

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21500375

研究課題名（和文） モノアミン・セクレチンで制御されるシナプス伝達とその異常

研究課題名（英文） Roles of monoaminergic and secretinergic regulations of synaptic transmission in cerebellar inhibitory synapses

研究代表者

齋藤 文仁 (SAITOW FUMIHITO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20360175

研究成果の概要（和文）：

モノアミン（ノルアドレナリン、ドパミン）とペプチド性修飾物質、セクレチンによるシナプス修飾機構について、小脳核、小脳皮質シナプスを用いて調べた。小脳核種細胞に入力するグルタミン酸シナプスはノルアドレナリン、ドパミンにより、放出抑制が起こる。この作用には選択的に $\alpha_2$ -アドレナリン受容体、ドパミンD2受容体に作用するだけでなく、クロストークにより異種受容体に対しても作用することが明らかになった。また、小脳皮質 GABA 作動性シナプスにおいて脂質代謝を介したIP<sub>3</sub>産生とそれに続く細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇を示す新規のシナプス修飾作用を見出した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined a role of monoamines (noradrenaline (NA) and dopamine (DA)) and secretin on the synaptic transmission using rat cerebellum. 1) Pharmacological study revealed that presynaptic  $\alpha_2$ -adrenergic ( $\alpha_2$ -AR) and D2-like receptors (D2R) were activated by both NA and DA. Therefore, it is thought that cross-talk between these receptors play a role of sharing the modulatory action involving distinct monoaminergic controls in the cerebellum. 2) It is well known that neuropeptide secretin increases GABA release involving an activation of cAMP-PKA signal cascade onto inhibitory synapses at the cerebellar cortex. We found that new form of synaptic modulation involving the activation of PLC-IP<sub>3</sub> signal pathway at GABAergic synaptic terminals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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・筋肉生理

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞間シナプス伝達の異常は個体レベルでどのような異常（病態）として表現されるのだろうか？これに答えるためには正常な状態で備えられている機能をまず明らかにして、それらの知見を応用することが病態の理解、治療方法の開発に貢献すると考えた。モノアミン類や神経ペプチドは神経伝達物質として標的細胞を制御するだけでなく、神経伝達の修飾物質として情報伝達の調節、維持に関与している。この調節系の破綻はうつ病や統合失調症などの精神疾患として表れることが知られている。一方、発達障害であり精神疾患である自閉症は、多くの表現型を有し、「スペクトル」という概念で病態を把握する必要がある症候群である。そのため、療法も多岐にわたり、行動療法に加えて、少量の L-DOPA や抗精神病薬であるドーパミン受容体遮断薬およびセロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) などの薬物療法が奏功するという報告がある。これらの事実は自閉症様の病態にドーパミンおよびセロトニン神経系が関与していることを示唆する。さらに、本研究で扱う小脳（小脳皮質と小脳核）は自閉症の異常所見として低形成やプルキンエ細胞の脱落が認められる責任部位の一つであるので、これらモノアミン系のシナプス制御基盤を確立するために、ラット小脳核におけるモノアミンによるシナプス制御機構の解明に着手し、GABA 作動性シナプス応答に対するセロトニン (5-HT)、グルタミン酸作動性シナプス応答に対するドーパミン(DA)の修飾作用について予備的結果を得ていた。一方、モノアミン系の薬物治療と異なり、セクレチンが Horvath らの報告 (*J Assoc Acad Minor Phys* 1998) 以後、自閉症患者に対して用いられて注目を集めるようになった。セクレチンは脳内でも生合成、分泌される 27 個のアミノ酸からなるポリペプチドである。小脳をはじめ、大脳皮質、視床、視床下部などにも存在しており、その受容体の存在も明らかにされている。しかし、セクレチンの治療効果には賛否両論があり、大規模なスタディーでは効果が無いとする報告 (Sandler et al., *N Engl J Med* 1999; Esch et al., *J Autism Dev Disord* 2004) もある。これは、自閉症がさまざまな病因に基づく症候群で

あるが故に、一括りに同じ治療方法が不可能であることを意味している。なぜなら、セクレチン受容体欠損動物は海馬 CA1 領域におけるシナプス可塑性や社会的あるいは認知行動に異常を示し、自閉症様の病態を形成するという報告がある (Nishijima et al., *Hum Mol Genet* 2006)。しかし、セクレチンを欠損した動物においては、上記のような行動異常などは見られずに、シナプス可塑性にのみ異常があったという報告もある (Yamagata et al., *Neuroscience* 2008)。この場合、セクレチン欠損に伴って血管作動性腸管ポリオペプチド (VIP) や PACAP などの神経ペプチドが相補的に働いた可能性もあり、部位特異的、とくに小脳におけるシナプス可塑性や運動機能に関する視点からの研究課題は残されたままである。また、セクレチンが中枢神経系で DA・5-HT 代謝回転を活性化するという結果もある (Toda et al., *Brain Dev* 2006)。以上のことから、何らかの発達障害によりセクレチン系あるいはモノアミン系に異常があった場合には、自閉症様の病態を示す可能性が大いに考えられる。本提案研究で扱う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り、セクレチンおよびセクレチン受容体を多く発現しており、上述のようにモノアミン系制御機構も有しているため、十分に自閉症治療薬の作用点となりうる部位であると考えた。

