

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500279
 研究課題名(和文) 小脳核抑制性シナプスの発達過程におけるセロトニンを介した制御機構
 研究課題名(英文) Roles of 5-HT-induced modulation in development on rat deep cerebellar nuclei neurons
 研究代表者 齋藤 文仁 (SAITOW FUMIHITO)
 日本医科大学・医学部・講師
 研究者番号： 20360175

研究成果の概要：

本研究の目的は小脳核抑制性シナプス伝達におけるセロトニンの発達過程での役割を解明することにあった。第一にセロトニンがどのような分子基盤により修飾作用を示すかを明らかにした。この成果は学術論文として報告した。これらの結果に基づき、発達過程における小脳核GABA作動性シナプスの性質を精査した。小脳核GABA作動性シナプスは発達過程において有意な変化が見いだされ、幼弱期におけるセロトニンとGABA作動性シナプスの制御が重要な役割を果たしている可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

小脳核は小脳皮質の情報を統合して、さらに新たな入力・制御を受けて高次処理に送られる重要な部位であると考えられる。しかし、

小脳核シナプスは皮質のシナプス研究に比べると、シナプス機構やその修飾作用の研究例は少なく、神経疾患との関連についても、あまり着手されていない領域である。その理

由の一つは小脳核神経細胞を視認できるような標本作製の技術や標本の保存方法など、技術的な困難があったものと考えられる。著者は申請に先駆けて、小脳核神経細胞から安定したシナプス応答記録が可能な方法を確立して、げっ歯類小脳核の GABA 作動性シナプス応答とセロトニン (5-HT) による修飾作用の観察に着手した。そこで、いくつかの予備的結果を得ていた。そのなかで小脳皮質からの GABA 作動性入力に幼弱期(およそ生後 2 週)までは 5-HT により精細に制御されていることが示唆された。正常な小脳機能発現に重要な役割をしていると考えられるので、5-HT 受容体を介する GABA シナプス制御機構の分子基盤解明と発達変化に伴う GABA 作動性シナプスの生理的役割を明らかにすることをめざし、研究提案をおこなった。

2. 研究の目的

(1) 小脳核 GABA シナプスの 5-HT による修飾作用に關与する分子基盤の解明。小脳核における GABA 作動性シナプスの 5-HT による修飾作用は未だ報告例がないので、この GABA 放出抑制作用にかかわる情報伝達系の解明とその関連分子までを明らかにする。

(2) 発達過程における小脳核 GABA シナプスの 5-HT による修飾作用と GABA_A 受容体の機能変化の分子基盤解明。発達過程において抑制性シナプス伝達はどのような変化を起こすのか、修飾作用の変化が何によって引き起こされるのかを明らかにする。

(3) 小脳核における GABA シナプスの発達変化と 5-HT による修飾作用の役割の解明。上記の目的(1)、(2)から得られた知見をもとに発達障害性の疾患、とくに小脳が責任部位の一つであると考えられている自閉症等の疾患・病態の発症機構にこれらの発達過程の不

全が關与していないか、モデル動物を用いて検討を試みる。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的手法を用いた小脳核 GABA 作動性シナプス応答、膜電位の測定。1～3 週齢のラットより小脳切片を作製し、小脳核神経細胞に電気生理学的手法のホールセルパッチクランプ法を適用する。小脳核神経細胞における GABA 作動性シナプス後電流 (IPSC) をプルキンエ細胞の神経終末部を電気刺激することにより測定する。

(2) ウェスタンブロット・定量的 PCR による GABA 受容体サブユニットの定量的解析。発達過程にともなう GABA 受容体の変化を α サブユニットに着目して定量的解析をおこなった。生後 2 週齢と 3 週齢前後のラットから得られた小脳核領域を用いた。

(3) 選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) を用いたモデル動物作成。生後間もない幼弱動物に対して、脳内セロトニン動態を変化させる目的で SSRI であるフルオキセチンを皮下に 1 週間慢性投与した。その後、電気生理学的測定によりモデル動物における異常の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 本研究の目的は小脳核抑制性シナプス伝達におけるセロトニンの発達過程での役割を解明することにあった。第一にセロトニンがどのような分子基盤により修飾作用を示すかを明らかにし、以下の結果を得た。

- ① 小脳核における GABA 作動性シナプスは神経終末において、5-HT_{1B} 受容体活性化に伴い、GABA 放出を抑制する (図1)。
- ② セロトニンは GABA シナプス終末だけではなく、小脳核主細胞においても発現が認められ、セロトニン投与により細胞膜は脱

