Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Selective cholinergic denervation inhibits expression of long-term potentiation in the adult but not infant rat hippocampus

本岡，康彦

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2001-09-30

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲2389

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002389

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【５７】

氏　名・(本　籍)　本岡　康彦（兵庫県）

博士の専攻分野の名称　博　士　（医学）

学　位　記　番　号　博い第１３７９号

学位授与の　要　件　学位規則第４条第１項該当

学位授与の　日　付　平成１３年９月３０日

【学位論文題目】

Selective cholinergic denervation inhibits expression of long-term potentiation in the adult but not infant rat hippocampus.

（週齢により異なる選択的コリン作動性神経の脱神経化
ラット海馬におけるシナプス伝達長期増強の発現抑制）

審　査　委　員

主査　教授　黒田　嘉和

教授　尾原　秀史　　教授　寺島　俊雄

はじめに

コリン作動性神経は中枢では大脳皮質などに広く分布し、末梢では自律神経と運動神経がこれに該当する。その受容体はムスカリン性とニコチン性という全く異なる2種類の受容体に分類される。

認知機能の中枢である海馬は辺縁系の一部をなし、脳弓を介して中隔核から多量のコリン作動性神経の入力を受ける。基底核皮質経路と同様に中隔核海馬経路は学習と記憶過程の役割を担っていると考えられている。コリン作動性神経は加齢やアルツハイマー病の脳では減少し、動物モデルでコリン作動性神経の脱神経化は学習や記憶の障害をきたすことが確認されている。これらのことよりコリン作動性神経は認知機能と密接な関係があり、同時に学習・記憶に関してこれまで研究がなされているシナプス伝達の長期増強現象(long-term potentiation: 以下 LTP)との強い関与が推測される。

この疑問に対し我々は中隔核海馬経路のコリン作動性神経を選択的に破壊する 192 IgG-saporin を用いて脱神経化処理を行った。その上で、週齢の異なる2群のラット海馬切片で貫通枝 LTP を測定し、コリン作動性神経の脱神経化と LTP 発現との関係を評価した。

対象と方法

コリン作動性神経の脱神経化のために雄 Sprague-Dawley rat を幼若ラット群（2 週齢）および成ラット群（6 週齢）に分け、pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 麻酔を行い定位的手術装置に固定した。Hamilton 注射器 (23 gauge) を用いて生理的食塩水で希釈した 192 IgG-saporin (幼若ラット：2.1 μg /2.5 μl、成ラット：4.2 μg /5.0 μl)を右側脳室に定位的に注入した。

対照群として用意した幼若ラット群および成ラット群に対し、同量の生理的食塩水を同様の方法で定位的に右側脳室に注入した。

choline acetyltransferase (以下 ChAT)免疫組織染色のために幼若ラット群および成ラット群を各々2 週間および 2 ヶ月後に屠殺し、海馬を摘出した。海馬切片は paraformaldehyde で 2 日間固定され、50 μm にスライスした。切片は 2.5% normal rabbit serum および 0.3% Triton X-100 (1:800) 含有 anti-ChAT 親和性 polyclonal antibody (AB144P) (Chemicon International Inc., USA) 希釈液に 4℃で 24 時間培養し、洗浄後 2.5 % normal rabbit serum (1:100) を含む biotinylated anti-goat IgG (H+L) rabbit serum 希釈液で培養した。続いて市販の ABC キット(Vecstain Elite) を用いて avidin-peroxydase complex で培養し、ペルオキシダーゼ反応のために 3,4-diaminobenzidine solution を用いた。

集合電位記録のために、192 IgG-saporin または生理的食塩水を脳室へ注入したラット脳から海馬を取り出し、400 μm の切片を作成した。これを、電位記録用チャンバーへ移し、34℃で持続的に人工髄液を還流しながら、95％O_2 および 5％CO_2 にて酸素化した。初期反応を貫通枝の電極刺激(0.05Hz, 持続時間 0.1ms)で歯状核顆粒細胞層からガラス電極を用いて記録した。電極を刺入し集合電位を得た後に基準記録を測定を開始するまで 60 分間放置し安定化させた。次いで、LTP を誘発するためにテタヌス刺激（頻度 100Hz で 1 秒間の 3 連発刺激、連発間隔を 15 秒間に設定）を加えた。得られた集合電位は初期の陽性波と最大陰性波との電位差を測定し、2 分間隔の測定で得られた誘発電位をパーソナルコンピューターで記録し解析した。