## 2. 研究の目的

以下の 2 項目を研究目標とした。

- (1) 小脳（小脳皮質と小脳核）シナプスにおけるモノアミン（セロトニンとドーパミン）と神経ペプチドであるセクレチンによるシナプス制御機構の解明と発達過程におけるこれらの修飾物質の役割を明らかにする。
- (2) モノアミンやセクレチン動態変化によってシナプス伝達機能がどのように変化するのか、また動物行動学的にどのような異常が起こるかを検討し、自閉症様病態におけるセクレチンが奏功する可能性があるか検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) 電気生理学的手法を用いて、小脳シナプ

ス応答におけるモノアミンおよびセクレチン受容体を介した修飾作用を調べる。2～3週齢のラットより小脳切片を作製し、小脳核および皮質の神経細胞にホールセルパッチクランプ法を適用した。小脳核神経細胞における GABA 作動性シナプス後電流 (IPSC) は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した。グルタミン酸作動性シナプス電流は、苔状線維を電気刺激して、EPSC を記録した。皮質における GABA 作動性 IPSC はプルキンエ細胞の膜電流を記録し、皮質介在神経細胞を刺激することで記録した。

- (2) セクレチンによる GABA 作動性神経終末のカルシウム動態を光学的に検出した。GABA 作動性介在神経細胞に細胞体から  $Ca^{2+}$  指示薬を拡散、導入し、セクレチン灌流投与で引き起す神経終末の  $Ca^{2+}$  変動を定性的に検出した。

#### 4. 研究成果

- (1) モノアミン受容体を介したグルタミン酸作動性シナプス修飾作用

小脳核神経細胞において、電気刺激により誘発された興奮性グルタミン酸作動性シナプス後電流 (EPSC) の振幅は、NA、DA (Fig. 1) の灌流投与により用量依存的、可逆的に抑制された。この反応はともにシナプス前終末の  $\alpha_2$  アドレナリン受容体 ( $\alpha_2$ -AdR)、D2 様ドーパミン受容体 (D2R) の活性化を介していた。

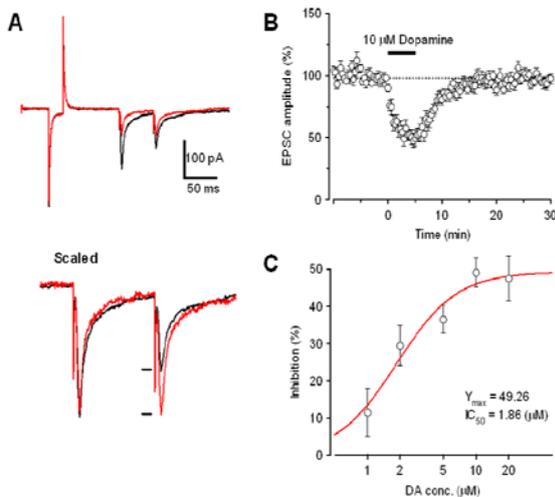


FIG. 1. DA による EPSC の抑制作用

しかし、シナプスの約 40% は選択的 D2R アゴニスト、Quinpirole (QPR) でシナプス抑制

効果を示さなかったが、DA では全てのシナプスにおいて、抑制効果が見られた。また、D2R アンタゴニストの Sulpiride 存在下でも DA によりシナプス抑制作用が見られた。このことから、QPR 感受性 (D2R) 以外の DA 受容体が考えられるが、 $\alpha_2$ -AdR アンタゴニスト存在下では、DA と QPR による抑制作用の間には強い相関があり、DA により抑制作用を示さないシナプスは QPR に対しても抑制作用を示さないことがわかった。以上の結果より、DA は  $\alpha_2$ -AdR に対しても親和性を有すると考えられる。さらに、 $\alpha_2$ -AdR アンタゴニスト RS79948 存在下で、NA により抑制作用を示すシナプスが 25% (5/20) 見られ、DA 投与でも約 50% (10/21) が抑制作用を示した。すなわち、NA によるシナプス抑制作用についても、D2R とのクロストークを起こす可能性が示された。QPR 反応性の割合と若干のずれがあるが、これらの結果から、小脳核主細胞にシナプスを形成する苔状線維神経終末の D2R は不均一な発現を示し、およそ 40% のシナプス終末が D2R 受容体を発現していないと考えられる (Fig. 2A)。さらに NA、DA は選択的に  $\alpha_2$ -AdR、D2R に作用するだけでなく、クロストークにより異種受容体に対しても作用することが示唆された (Fig. 2B)。

