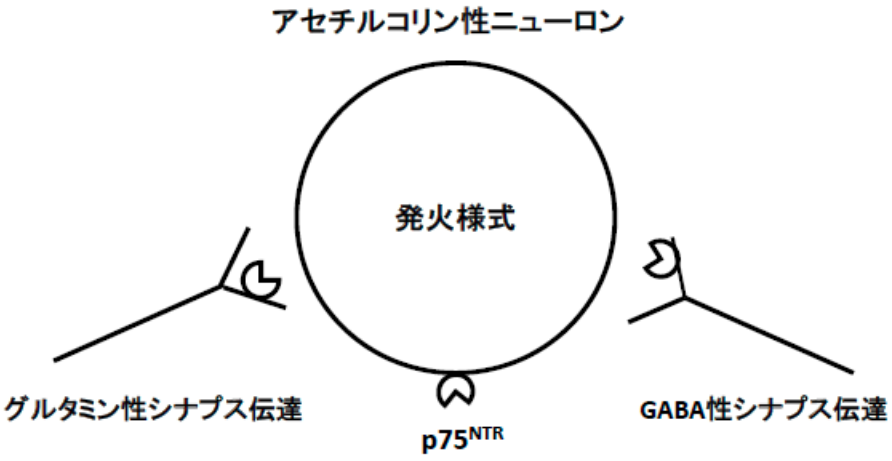
17　運動関連シナプス機能に対する神経栄養因子の作用	籾山　俊彦

【目的】神経栄養因子のいくつかが共通して結合する受容体である p75 neurotrophin receptor 受容体（以下 $p75^{NTR}$）は、中枢神経系において、前脳部のアセチルコリン性ニューロンに特異的に発現している。筆者は $p75^{NTR}$ を同定のためのマーカーとして利用して、同受容体を発現するアセチルコリン性ニューロンへのシナプス伝達制御機構の解析を行ってきた。しかしながら、$p75^{NTR}$ 活性化によって、シナプス伝達およびニューロン活動がどのように修飾されるのかに関しては不明であった。本研究課題では、最近開発された $p75^{NTR}$ に特異的なリガンドを薬理学的ツールとして利用して、同受容体活性化による線条体アセチルコリン性ニューロンへのシナプス伝達およびニューロンの発火に対する修飾作用を電気生理学的に検討した（図）。

【方法】生後 2〜4 週齢のマウスを断頭して脳を取り出し、マイクロスライサーを用いて厚さ 300 ミクロンのスライス標本を作製した。正立型顕微鏡下にスライス標本線条体内のアセチルコリン性ニューロンからパッチクランプ用増幅器を用いてホールセル記録を行った。シナプス電流および活動電位発生に対する、$p75^{NTR}$ 特異的リガンドの作用を検討した。

【結果】$p75^{NTR}$ リガンドにより、アセチルコリン性ニューロンへの興奮性シナプス伝達が抑制され、一方で、抑制性シナプス伝達は増強した。そして、膜電位および活動電位発生に対しては、脱分極作用および発火増大作用を示した。運動制御機能制御、およびその病的状態として、パーキンソン病等の発症機構における神経栄養因子およびその受容体の関与が示唆され、新たな治療法開発にもつながることが期待される。

線条体アセチルコリン性ニューロンへの興奮性（グルタミン酸性）、抑制性（GABA 性）シナプス入力、
神経栄養因子受容体（$p75^{NTR}$）を示す模式図



17. 運動関連シナプス機能に対する神経栄養因子の作用

籾山　俊彦

東京慈恵会医科大学 医学部 薬理学講座

Key words：神経栄養因子，線条体，スライス，パッチクランプ，随意運動制御

緒　言

神経栄養因子（Neurotrophic factor、以下 NF）は、神経系においてニューロンの投射先である標的細胞（シナプス後ニューロン）で産生され、逆行性輸送によって軸索を移動してニューロンに栄養作用をもたらす。p75 neurotrophin receptor 受容体（以下 $p75^{NTR}$）はいくつかの NF が共通して結合する受容体である。前脳部において $p75^{NTR}$ を発現しているニューロンはアセチルコリン性ニューロンのみであることから［1]、著者はこれまでに、$p75^{NTR}$ をニューロン同定のマーカーとして中枢アセチルコリン性ニューロンへのシナプス伝達機構を検討してきた［1，2]。しかしながら、ニューロン、シナプスで生じた $p75^{NTR}$ の変化が、中枢神経系の機能修飾にどのようにつながるのかは不明であり、この理由の 1 つは、ニューロン活動、シナプス伝達をリアルタイムで計測できる電気生理学的研究が欠けていたためと考えられる。

