



Slow synaptic transmission mediated by TRPV1 channels in CA3 interneurons of the hippocampus.

Eguchi, Noriomi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6543号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006543>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Slow synaptic transmission mediated by TRPV1 channels in CA3 interneurons of the hippocampus.

海馬 CA3 野介在神経において TRPV1 チャンネルにより誘発される遅発持続型シナプス応答

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
精神医学分野
(指導教員：曾良 一郎 教授)

江口典臣

初めに

グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、AMPA 型、NMDA 型などのイオンチャネル内在型グルタミン酸受容体に作用するのみでなく、代謝型グルタミン酸受容体にも作用することが知られている (Nedergaard et. al., 2002)。代謝型グルタミン酸受容体は 8 つのサブタイプから成り、それらはグループ I (mGluR1, mGluR5)、グループ II (mGluR2, mGluR3)、グループ III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) の 3 つのグループに分類されている。このうち、グループ I はシナプス後部に、グループ II と III はシナプス前部に発現し、シナプス伝達を調節している (LeBeau et. al., 2005)。

海馬は記憶・学習に重要な役割を果たし、その興奮性神経回路は記憶・学習のための情報処理を担っている。海馬 CA3 野の主要な興奮性神経細胞である錐体細胞は、相互に密な反回神経回路を形成しており、CA3 野の興奮性の調節に重要である (Cai et. al., 2007)。神経興奮性を抑制的に調節するのが介在神経細胞であり、CA3 野介在神経細胞にはグループ I 代謝型グルタミン酸受容体が発現し、その活性化により、CA3 野錐体細胞に抑制性シナプス応答が生じることが報告されている (Poncer et. al., 1995)。CA3 野介在神経において、代謝型グルタミン酸受容体による興奮性シナプス応答のメカニズムを検討するため、培養海馬スライス標本を用いて、介在神経細胞における遅発持続型シナプス応答を記録し、この反応が代謝型グルタミン酸受容体の活性化による Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) チャンネルの活性化により引き起こされることを明らかにしたので、報告する。

方法

スライス培養

全ての実験は、生後 5-7 日のラット仔から作成したスライス培養で行った。本動物実験は、神戸大学大学院医学研究科・動物実験委員会によって承認されている (許可番号: P130808)。厚さ 400 μm の海馬スライス切片を、凝固ニワトリ血漿 (Japan Biotest, Saitama, Japan) でカバーガラスに固着し、血清を含む培地で試験管に密封し、回転インキュベーターにより 36 度で 14-21 日間、培養した。

電気生理学

スライス培養標本を、正立顕微鏡 (Axio Examiner, Zeiss, Jena, Germany) に設置された記録チャンバーに移し、外液 (148.8 mM Na⁺, 2.7 mM K⁺, 149.2 mM Cl⁻, 2.8 mM Ca²⁺, 2.0 mM Mg²⁺, 11.6 mM HCO₃⁻, 0.4 mM H₂PO₄⁻, 5.6 mM D-glucose and 10 mg/l phenol red; pH 7.4) を 34 度で灌流した。EPC10 増幅器 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) を使用し、パッチ電極 (2-5M Ω) で、海馬 CA3 野介在神経細胞から記録した。電極は、内液 (140 mM Cs-acetate, 10 mM HEPES, 0.1 mM EGTA, 5 mM QX-314-Cl, 2 mM Mg-ATP, 5 mM creatine phosphate, 0.4 mM GTP, 1g/l and biocytin; pH 7.2) で満たした。CA3 野錐体細胞層に細胞外刺激電極を設置し、電気刺激による CA3 野介在神経細胞におけるシナプス応答を記録した。代謝型グルタミン酸受容体によるシナプス応答を記録するために、AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗薬 CNQX (40 μM)、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬 APV (50 μM)、

GABA_A 受容体拮抗薬 gabazine (10 μM)、GABA_B 受容体拮抗薬 CGP55845 (1 μM) を細胞外液に加えた。電気信号は PATCHMASTER ソフトウェア (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) を用いてデジタル記録し、ハードディスクに保存した。数値データは平均±標準誤差として表した。

結果

保持電位-70mV でシナプス応答を惹起したところ、遅発持続型内向き電流が記録された (ピーク振幅は-71.2 ± 13.2 pA)。遅発持続型内向き電流の逆転電位は-16.0 ± 3.3 mV であり、非選択的陽イオンチャンネルを介することが示唆された。この遅発持続型シナプス応答は、グループ I 代謝型グルタミン酸受容体の拮抗薬である AP3 (100 μM) により阻害された。また、細胞外液からカルシウムを除くと応答は消失したことから遅延性内向き電流はグループ I 代謝型グルタミン酸受容体活性化により引き起こされる興奮性シナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current: EPSC) と考えられた。以下、遅発持続型 EPSC と呼称する。