分極を引き起こした。この作用には5-HT₅受容体が関与していることが明らかになった (図1と図2)。

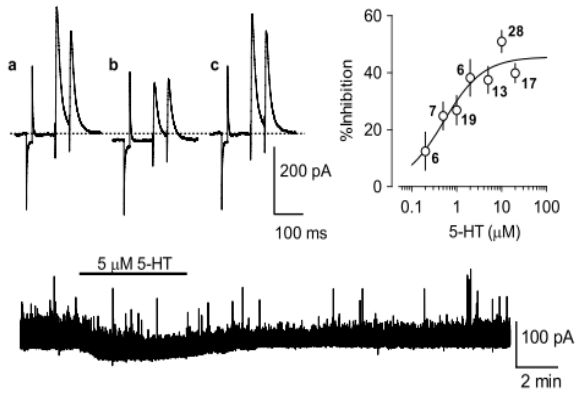


図1 5-HT 灌流投与によるシナプス電流と小脳核主細胞の膜電流変化

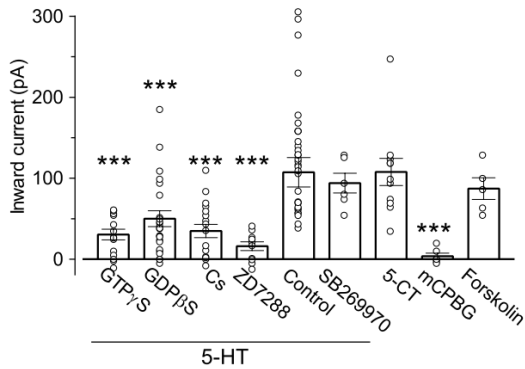


図2 5-HT により誘導される内向き電流はGタンパク質依存性であり過分極活性型陽イオン (HCN) チャンネルにより引き起こされる。

③ 以上の結果から、より生理的な条件でセロトニンの役割を調べた結果、セロトニンは小脳核主細胞を脱分極させることにより、自発的な発火を促進させ、なおかつGABA作動性シナプス活動により惹起される脱分極 (跳ね返り脱分極) による発火の寄与を減弱させると結論づけた (図3)。

5-HTは小脳皮質からのGABA抑制の程度を制御 (gain-control) し、同時に小脳核神経の発火頻度の調節も行っていると考えられる。この成果は学術論文として報告した (Saitow et al., J Neurophysiol, 2009)。本研究を報告後、専門誌よりセロトニンと小脳核の関係について総説執筆依頼を受けた。ゆえに小脳研究の分野において新規性ある、インパクトある研究を遂行できたと考えられる。

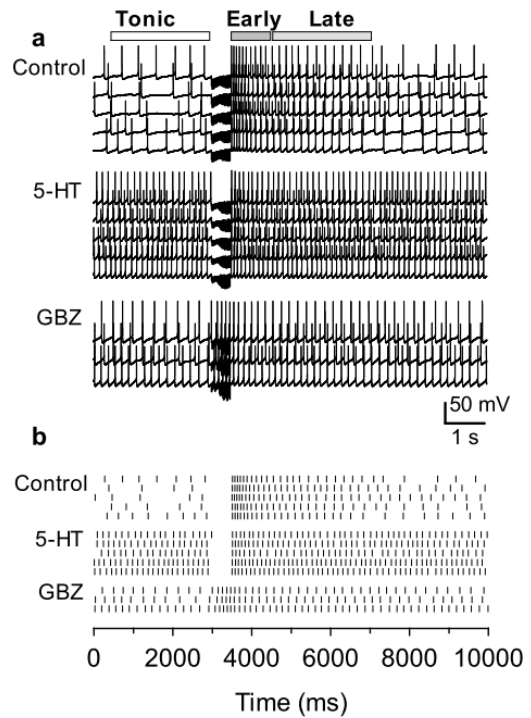


図3 跳ね返り脱分極に対する5-HTの効果。5-HTは小脳核神経細胞の発火頻度を上昇させるため、抑制性シナプス伝達による跳ね返り脱分極で起こる発火の効果をマスクしてしまう。