そこで本研究課題では、従来ニューロン同定のためのマーカーとしてのみ利用してきた $p75^{NTR}$ に焦点を当て、大脳基底核の主要な部位であり、随意運動制御に関与する線条体のアセチルコリン性ニューロンへのシナプス伝達、およびニューロンの発火における $p75^{NTR}$ の修飾機能を検討する目的で、マウス脳スライス標本を用いたパッチクランプ法による解析を行った。

本研究では、最近開発された $p75^{NTR}$ 特異的はリガンドである LM11A-31［3］を薬理学的ツールとして利用して、シナプス伝達およびニューロン発火に対する修飾作用の解析を行った。

方　法

ニューロン、シナプスの機能をリアルタイムで評価する目的で、マウス脳のスライス標本を用いたホールセルパッチクランプ記録を行った。生後 2～4 週齢のマウスを断頭して脳を取り出し、マイクロスライサーを用いて厚さ 300 ミクロンのスライス標本を作製した。

正立型顕微鏡下にスライス標本線条体内のアセチルコリン性ニューロンからパッチクランプ用増幅器を用いてホールセル記録を行った。膜電位および活動電位を記録する際は、カリウムベースの電極内液を用いて current-clamp mode にて記録を行い、シナプス電流記録には、セシウムベースの内液を用いて voltage-clamp mode にて記録を行った。シナプス電流は、記録ニューロン近傍に細胞外電気刺激をあたえることによって誘発した。$p75^{NTR}$ 特異的リガンドおよび各受容体ブロッカーは灌流液中に投与した。データは DAT テープおよびコンピューターに保存し、解析ソフトを用いて解析を行った。

結　果

1.　線条体アセチルコリン性ニューロンの同定

アセチルコリン性ニューロンは拡大率 400～600 倍の視野中に 1～2 個（線条体ニューロンの 2%程度）という数の少なさ、および周囲のニューロンと比べて突出した大きさによって、実験中に顕微鏡下で同定可能である［3]。さらに、カリウムベースの電極内液を充填した電極を用いてホールセル記録を行い、current-clamp mode の状態で電位を記録

し、記録電極を通じて過分極性および脱分極性ステップパルス電流を与えることによって、膜電位および活動電位を誘発することができる。この場合、過分極側での整流性、活動電位の後過分極がアセチルコリン性ニューロンの特徴であり（図 1）、電気生理学的にも同定可能である。後述のシナプス電流記録ではセシウムベースの内液を使用することから、活動電位の発生は抑制されるが、過分極側の整流性は保存されることから同定可能である［4］。

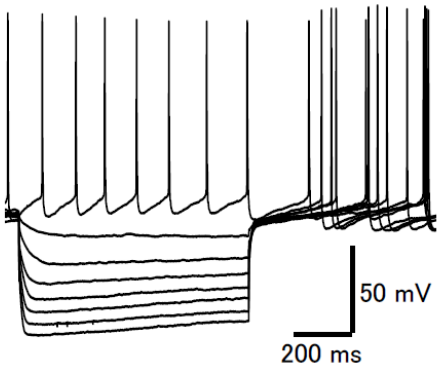


図 1. 線条体アセチルコリン性ニューロンの電気生理学的特性

記録電極を通じて過分極性および脱分極性パルス電流を与えた際の膜電位及び活動電位を示す。
過分極側における整流性が認められる。線条体アセチルコリン性ニューロンの特性である。

2. 興奮性シナプス伝達に対する $p75^{NTR}$ 特異的リガンドの作用

セシウムベースの内液を充填した電極によってホールセル記録を達成後、灌流液中に $GABA_A$ 受容体、グリシン受容体およびNMDA受容体ブロッカーを投与した状態で、voltage-clamp modeにて電流記録を行い（holding potential、−60 mV）、記録ニューロン近傍（50〜150 μm）に細胞外電気刺激（5 秒に 1 回）を与えてシナプス電流を誘発した（図 2）。このシナプス電流は、灌流液中に CNQX（5 μM）を投与することにより遮断されたことから、non-NMDA 受容体を介する興奮性シナプス後電流（excitatory postsynaptic currents、EPSCs）と同定された。