代謝型グルタミン酸受容体活性化による応答であることを確認するため、記録電極内に G 蛋白質阻害剤、GDP βS (1 mM) を加えたところ、遅発持続型 EPSC が抑制された。このため、遅発持続型 EPSC は G 蛋白質を介した細胞内情報伝達を介していると考えられた。次にカルシウムキレート剤、BAPTA (10 mM)、ホスホリパーゼ C 阻害剤、U73122 (5 μM) をそれぞれ記録電極内に加えたが、BAPTA、U73122 のいずれも遅発持続型 EPSC を変化させなかった。遅発持続型 EPSC はグループ I 代謝型グルタミン酸受容体活性化により引き起こされるが、細胞内カルシウム濃度、ホスホリパーゼ C は関与していないことが示された。

次に、脳に発現する陽イオンチャンネル、TRP チャンネル (Transient Receptor Potential Channel) に着目し、TRP チャンネル阻害剤であるランタン (La³⁺, 100 μM) を投与したところ、遅発持続型 EPSC は抑制された。そこで、海馬に発現し、シナプス可塑性への関与が報告される TRPV1 チャンネルの関与を検討した。TRPV1 チャンネルの阻害剤、カプサイゼピン (10 μM) を投与したところ、遅発持続型 EPSC は阻害された。また、TRPV1 チャンネルの選択的アゴニスト、カプサイシン (5 μM) を投与したところ、介在神経細胞に内向き電流が惹起された。

最後に、グループ I 代謝型グルタミン酸受容体と TRPV1 チャンネルの関係について検討した。グループ I 代謝型グルタミン酸受容体の選択的アゴニスト、DHPG (10 μM) を投与すると、CA3 介在神経細胞に内向き電流が記録され、この内向き電流はカプサイゼピン (10 μM) により抑制された。グループ I 代謝型グルタミン酸受容体活性化により誘導される電流は、TRPV1 チャンネルが担っていることが示唆された。

討論

TRP チャンネルはヒト組織に広く発現していることが知られており、慢性疼痛、心血管系疾患、皮膚疾患、代謝性疾患、癌など、多くの疾患との関連が報告されている (Kaneko et. al., 2014)。TRPV1 チャンネルは TRP チャンネルのサブタイプの 1 つであり、末梢神経においては温痛覚の受容器として知られ、海馬をはじめ脳での発現が報告されている (Brown and Passmore, 2010)。シナプス前部に発

現する TRPV1 チャンネルは神経伝達物質の放出を調節し (Kauer and Gibson, 2009)、シナプス後部に発現する TRPV1 チャンネルは、AMPA 型グルタミン酸受容体や GABA_A 受容体のエンドサイトーシスによりシナプス応答を調節することが報告されている (Grueter et. al., 2010)。本研究では、海馬 CA3 野介在神経細胞の TRPV1 チャンネルが、海馬 CA3 野の興奮性を制御している可能性を示した。

グループ I 代謝型グルタミン酸受容体は、ホスホリパーゼ C の活性化とそれに続く細胞内カルシウム濃度の上昇を経て、細胞膜イオンチャンネルを活性化することが知られている (Carrier et. al., 2006)。本研究で観察された遅発持続型 EPSC は、グループ I 代謝型グルタミン酸受容体の活性化が必要であるが、ホスホリパーゼ C の活性化と細胞内カルシウム濃度上昇は関与していない。TRPV1 チャンネルの内因性アゴニストとしてアラキドン酸、エンドカンナビノイドも知られており (Puente et. al., 2011)、これらの物質がホスホリパーゼ C を介さない細胞内情報伝達により TRPV1 チャンネルを活性化し、遅発持続型 EPSC が惹起される可能性が考えられる。