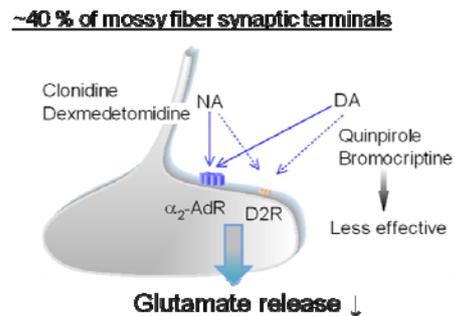


Fig. 2A

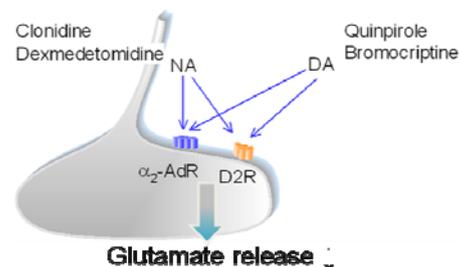


Fig. 2B

- (2) セクレチンを介した小脳皮質 GABA シナプスの新たな増強機構

神経ペプチドであるセクレチンによる小脳皮質 GABA シナプス増強作用はすでに、先行研究があり、これまでセクレチンは cAMP をセカンドメッセンジャーとしたシグナルカスケードを介して、シナプス修飾を行っていると考えられていた。しかし、今回我々はこれとは別に PLC-IP<sub>3</sub> 系の情報伝達経路が関与している可能性を薬理学的実験から得た。すなわち、先行論文では A キナーゼ (PKA) 依存的なリン酸化により、GABA 放出増強が起こるとされてきたが、PKA 阻害薬存在下でも、このシナプスは増強作用を示すことが分かった (Fig. 3)。

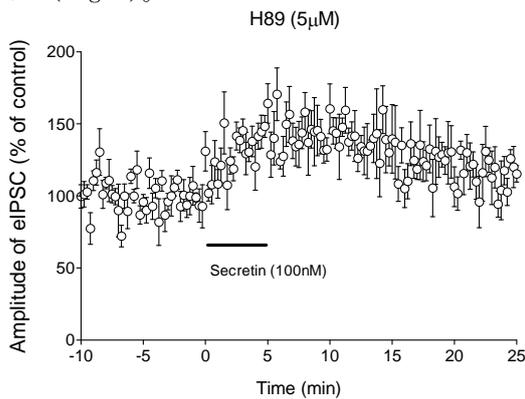


Fig. 3: PKA 阻害薬存在下におけるセクレチンの効果

消化器系におけるセクレチンはすでに、PKA の経路のみならず、PLC-IP<sub>3</sub> 系の経路が提唱されていることから、シナプス前終末のカルシウム動員を阻害する薬理学的実験を行った。細胞内 Ca<sup>2+</sup>貯蔵の Ca<sup>2+</sup>-ATPase の阻害薬 Cyclopiazonic acid を投与すると、有意にセクレチンによる増強作用は抑制された (Fig. 4)。

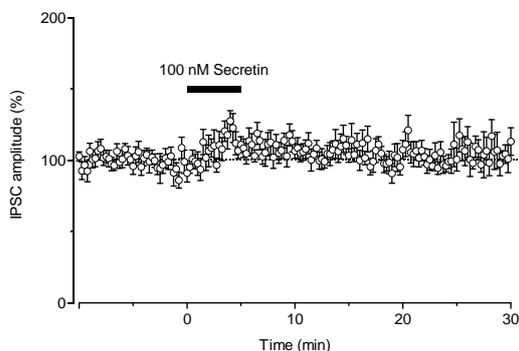


Fig. 4: セクレチン修飾作用に対する Cyclopiazonic acid の効果

また、蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬によるカルシウムイメ

ージングでも、セクレチンはシナプス前終末の Ca<sup>2+</sup>上昇を引き起こすことが明らかになった。そのキネティクスは振動型と持続性上昇型の 2 つの Ca<sup>2+</sup>上昇パターンが存在していた。このキネティクスの違いが何に起因しているのかは今後の課題である。

##### 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 6 件)

Ito H, Nagano M, Suzuki H, Murakoshi T Chronic stress enhances synaptic plasticity due to disinhibition in the anterior cingulate cortex and induces hyper-locomotion in mice. *Neuropharmacology*, 58: 746-757 (2010)