$p75^{NTR}$ 特異的リガンドである LM11A-31（LM、100 μM）を灌流液中に投与すると、EPSCs は 3〜5 分で抑制されて平衡に達し、LM を数分〜10 分洗い流すことによって部分的に回復したが、投与前のレベルには回復しなかった（図 2）。抑制率は 30〜70%であった。

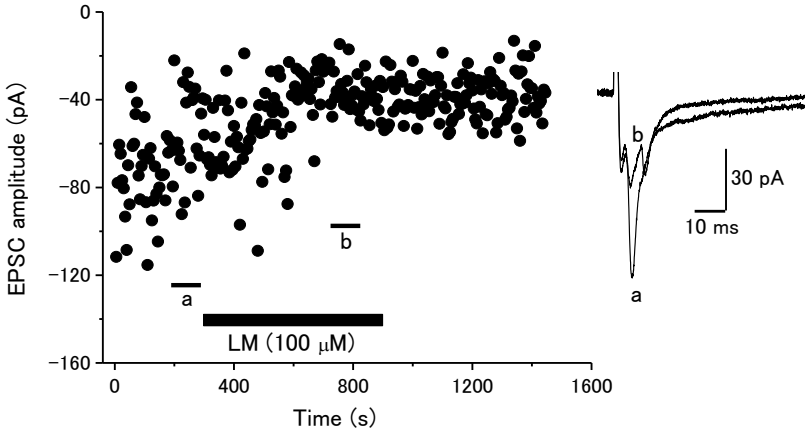


図 2. EPSCs に対する LM の抑制効果

5 秒に 1 回誘発した EPSCs の振幅を時間に対してプロットした。LM の投与時間は図に示した通り。
右側の電流トレースは、図中 a、b の時間（20 発、100 秒）の平均トレースである。

3. 抑制性シナプス伝達に対する p75^{NTR} 特異的リガンドの作用

灌流液中におよびNMDA受容体、non-NMDA受容体およびグリシン受容体ブロッカーを投与した状態で、voltage-clamp modeにて電流記録を行い（holding potential、−60 mV）、興奮性シナプスの場合と同様に記録ニューロン近傍（50〜150 μm）に細胞外電気刺激（5 秒に 1 回）を与えてシナプス電流を誘発した（図 3）。このシナプス電流は、灌流液中に bicuculline (10 μM)を投与することにより遮断されたことから、$GABA_A$ 受容体を介する抑制性シナプス後電流（inhibitory postsynaptic currents、IPSCs）と同定された。

LM（100 μM）を灌流液中に投与すると、IPSCsの振幅は増大し、また、EPSCsの場合に比べて反応開始までの時間および反応持続時間が長く、LM を 10〜20 分洗い流しても、IPSCs の振幅はほとんど変化しなかった（図 3）。増大率は30〜40%であった。

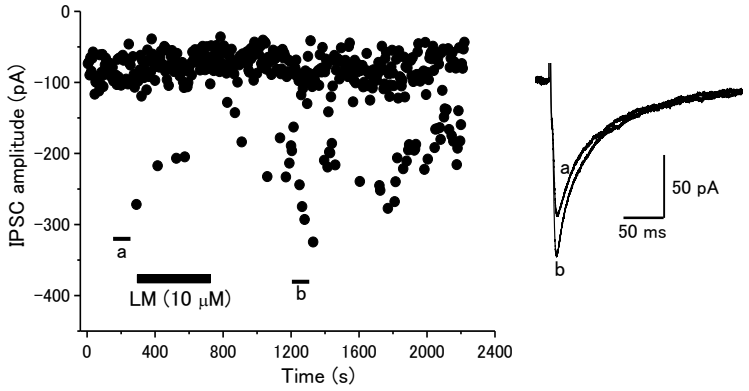


図 3. IPSCs に対する LM の抑制効果

5 秒に 1 回誘発した IPSCs の振幅を時間に対してプロットした。LM の投与時間は図に示した通り。右側の電流トレースは、図中 a、b の時間（20 発、100 秒）の平均トレースである。

