使用して培養したものをコントロールの培養群とした。これに対して、BDNF 100 ng/ml を加えた培地で培養を行った培養群と BDNF 100 ng/ml と BDNF の高親和性受容体である TrkB 受容体を阻害することが知られている抗 TrkB 抗体 50 μ g/ml を加えた培地で培養を行った培養群をそれぞれ準備した。培地は、培養開始後、2～3 日おきに培地交換をし、一般に、シナプス形成がされていると言われている培養開始後 10～15 日間後の間で実験を行った。ホールセルパッチクランプ法によって -70 mV に電位固定した状態で 70 mV、2 msec の脱分極刺激を加え、標本のシナプス電流を記録した。シナプス電流記録終了後、その実験に用いられた標本が抑制性孤立神経細胞であるかどうかを bicuculline 投与によ

って同定した。その結果、BDNF 投与群では、有意に eIPSCs の増強が起こっていた。また、この増強作用は抗 TrkB 抗体投与によって有意に阻害されていた。

2. BDNF は二発刺激による eIPSCs の対刺激反応比には有意な変化はなかった。

BDNF の抑制性神経細胞に対する eIPSCs の増強効果が、シナプスのどの部位に作用するのかを明らかにするため、連続した二発の脱分極刺激をそれぞれ 25 msec、50 msec、100 msec、200 msec、400 msec の間隔で加え、それぞれ eIPSCs の対刺激反応比をコントロール群と BDNF 投与群で検討した。もし、有意な変化が観察されれば、BDNF の抑制性神経細胞に対する eIPSCs の増強効果は、シナプス前部からの神経伝達物質放出確率など、シナプス前部の活動性に作用すると考えられるが、実際は、有意な変化は観察されなかった。

3. BDNF は微小抑制性後シナプス電流 (mIPSCs) の頻度を上昇させ、mIPSCs の振幅を変化させなかった。

2 の結果から、BDNF の抑制性神経細胞に対する eIPSCs の増強効果が、シナプスの後部に作用するのかを明らかにするため、微小抑制性後シナプス電流 (mIPSCs) を記録し、その頻度と振幅を解析した。その結果、mIPSCs の頻度の上昇が観察されたが、その振幅には有意な変化は見られなかった。この結果と 2 の結果から、BDNF の抑制性神経細胞に対する eIPSCs の増強効果は、シナプス伝達効率と言うよりは、抑制性神経細胞のシナプスの数を増加させると考えられた。

4. 樹状突起の形態学的定量解析を行ったところ、BDNF は樹状突起の分岐およびシナプス数を増加させることが明らかとなった。

BDNF の形態学的な作用を調べるため、神経細胞の樹状突起に存在する MAP2 に対する抗 MAP2 抗体を利用した免疫染色法で樹状突起を染色し、形態学的定量解析を行った。その結果、BDNF 投与群では、樹状突起の分岐と長さ、および、その数、細胞体の面積が増加していた。また、シナプス前部に存在する synapsin I に対する抗 synapsin I 抗体を利用した免疫染色法で、シナプス前部の数を比較したところ、BDNF 投与群では、有意な増加が見られた。更に、確かに活動性のあるシナプス数が増加しているかどうかを検討するため、シナプス活動依存的にシナプス前部を染色する FM 1-43 蛍光指示薬を使用して活動性のあるシナプス数を比較したところ、やはり BDNF 投与群では、有意なシナプス数の増加が見られた。

〔総括〕

以上の結果から、抑制性神経細胞への BDNF の慢性投与は、TrkB 受容体を介して、抑制性シナプスの数を増加させることによって抑制性シナプス伝達を増強することが、機能的にも形態学的にも示された。また、形態学的な解析から、抑制性神経細胞への BDNF の慢性投与は、抑制性神経細胞の樹状突起の成長をも促進させることが示唆された。今後は、BDNF 慢性投与によって促進される抑制性細胞のシナプス数増加、および、形態学的促進作用は、神経回路網形成においてどのように興奮性神経細胞に影響を与えるのか。また、BDNF は活動依存的に興奮性神経細胞から放出されることがわかってきているので、活動依存的に BDNF が放出された場合の抑制性神経細胞への作用などより発展的な研究が期待される。

論文審査の結果の要旨

脳由来神経栄養因子 (略称 BDNF) は大脳皮質においてシナプス可塑性に関与することが知られているが、抑制性シナプス伝達への作用に関しては報告が一致していない。この原因の一つは、従来の研究では興奮性シナプスの混入した標本を使用し、興奮性シナプスへの作用が混入したためであると考えられる。そこで、本研究では、グリア微小島の上に GABA ニューロンを一個だけ培養した孤立神経細胞培養標本を使い、GABA 性シナプス伝達に対する BDNF 慢性投与 (10-15 日間) の影響を検討した。BDNF (100 ng/ml) の慢性投与は誘発抑制性後シナプス電流 (略称 IPSCs)

の振幅を増大したが、この作用は BDNF の高親和性受容体 TrkB の機能阻害抗体によって阻止された。次に、この BDNF の作用が如何なるメカニズムによるのかを電気生理学的に解析したところ、単に神経伝達物質放出の増加やシナプス受容体感受性の増大ではなく、シナプス数の増加によることを示す結果を得た。更に、樹状突起の形態学的解析を行ったところ、BDNF は樹状突起の分岐およびシナプス数を増加させることが明らかとなった。BDNF のこのような GABA ニューロンに対する作用は、従来知られていなかった新知見であり、本研究は学位に値するものと認められる。