Murano M, Saitow F, Suzuki H Modulatory effects of serotonin on glutamatergic synaptic transmission and long-term depression in the deep cerebellar nuclei. *Neuroscience*, 172: 118-128 (2011)

Nagano M, Oishi T, Suzuki H. Distribution and pharmacological characterization of primate NK-2 tachykinin receptor in the central nervous system of the rhesus monkey. *Neurosci Lett* 503: 23-26 (2011)

Kumagai M, Nagano M, Suzuki H, Kawana S. Effects of stress memory by fear conditioning on nerve-mast cell circuit in skin. *J Dermatol* 38: 533-561 (2011)

Hirono M, Saitow F, Kudo M, Suzuki H, Yanagawa Y, Yamada M, Nagao S, Konishi S, Obata K. Cerebellar globular cells receive monoaminergic excitation and monosynaptic inhibition from Purkinje cells. *PLoS One*, 7: e29663 (2012)

Gocho Y, Sakai A, Yanagawa Y, Suzuki H, Saitow F. Electrophysiological and pharmacological properties of GABAergic cells in the dorsal raphe nucleus. *J Physiol. Sci*, 63: 147-54 (2013)

[学会発表] (計 16 件)

Saitow F et al., Monoaminergic cross-talk and modulatory action of synaptic transmission in the deep cerebellar nuclei. 36回IUPS (国際生理学大会) 2009.7.28 京都国際会議場

齋藤文仁ほか 小脳核グルタミン酸作動性シナプスにおけるモノアミンを介した修飾作用 第47回日本生物物理学会年会 2009.10.30 アクティとくしま

佐藤寛栄ほか プルキンエ細胞の脱分極による  
IPSCの抑制第34回日本神経科学大会 2011.9.16 パ  
シフィコ横浜

廣野守俊ほか 小脳グロビュラー細胞へのシナプ  
ス入力の研究第34回日本神経科学大会 2011.9.17  
パシフィコ横浜

永野昌俊ほか マカクザルtachykinin受容体NK-1,  
NK-2, NK-3の中枢での発現分布と薬理学的性質  
第85回日本薬理学会 2012.3.16 国立京都国際会館

Nagano M et al., Effects of early intervention with  
fluoxetine on anxiety-related behaviors induced in  
prenatally glucocorticoid exposed rats. 16th World  
Congress of Basic and Clinical Pharmacology  
(WorldPharma 2010) 2010.7.17-23 Copenhagen,  
Denmark

齋藤文仁ほか 小脳核苔状線維シナプスのセロト  
ニンを介したシナプス可塑性調節機構第87回日本  
生理学会大会 2010.5.19-21 岩手県盛岡市

廣野守俊ほか 小脳プルキンエ細胞から強い抑制  
を受ける顆粒層小型抑制性介在ニューロンの解明  
第87回日本生理学会大会 2010.5.19-21 岩手県盛  
岡市

Saitow F et al., Monoaminergic cross-talk and  
modulatory action of synaptic transmission in the  
deep cerebellar nuclei. 36回国際生理学大会  
2009.7.28 京都国際会議場

齋藤文仁ほか 小脳核グルタミン酸作動性シナプ  
スにおけるモノアミンを介した修飾作用第47回日  
本生物物理学会年会 2009.10.30 アクティとくし  
ま

佐藤寛栄ほか プルキンエ細胞の脱分極による  
IPSCの抑制第34回日本神経科学大会 2011.9.16 パ  
シフィコ横浜

廣野守俊ほか 小脳グロビュラー細胞へのシナプ  
ス入力の研究第34回日本神経科学大会 2011.9.17  
パシフィコ横浜

永野昌俊ほか マカクザルtachykinin受容体NK-1,  
NK-2, NK-3の中枢での発現分布と薬理学的性質  
第85回日本薬理学会 2012.3.16 国立京都国際会館

牛腸義宏ほか マウス背側縫線核に おけるニュー  
ーロンの電気生理学的特性 日本生理学会大会  
2013.03.27-29 タワーホール船堀

齋藤文仁ほか 小脳核苔状線維におけるモノアミ  
ン作動性受容体のク ロストーク活性アミンに関  
するワークショップ 2012.08.24 北海道医療大学

牛腸義宏ほか 縫線核における GABA 作動 性ニュー  
ーロンの形態的特徴と電気生理学的特性の解析  
日本神経科学大会 2012.09.18-21 名古屋国際会議  
場

〔図書〕(計 1件)

Saitow F, Hirono M, Suzuki H. (2012) Serotonin and  
Synaptic Transmission in the cerebellum. In:  
**Handbook of the Cerebellum and Cerebellar  
Disorders**, (eds. Manto M, Gruol DL, Schmahmann  
JD, Koibuchi N, Rossi F.) Springer.

## 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