TRPV1 ノックアウトマウスは明暗箱テスト (Light-dark box test) や高架式十字迷路試験 (Elevated plus maze test) で不安行動が少ないことが報告されている。これらの行動は海馬による記憶・学習機能と関連があると考えられている (Marsch et. al., 2007)。海馬スライス標本を用いた実験では、薬剤に誘発されたてんかん様神経活動が TRPV1 チャンネル阻害剤、カプサイゼピンにより抑制されることが報告されている (Gonzalez-Reyes et. al., 2013)。これらの研究報告は、海馬の TRPV1 チャンネルが記憶・学習や、てんかんの発症に重要な役割を果たしている可能性を示している。TRPV1 チャンネルと海馬の機能や疾患との関連については、今後更なる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2569号	氏名	江口 典臣
論文題目 Title of Dissertation	海馬 CA3 野介在神経において TRPV1 チャネルにより誘発される遅発持続型シナプス応答 Slow synaptic transmission mediated by TRPV1 channels in CA3 interneurons of the hippocampus.		
審査委員 Examiner	主 査 古屋敷 智之 Chief Examiner 副 査 予田 達央 Vice-examiner 副 査 寺島 俊雄 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】
 海馬は記憶や空間認知に重要な役割を果たし、その興奮性神経回路は記憶・学習のための情報処理を担っている。海馬 CA3 野の主要な興奮性神経細胞である錐体細胞は、相互に密な反回神経回路を形成しており、CA3 野の興奮性の調節に重要である。神経興奮性を抑制的に調節するのが介在神経細胞であり、CA3 野介在神経細胞にはグループ I 代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor; mGluR) が発現し、その活性化により、CA3 野錐体細胞に抑制性シナプス応答が生じることが報告されている。本研究は、CA3 野介在神経において、代謝型グルタミン酸受容体による興奮性シナプス応答のメカニズムを調べた。

【方法】
 全ての実験は、生後 5-7 日のラット仔から作成したスライス培養で行われた。本動物実験は、神戸大学大学院医学研究科・動物実験委員会によって承認されている (許可番号: P130808)。スライス培養標本は、回転インキュベーターにより 36 度で 14-28 日間培養された。スライス培養標本は、正立顕微鏡に設置された記録チャンパーに固定され、34口の細胞外液で灌流された。EPC10 増幅器を使用し、パッチ電極 (2-5MΩ) で、海馬 CA3 野介在神経細胞からシナプス応答が記録された。mGluR によるシナプス応答を記録するために、AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗薬 CNQX (40μM)、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬 APV (50 μM)、GABA_A 受容体拮抗薬 gabazine (10μM)、GABA_B 受容体拮抗薬 CGP55845 (1 μM) が細胞外液に加えられた。

【結果】

1. CA3 野錐体細胞層への細胞外刺激により、CA3 野介在神経細胞において外向き整流性を有する遅発持続型シナプス応答が記録された。
2. この遅発持続型シナプス応答はグループ I mGluR の阻害薬で消失することから、興奮性シナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current: EPSC) であることが示された。
3. この遅発持続型 EPSC は G 蛋白質阻害薬により阻害されるが、細胞内へのカルシウムキレート薬やホスホリパーゼ C 阻害薬では阻害されない。この結果から、この遅発持続型 EPSC は、グループ I mGluR による G 蛋白質活性化を介するが、グループ I mGluR により活性化される細胞内カルシウム上昇やホスホリパーゼ C を介さないことが示唆された。
4. 遅発持続型 EPSC は TRPV1 チャネル阻害薬により阻害され、グループ I mGluR の刺激により TRPV1 阻害薬で消失する内向き電流が誘導される。この結果から、この遅発持続型 EPSC は、グループ I mGluR による TRPV1 活性化を介することが示唆された。

【結論】

TRP チャンネルはヒト組織に広く発現していることが知られており、慢性疼痛、心血管系疾患、皮膚疾患、代謝性疾患、癌など、多くの疾患との関連が報告されている。TRPV1 チャンネルは TRP チャンネルのサブタイプの 1 つであり、末梢神経においては温痛覚の受容器として知られ、海馬をはじめ脳での発現が報告されている。シナプス前部に発現する TRPV1 チャンネルは神経伝達物質の放出を調節し、シナプス後部に発現する TRPV1 チャンネルは、AMPA 型グルタミン酸受容体や GABA_A 受容体のエンドサイトーシスによりシナプス応答を調節することが報告されている。本研究では、海馬 CA3 野の錐体細胞は、グループ I 代謝型グルタミン酸受容体による TRPV1 チャンネルの活性化を介して介在神経細胞を活性化し、海馬 CA3 野神経細胞の興奮性を制御している可能性が示された。

以上、本研究は、パッチクランプ法を用い海馬におけるシナプス応答を記録し、海馬 CA3 野の介在神経細胞におけるグループ I mGluR による TRPV1 チャンネル活性化の存在を明らかにしたものであり、海馬の局所神経回路の役割を理解する上で重要な貢献をし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。