結果

ChAT 免疫組織学的評価では、対照群において幼若および成ラットの両群とも、海馬全体、特に歯状回顆粒細胞層および錐体細胞層に ChAT 陽性線維の濃染が見られた。これに対して、192 IgG-saporin 注入群では幼若および成ラットの両群とも注入 2 週間後の海馬切片において ChAT 陽性線維はほとんど認めなかった。また注入 2 ヶ月後の切片でも同様の所見であった。これらの事実より週齢を問わず、海馬の歯状回顆粒細胞層および錐体細胞層は 192 IgG-saporin によって選択的かつ持続的に脱神経化することが示された。

次に、海馬切片の歯状核顆粒細胞層で集合電位を記録した。幼若ラットにおいてテタヌス刺激は集合電位の振幅を基礎値の約 150%に増強させ、これは対照群で 120 分間以上持続した。2 週後および 2 ヶ月後の貫通枝 LTP 発現の割合 は各々83% (5/6 切片) で同等であった。192 IgG-saporin 処理群では同様に各々83% (5/6 切片) 、78% (7/9 切片) で LTP 発現率は障害されなかった。一方、成ラットでは同じ刺激で 2 時間以上継続する集合電位の振幅の増強（基礎値の約 170%）がみられ、対照群の貫通枝 LTP 発現は 2 週後および 2 ヶ月後で各々80% (8/10 切片) および 83% (5/6 切片) の割合で認めた。しかしながら、192 IgG-saporin 処理群では 2 週間後での LTP は発現されず 0% (0/10 切片) 、注入 2 ヶ月後でも対照群と比べ極めて低い発現率であった 38% (3/8 切片) 。

考察

192 IgG-saporin 処理によって海馬上の ChAT 免疫染色で陽性線維は消失し、これはラットの週齢を問わずさらに 2 ヶ月間継続した。

LTP の測定においてはコリン作動性脱神経化された成ラットで 2 週間後の貫通枝 LTP の発現が極めて強く抑制された。同時に測定した幼若ラットでは貫通枝 LTP の発現は抑制されず、対照群との差を認めなかった。

本実験でコリン作動性神経の脱神経化を目的に 192 IgG-saporin を用いたが、これまで行われていたコリン作動性神経の作動薬や拮抗薬を用いた実験では不可能であった選択的かつ継続的コリン作動性神経の脱神経化を生じさせることが可能であった。192 IgG-saporin はコリン作動性神経に存在する低親和性神経成長因子受容体に結合するモノクロナール抗体である 192 IgG と細胞毒である saporin を結合して作成された。組織学的検討では主にラットの前脳基底部、皮質、海馬の acetylchorine esterase 陽性線維の選択的消失が報告されている。

acetylchorine を神経伝達物質とするコリン作動性神経は学習・記憶において重要な役割をもち、LTP は同じく学習・記憶の基礎をなすシナプス可塑性の最適な細胞モデルであるため、LTP 発現にコリン作動性神経が関与するか否かを証明するためのこれまで多くの研究がなされている。主には fimbria/fornix lesion と薬剤投与である。fimbria/fornix lesion では海馬 CA1 の LTP 発現に変化を与えなかった。しかし、このモデルは選択的なコリン性脱神経でなく GABA 系にも影響を与えるという欠点がある。薬剤投与ではコリン作動性神経の agonist、antagonist、anticholinesterase が試されたが、acetylchorine の LTP に対する影響として一定の結論は得られていない。上記薬剤の実験が複雑である理由はシナプス前後の影響が干渉しあうことにあると考えられる。

本実験の結果よりコリン作動性神経の脱神経化により成ラットの貫通枝 LTP の発現が顕著に抑制された。にもかかわらず、幼若ラットでは同様な抑制が見られなかった。これは、発育途上にある幼若な脳に潜在する非コリン作動性神経の発芽が関与しているのではないかと推測される。成ラットでは LTP 発現の

割合は 192 IgG-saporin 注入後 2 ヶ月で 0% から 38% に上昇したが、非コリン系の再入力がかなり低い程度ではあるが、成熟した脳においても起こりうるということが示唆される。

