

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 庄司 寛和
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 895 号
学位授与の日付 令和元年 9 月 20 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Mechanisms of noradrenergic modulation of synaptic transmission and neuronal excitability in ventral horn neurons of the rat spinal cord
(脊髄前角運動ニューロンのシナプス伝達および細胞興奮性に対するノルアドレナリンの作用機序)
論文審査委員 主査 教授 長谷川 功
副査 准教授 木村 慎二
副査 准教授 紙谷 義孝

博士論文の要旨

【背景】脊髄損傷の亜急性期から慢性期に生じる神経の回復においては神経可塑性が重要とされる。神経可塑性とは、神経細胞の軸索が発芽、伸長、再分布することにより新たな神経回路網を形成し、機能的・構造的な変化を生じることである。この神経可塑性を促進する方策として、薬物療法ではセロトニン、ノルアドレナリンなどのモノアミンの可能性が挙げられている。脊髄運動神経に対し、ノルアドレナリン系は神経回路網を修飾し、運動神経系の調節に重要な役割を果たす。脊髄におけるノルアドレナリンについて神経修飾や反応経路に関する報告は数多く認めるが、脊髄前角神経細胞に対するシナプス伝達や細胞興奮性に対するノルアドレナリンの作用や作用機序は十分に検討されていない。本研究の目的は、電気生理学的手法を用いて、ノルアドレナリンの脊髄前角ニューロンに対する作用機序を解明することである。

【方法】幼若ラット (第 7-15 生日) の脊髄を麻酔下に摘出し、マイクロスライサーを用いて脊髄横断スライス (厚さ 500 μ m) を作成した。脊髄スライスを記録用チャンバー内に固定し、人工脳脊髄液で灌流した。顕微鏡視下に脊髄第 IX 層に位置し、25 μ m 以上の大きな細胞体をもつ細胞に対し、微小ガラス電極を用いてホールセル・パッチクランプ記録を行った。膜電位固定法を適用し、ノルアドレナリンやその選択的受容体拮抗薬または作動薬を投与し、膜電流の変化や興奮性・抑制性シナプス後電流 (EPSC・IPSC) の頻度、振幅の変化を検討した。また電流固定法にて、静止膜電位や、活動電位発生頻度の変化を検討した。

【結果】保持膜電位 -70mV とし EPSC を記録し、ノルアドレナリン 40 μ M の灌流投与により EPSC の頻度 (コントロール比、214%) と振幅 (184%) が有意に増加した ($p < 0.01$)。活動電位の発生を抑制する電位依存性 Na チャネル阻害薬 (テトロドトキシン) 存在下では、EPSC に対するノルアドレナリンの効果は完全に抑制された。一方膜電流の変化として、ノルアドレナリン投与によって記録細胞の興奮性増強を意味する内向き電流 (振幅平均 55.4 pA) を生じた。ノルアドレナリン投与による EPSC の振幅増加および内向き

電流は $\alpha 1$ 受容体拮抗薬（プラズシン 1 μ M）または β 受容体拮抗薬（プロプラノロール 1 μ M）により有意に抑制されたが、 $\alpha 2$ 受容体拮抗薬（ヨヒンビン 1 μ M）では抑制されなかった。 $\alpha 1$ 受容体作動薬（フェニレフリン 50 μ M）、 β 受容体作動薬（イソプロテレノール 50 μ M）投与ではノルアドレナリン同様にEPSCの頻度・振幅の増加を認め、 $\alpha 2$ 受容体作動薬（クロニジン 1mM）投与ではEPSCの頻度・振幅の減少を認めた。

保持膜電位を0mVとし、IPSCを記録した。ノルアドレナリン40 μ MにてIPSCの頻度(238%)と振幅(266%)が増加し、これら増加はテトロドトキシンで遮断された。

電流固定法にて静止膜電位を測定し、ノルアドレナリンによって静止膜電位が脱分極側に傾くことを確認した。また、活動電位の発生頻度はノルアドレナリンによって増加した。

【考察】脊髄前角ニューロンにおいて、ノルアドレナリンは興奮性シナプス伝達を活性化した。この反応はテトロドトキシンにより遮断されることから、シナプス前終末への直接作用ではなく、ノルアドレナリンが神経回路網を形成する介在ニューロンに作用して神経伝達物質放出を促進しているといえる。また、受容体拮抗薬・作動薬投与の結果より、ノルアドレナリンによる興奮性シナプス伝達活性化は $\alpha 1$ および β 受容体を介した作用であるといえる。一方、ノルアドレナリンは抑制性シナプス伝達も増加させたが、静止膜電位の脱分極側への移動や活動電位の発生頻度増加という結果と合わせると、ノルアドレナリンは脊髄前角ニューロンに対して興奮に働くといえる。

本研究にて脊髄前角ニューロンに対するノルアドレナリンの作用機序を明らかにした。これは、脊髄損傷回復期に重要な神経回路網の活性化をノルアドレナリンによって促進する方策の確立における基礎的な知見となる。これまでの研究では、筋攣縮との関連を示した $\alpha 1$ 受容体作用の報告のみであり、今回初めて β 受容体を介した神経回路網活性化の可能性を示した。

審査結果の要旨

ノルアドレナリン(NA)は脊髄損傷後の神経回路の可塑性にとって重要と考えられているが、脊髄前角神経細胞のシナプス伝達をどのように修飾・調節するか作用機序は知られていない。この問題を電気生理学的アプローチで解明するため、幼若ラット(生後7-15日)より脊髄横断スライスを作成し、顕微鏡視下に脊髄第IX層の細胞に対し、ホールセル・パッチクランプ記録を行った。NAの投与により膜電位固定法で記録した興奮性シナプス後電流EPSCの頻度、振幅とも有意に増加した。この作用はテトロドトキシン存在下に抑制されたため、介在ニューロンの活動を介するものと考えられた。NA受容体の作動薬・拮抗薬に対する作用から、NAによるシナプス伝達や細胞興奮性の活性化は $\alpha 2$ 受容体でなく $\alpha 1$ 受容体と β 受容体を介したものであることが示唆された。本研究の結果は、脊髄損傷回復期に重要な神経回路網の活性化が $\alpha 1$ 受容体の作用のみならず β 受容体を介していることをはじめて明らかにし、脊髄損傷回復期に重要な神経回路網活性化の全容解明に必要な基礎的な知見をもたらした点に、学位論文としての価値を認める。