4. アセチルコリン性ニューロンの発火に対する p75^{NTR} 特異的リガンドの作用

カリウムベースの内液を充填した電極を用いてホールセル記録を達成後、current-clamp mode にて電位を記録し、記録電極を通じて脱分極性のパルス電流を与えることによって活動電位を誘発した（図 4）。LM (100 μM) を灌流液中に投与すると、膜が 4〜8 mV 脱分極し、活動電位発火数が増大した（図 4）。

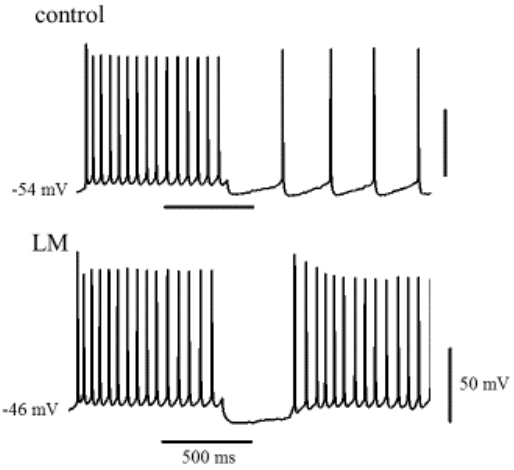


図 4. 膜電位および活動電位発火に対する LM の作用

LM（100 μM）投与によって、膜が−54 mV から−46 mV に脱分極し、活動電位の発火数が増大した。

考　察

本研究では、$p75^{NTR}$ を特異的リガンドで活性化することによって、線条体アセチルコリン性ニューロンに入力する non-NMDA グルタミン酸受容体を介する興奮性シナプス伝達が抑制され、一方 $GABA_A$ 受容体を介する抑制性シナプス伝達が増強された。この結果のみからは、$p75^{NTR}$ によりニューロン活動が抑制されると予想されたが、実際にはそれに反して、ニューロン活動が活性化された。このことから、他の受容体を介するシナプス伝達に対する作用とともに、アセチルコリン性ニューロンに内在する機構を制御する作用の存在が示唆される。この点に関して、さらなる電気生理学的解析が必要であり、計画中である。

また、動物個体全体に対する作用を見る手段として行動学的解析を行ない、さらに、電気生理学的および行動学的解析結果と形態学的解析を対応させることが有効と考えられ、計画中である。

中枢神経系における神経栄養因子受容体の機能に関する研究は端緒についたばかりであり、発展が期待される。本研究課題で扱った線条体のアセチルコリン性ニューロンへのシナプスは、運動機能調節およびその病態としてパーキンソン病等の神経変性疾患関与することが示唆されている。したがって、神経栄養因子調節によって、生体における運動機能改善、体力増強、さらには、パーキンソン病関連疾患に対する新たな治療法にまでつながることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学医学部薬理学講座の鈴木江津子助教である。研究に対する貢献に感謝する。

文　献

1) Momiyama T, Fukazawa Y. D1-like dopamine receptors selectively block P/Q-type calcium channels to reduce glutamate release onto cholinergic basal forebrain neurones of immature rats. J Physiol. 2007 Apr 1;580(Pt 1):103-17. Epub 2007 Jan 18. PMID: 17234695 DOI: 10.1113/jphysiol.2006.125724

2) Nishijo T, Momiyama T. Serotonin 5-HT_{1B} receptor-mediated calcium influx-independent presynaptic inhibition of GABA release onto rat basal forebrain cholinergic neurons. Eur J Neurosci. 2016 Jul;44(1):1747-60. Epub 2016 Jun 4. PMID: 27177433 DOI: 10.1111/ejn.13273.

3) Xie Y, Meeker RB, Massa SM, Longo FM Modulation of the p75 neurotrophin receptor suppresses age-related basal forebrain cholinergic neuron degeneration. Sci Rep. 2019 Mar 27;9(1):5273. PMID: 30918278 DOI: 10.1038/s41598-019-41654-8.

4) Momiyama T, Koga E. Dopamine D_2-like receptors selectively block N-type Ca2+ channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurones. J Physiol. 2001 Jun 1;533(Pt 2):479-92. PMID: 11389206 DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0479a.x.