結語

成ラット脳のコリン作動性神経は長期増強の経路に深く関与しているということが示唆された。このことは認知機能がコリン作動性神経と関連することの説明となりえる。対称的に幼若ラットの LTP 発現はコリン作動性神経の脱神経化では障害されず、このことは発育途上の脳における潜在的な再生能力によると推測される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1380 号	氏　名	本岡康彦
論文題目	週齢により異なる選択的コリン作動性神経の脱神経化ラット海馬におけるシナプス伝達長期増強の発現抑制 Selective cholinergic denervation inhibits expression of long-term potentiation in the adult but not infant rat hippocampus		
審査委員	主　査　黒田嘉和 副　査　寺島俊雄 副　査　尾内秀史		
審査終了日	平成 13 年 8 月 10 日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

海馬におけるコリン作動性神経は加齢やアルツハイマー病の脳では減少し、動物モデルでコリン作動性神経の脱神経化は学習や記憶の障害をきたすことが確認されている。また、コリン作動性神経は、同時に学習・記憶に関係したシナプス伝達の長期増強現象(long-term potentiation: 以下 LTP)との強い関与が推測されている。

申請者は中隔核海馬経路のコリン作動性神経を選択的に破壊するためにコリン作動性神経に選択的に結合するモノクロナール抗体である 192 IgG と細胞毒である saporin を結合して作成された 192 IgG-saporin（以下 IgG-saporin と略す）を用いて脱神経化処理を行った。その上で週齢の異なる 2 群のラット海馬切片で LTP を測定し、加齢によるコリン作動性神経の脱神経化と LTP 発現との関係を評価した。

対象としては、雄 Sprague-Dawley rat を用い、幼若ラット群（2 週齢）および成ラット群（6 週齢）に分けた。方法として pentobarbital 麻酔下定位的に手術装置に固定し、Hamilton 注射器にて 192 IgG-saporin を右側脳室に定位的に注入した。対照群として同様の幼若ラット群および成ラット群に対し、同様の方法で生理的食塩水を右側脳室に注入した。

コリン作動神経の免疫組織学的検討には各群のラットを各々2 週間および 2 ヶ月後に屠殺し、海馬を摘出し、choline acetyltransferase (以下 ChAT) 免疫組織染色を行った。

集合電位記録のために、saporin 注入群または対照群のラット脳から海馬を取り出し、海馬切片を作成し、初期反応を貫通枝を電極刺激し歯状核顆粒細胞層からガラス電極を用いて記録した。60 分後、LTP を誘発するために頻度 100Hz で 1 秒間の 3 連発テタヌス刺激を加え、得られた誘発電位をパーソナルコンピューターで記録し解析した。

結果として、ChAT 免疫組織学的評価では、対照群において幼若および成ラットの両群とも、海馬全体、特に歯状回顆粒細胞層および錐体細胞層に ChAT 陽性線維が見られた。これに対して、saporin 注入群では幼若および成ラットの両群とも注入 2 週間後、2 ヶ月後の海馬切片において ChAT 陽性線維はほとんど認めず、海馬の歯状回顆粒細胞層および錐体細胞層は saporin によって選択的かつ持続的に脱神経化することが示された。

次に、海馬切片の歯状核顆粒細胞層で集合電位を記録した。幼若ラットにおいて 2 週後および 2 ヶ月後の LTP 発現の割合は saporin 処理群、対照群とも同等に高率に認められた。一方、成ラットでは、対照群では LTP 発現は 2 週後および 2 ヶ月後で高率に認めたが、saporin 処理群では 2 週間後での LTP は発現されず、注入 2 ヶ月後でも対照群と比べ極めて低い発現率であった。

本実験でコリン作動性神経の脱神経化を目的に細胞毒である saporin とコリン作動性神経受容体に特異的なモノクロナル抗体 192 IgG を結合させた saporin を用いたが、これまで行われていた神経破壊実験やコリン作動性神経の薬剤を用いた実験では不可能であった選択的かつ継続的コリン作動性神経の脱神経化を生じさせることが可能であった。

本実験の結果よりコリン作動性神経の脱神経化により成ラットの LTP の発現が顕著に抑制されたが、幼若ラットでは同様な抑制が見られなかった。成ラット脳のコリン作動性神経は長期増強の経路に深く関与しているということが示唆された。対称的に幼若ラットの LTP 発現はコリン作動性神経の脱神経化では障害され

ず、このことは発育途上の脳における潜在的な再生能力によると推測された。

本研究はモノクロナル抗体を用いて海馬のコリン作動神経の選択的脱神経化を行い海馬のシナプス伝達の長期増強現象を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった成ラットと幼若ラットでシナプス伝達の長期増強現象の発現抑制の差について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。