

Title	Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex
Author(s)	伊丹, 千晶
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45966">https://hdl.handle.net/11094/45966</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	伊 丹 千 晶
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 18995 号
学位授与年月日	平成 16 年 8 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex (発達期マウスバレル皮質に存在するサイレントシナプスの脳由来神経栄養因子による活性化)
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〕脳は神経細胞同士がシナプスと呼ばれる構造を介し互いに情報伝達を行うことによって機能しているが、シナプスの発達には遺伝因子と環境因子によって大きく左右される。神経回路網が形成される発生初期、遺伝情報によって形成される回路網はかなり大まかで、その後活動をしない無駄な神経細胞が排除される過程で環境に適応した回路網の再形成がなされると考えられている。活動依存的なシナプス発達は、臨界期と呼ばれる外的刺激に対して感受性の高い時期に劇的な変化をとげ、この時期に獲得された変化は生涯にわたり保持される。臨界期には幼弱なシナプスが外からの刺激、すなわち神経活動によって成熟したシナプスに変化すると考えられているがその詳細は不明である。この時期、頬髭からの情報を処理する大脳のバレル領域をはじめとする脳の様々な領域の興奮性シナプスには、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のみ未熟なシナプスが存在し、一般にこのようなシナプスは  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体も含む活性型のシナプスに対してサイレントシナプスと呼ばれる。臨界期のバレル領域には脳由来神経栄養因子 (BDNF) ならびにその受容体 TrkB の高度な発現が認められているが、このような BDNF はシナプスの発達と可塑性に重要であることが示されている。本研究では、内在性の BDNF がバレル皮質 IV 層細胞のサイレントシナプスを活性型シナプスに変換する過程に必要である可能性について検討した。

〔方法ならびに結果〕実験は視床・皮質間の線維連絡を維持した体性感覚野の切片標本を出生直後のマウスより作製して行った。視床の体性感覚中継核 (VB 核) 刺激により誘発される単シナプス性の興奮性シナプス電流 (EPSC) を第 IV 層よりホールセル電極を用いて記録した。今回我々は BDNF ノックアウトマウスの視床-皮質投射経路の興奮性ニューロンのサイレントシナプスを用い、前記の可能性について検討し、以下の結果を得た。

1. AMPA 受容体あるいは NMDA 受容体を介する反応の failure rate の差からサイレントシナプスの寄与率を推定した。野生型ではその寄与率は発達に従い減少していたが、BDNF 欠損型では同様の減少は認められなかった。野生型標本に比べて、欠損型にはサイレントシナプスが豊富に存在していた。
2. ペアリング刺激によってサイレントシナプスが活性型に変わる割合を比較したところ、BDNF 欠損型では有意に低く、活性型シナプスに変換できないことが示された。

3. BDNF 欠損型のサイレントシナプスは、外因性に BDNF を投与することにより、AMPA 受容体を発現する部分的な活性型シナプスに変換された。
4. BDNF 欠損型のサイレントシナプスは、外因性の BDNF の投与、およびペアリング刺激を同時に加えることによって完全な活性型シナプスとなった。
5. パッチ電極より膜非透過性のチロシンキナーゼ活性阻害剤、K252b を直接投与すると、野生型のサイレントシナプスは活性化されなかった。このことから、BDNF の作用部位はシナプス後細胞に存在することが示された。
6. 同様に、パッチ電極より膜非透過性  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤、BAPTA を投与することにより、野生型のサイレントシナプスは活性化されなかった。このことから、BDNF 依存的なサイレントシナプスの活性化には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度上昇が必要であることが示唆された。
7. サイレントシナプスの活性化は、AMPA 受容体のシナプス膜上輸送の制御により起こり、AMPA 受容体のサブユニット GluR1 の c 末端での相互作用が重要であると考えられている。BDNF 依存的なサイレントシナプスの活性化は、AMPA 受容体のシナプス膜上輸送が重要であることを GluR1 の c 末端 9 残基ペプチドをパッチ電極より投与する阻害実験により確かめた。

〔総括〕以上の結果から、シナプスの成熟には神経活動に加えて BDNF が関与することが明らかとなった。従来サイレントシナプスが活性型のシナプスに変換される過程について盛んに研究が行われてきたが、BDNF の関与については全く情報がなかった。今回の研究成果からこれまでシナプスの可塑性に関与すると考えられていた BDNF が発達期のシナプス成熟にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。神経活動と BDNF との相乗効果が発揮される仕組みの解明は今後の重要な課題であるが、本研究によって、シナプス後部のカルシウム濃度の上昇が重要であること、AMPA 受容体の細胞内輸送の制御に問題をとく鍵があることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者は脳由来神経栄養因子 (BDNF) と発達期の神経回路の可塑的変化の研究を一貫して行ってきた。齧歯類の大脳皮質体性感覚野にはバレル領域と呼ばれる部位が存在し、ここは各類髯を受容野として皮質上に体部位再現している。皮質への感覚情報の入力視床を介するが、視床・皮質投射の神経結合の形成には神経活動に依存したシナプス活動が重要である。幼弱な動物の中枢神経系には、解剖学的にはシナプス構造を呈するにもかかわらず、シナプス伝達を行わないシナプス (サイレントシナプス) があり、このシナプスが機能的な活性型シナプスに変換されるためには環境因子が重要な役割を果たすと考えられている。一方、発達期のバレルニューロンには、シナプス調節因子として BDNF が発現している。これまでに、出生直後の BDNF 欠損マウスより、視床・皮質投射経路を含む脳切片標本を用いた細胞外記録及び光学測定実験を行い、内在性の BDNF はバレル皮質 4 層細胞のサイレントシナプスを活性型シナプスに変換する過程に必要である可能性を示した。この可能性をさらに詳細に検討する目的で、視床 (VB) 刺激により誘発される単シナプス性のシナプス電流を第 4 層よりホールセル電極を用いて記録し、サイレントシナプスの寄与率を推定した。野生型ではその寄与率は発達に従い減少していたが、欠損型では同様の減少は認められなかった。さらに、ペアリング刺激によるサイレントシナプスの活性化率を比較したところ、欠損型では有意に低いことが分かった。これらのことから、BDNF はサイレントシナプスの変換過程に直接関与していることが示唆された。これまで、BDNF はシナプス伝達や LTP (Long-term potentiation) として知られる長期増強現象を修飾するという面では調べられておらず、発達期のサイレントシナプスにおける活性化という観点から報告されていなかったが、BDNF が神経の活動と相乗的に作用しあうことによって興奮性シナプスの発達に関与していることを見出した。サイレントシナプスの活性化に対する BDNF のこのような機能は新しい知見であり、発達期の調節因子としての機能を明らかにしたことにより本研究は学位に値するものと認められる。