(2) (1)の結果に基づき、発達過程における小脳核抑制性シナプスの性質を精査した結果、次の作用が発達過程にあることが解った。

① GABA_A受容体を介するシナプス応答は発達変化に伴い、そのシナプス電流のキネティクスが変化する。

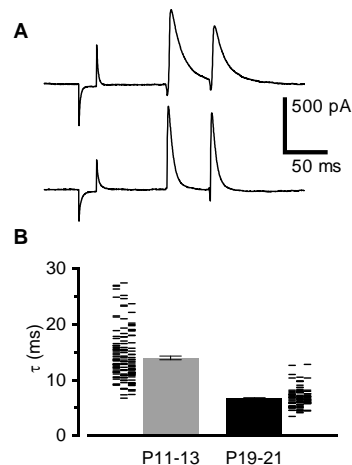


図4 発達依存的IPSCキネティクスの変化。発達にともないGABA作動性シナプス電流応答は速くなる。

- ② GABA放出抑制に関わる修飾作用は発達に伴い、セロトニン感受性が弱くなる。

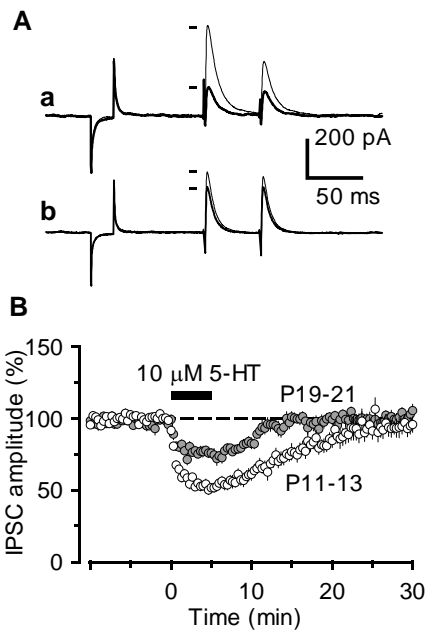


図5 5-HTによるIPSCの抑制効果発達依存的にその大きさが減弱する。生後2週間前後と3週間前後の動物から得られるシナプス間では有意に5-HT感受性が異なる。

①について、薬理学、生化学的な実験を行った結果、GABA_A受容体サブユニットの発現パターンの変化があることが明らかになった。具体的には α_1 、 α_2 サブユニットそれぞれが幼弱期には α_2 が多く α_1 が少ないが約10日後には逆に α_1 サブユニットが多くなることが分かった。

②はシナプス終末の構造的・機能的な変化が関与している可能性を示す結果を得ている。これら2つの事象がセロトニンを中心とした制御機構によって起こっているのかを調べるための発展的研究を現在検討中である。以上のように発達過程における有意な変化が見いだされたことから、これらの結果をまとめて、現在学術論文に投稿準備中である。

- (3) これらの結果に基づき、発達過程においてGABA作動性シナプス伝達や小脳核神経細胞の興奮性の調節にセロトニンが重要な役割を果たしている可能性が強く示唆されたので、脳内セロトニン動態を変化させ、どのような異常が引き起こされ、それがどのような病態を呈するかを検討することを始めた。

この研究課題は残念ながら、研究計画中に修了することが出来なかった。これまで何例かの実験を行ったが、現時点ではSSRIを投与した動物群では顕著な変化を検出するには

至っていない。しかし、依然として自閉症など小脳の一部、異常所見の見られる病態を呈するモデル動物の研究ではセロトニン動態の異常が報告されている。今後は実験方法を再検討して、セロトニン以外のカテコールアミン系の修飾作用なども考慮して研究をすすめる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

Saitow F, Murano M, Suzuki H. Modulatory effects of serotonin on GABAergic synaptic transmission and membrane properties in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol*, 査読あり、101: 1361-1374 (2009).

Matsumura T, Sakai A, Nagano M, Sawada M, Suzuki H, Umino M, Suzuki H. Increase in hemokinin-1 mRNA in the spinal cord during the early phase of a neuropathic pain state. *Br J Pharmacol*, 査読あり、155: 767-774 (2008).

Ikeda Y, Yahata N, Ito I, Nagano M, Toyota T, Yoshikawa T, Okubo Y, Suzuki H. Low serum levels of brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor in patients with chronic schizophrenia. *Schizophr Res*, 査読あり 101: 58-66 (2008).

Nagano M, Ozawa H, Suzuki H. Prenatal dexamethasone exposure affects anxiety-like behaviour and neuroendocrine systems in an age-dependent manner. *Neurosci Res*, 査読あり、60: 364-371 (2008).

[学会発表] (計 8件)

伊藤浩志ほか、慢性拘束ストレスによるマウス行動亢進と帯状回シナプス可塑性増大。第82回日本薬理学会年会、横浜、2009. 3

Saitow F et al., Role of 5-HT-induced modulation and inhibitory transmission in development of rat deep cerebellar nuclei neurons. *Society for Neuroscience 2008*, (Washington DC, USA), 2008. 11.

村野光和ほか，小脳核グルタミン酸作動性シナプスにおけるセロトニンの役割. 第 119 回日本薬理学会関東部会、東京、2008. 10

齋藤文仁ほか，小脳核 GABA 作動性シナプスにおける 5-HT と発達変化の役割. 第 31 回日本神経科学大会、東京、2008. 7.

村野光和ほか，小脳核グルタミン酸作動性シナプスにおけるセロトニン受容体を介したシナプス可塑性の調節. 第 31 回日本神経科学大会、東京、2008. 7

永野昌俊ほか，妊娠時デキサメサゾン投与が子の行動と神経内分泌系に与える影響の長期観察. 第 31 回日本神経科学大会、東京、2008. 7

Ikeda Y et al., Serum neurotrophic factor levels are associated with pathophysiological features of schizophrenia. 7th IBRO World Congress of Neuroscience (Melbourne, Australia), 2007. 7.

齋藤文仁ほか，小脳核における 5-HT 受容体を介した修飾作用. 第 85 回日本生理学会大会、東京、2008. 3.

〔図書〕 (計 1 件)

Konishi S, Ono Y, Zhu X, Kuriu T, Tominaga T, Saitow F. Neuron-Glia communication: Involvements of glial cells in synaptic transmission. Trends in Glial Research-basic and Applied (Research Signpost), 査読なし、pp139-152 (2007).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日本医科大学・医学部・講師

齋藤 文仁

研究者番号: 20360175

(2) 研究分担者

日本医科大学・医学部・講師

永野 昌俊

研究者番号: 60271350