

氏名	てい えいくん 鄭 英君
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第216号
学位授与の日付	平成20年3月24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	Field potential recording in the ventral tegmental area: Pharmacological and toxicological evaluations of postsynaptic dopaminergic neuron activity (腹側被蓋野における電場シナプス電位記録: 神経毒性損傷によるドーパミン作動性ニューロンシナプス活動の寄与の評価)
論文審査委員	主査 教授 高橋 均 副査 教授 那波 宏之 副査 教授 澁木 克栄

博士論文の要旨

<背景と目的>

腹側被蓋野 (VTA) には 50~80% のドーパミン作動性ニューロンとその興奮性を調節する 20~50% 程度の GABA 作動性ニューロンが存在する。VTA のドーパミン作動性ニューロンは主に前頭前野からのグルタミン酸作動性入力と側坐核と腹側淡蒼球からの GABA 作動性入力を受ける。依存性薬物やストレスはドーパミン作動性ニューロンの興奮性シナプス応答を増強させ、脳機能を調節していると言われている。このシナプス可塑性は依存性薬物に対する条件付け強化学習成立に重要な役割を果たす。これまでドーパミン作動性ニューロンに生ずる興奮性シナプスの薬理学的特性やシナプス可塑性はパッチクランプ法により研究が進められてきている。本研究では電場電位記録法を用いて簡便にドーパミン作動性ニューロンに発生するシナプス応答をモニターする実験系の開発と確立を試みた。また、ドーパミン作動性ニューロンに対する神経毒素である 6-水酸化ドーパミン (6-OHDA) を用いて、特異的に神経変性を引き起こすことで、ドーパミン作動性ニューロン活動の寄与を評価した。

<材料と方法>

私は幼若期ラットにおいて中脳ドーパミン作動性ニューロンの変性を引き起こすために、6-OHDA を生後 3 日から 9 日まで一日おきで 4 回脳内投与した。生後 18 日齢において、ドーパミン作動性ニューロンの損傷をチロシン水酸化酵素 (TH) の免疫染色とウェスタンブロットにより確認した。電気生理学実験には VTA が含まれる水平段スライスマイクロスライサーにより作成した。電場電位記録のための記録電極および刺激電極はスライス上の解剖学的指標により決定した。電場電位の薬理特性は人工脳脊髄液 (ACSF) に GABA_A 受容体阻

害剤ビククリン (20 μ M)、AMPA 受容体阻害剤 CNQX (10 μ M)、NMDA 受容体阻害剤 APV (50 μ M)、活動電位阻害剤 TTX (1 μ M) 等を利用することで個々の受容体の関与を評価した。

<結果と考察>

中脳水平段スライスを用いて電気生理学実験を行うに当たりチロシン水酸化酵素 (TH) の免疫染色により VTA 領域を確認した。その結果、解剖学的に fasciculus retroflexus (fr) と medial terminal nucleus of the accessory optic tract (MT)・黒質 (SN) の間の領域が VTA として同定した。これらの指標はスライス上でも確認され、記録電極を fr と MT の間に設置した。最大の電場電位応答を得るために刺激電極の位置を前方より側方に角度 0 度より 60 度まで変化させて電場電位応答の計測を行った。その結果、記録部位より前側方 30~45 度の刺激位置で最大の電場電位応答を得ることができた。

ACSF 灌流条件で、電気刺激に対する電場電位応答として潜時の異なる 2 つの成分の陰性波 (N1 および N2) が検出された。N1 は刺激後 0.86 ± 0.04 m s に発生する陰性波、N2 は刺激後 3.63 ± 0.10 m s に観察される陰性波である。これらの成分の薬理特性を各種阻害剤の投与により決定した。N1 成分はテトロドトキシン (TTX) により阻害される活動電位成分として同定された。N2 成分はビククリンにより増強し、逆に CNQX により陽性波となることから、EPSP 成分と IPSP 成分が含まれることが判明した。またビククリン存在下では N2 の後により持続時間の長い APV 感受性のある NMDA 成分が存在することも判明した。本電場電位測定法におけるドーパミン作動性ニューロンの後シナプス反応への貢献を評価するため、脳内に神経毒 6-OHDA を投与し VTA のドーパミン作動性ニューロンの細胞死を引き起こした。まずその条件検討として 6-OHDA を 1~4 回投与し、Western blot 法と免疫染色法で神経細胞障害の状態を観察した。その結果、4 回の投与で TH の発現量が 10% 未満まで低下することが判明した。免疫染色の結果でも同様のドーパミン作動性ニューロンの脱落が認められた。一方で、6-OHDA 処理動物の VTA において、GABA 合成酵素である GAD65/67 の発現性には影響はみられず、GABA 作動性ニューロンへの毒性はほとんどなかったと考えられた。これらの結果をもとに、6-OHDA を 4 回投与したドーパミン変性動物とコントロール動物を用いてその電場電位の比較を行った。その結果、N1 には著明な影響を認めることができなかった。その一方で、N2 に 50% の振幅の低下を認めることができた。このことより N1 成分は入力繊維の活動電位成分が主であり、ドーパミン作動性ニューロンの逆行性伝播の影響は少ないと結論された。また、シナプスを介する N2 成分には少なくとも 50% はドーパミン作動性ニューロンのシナプス応答が含まれていることが推察される。

電場電位記録法は記録細胞に対して非侵襲性であるため、パッチクランプ記録などと比べ数時間にわたるより長時間のシナプス応答の記録が可能である。特に薬物依存形成の際には、VTA にシナプス長期増強が生ずる事が知られる。従って本研究で確立された電場電位記録法はシナプス長期増強、さらには依存形成の機構を解明する上で有用な手法となる可能性がある。また、その記録法が簡便であるため精神疾患モデルなどドーパミン系に異常を示す可能性のある動物の、ドーパミン作動性ニューロンの活動性を 1 次スクリーニング的に評価する方法として有用かもしれない。

<結論>

本研究により VTA における電場電位記録法が確立された。また損傷実験により、そのシナプス電位成分にはドーパミン作動性ニューロン由来のシナプス応答が少なくとも 50%は含まれることが推察された。この手法は薬物依存や精神疾患モデルなどにおけるドーパミン作動性ニューロン活動を簡便にモニターする上で有用なものであると考えられる。

(論文審査の要旨)

申請者は、中脳ドーパミン神経細胞の入力シナプス可塑性を簡便に記録測定する目的を持って、ラット腹側被蓋野における電場電位記録法を開発するとともに、その記録法の評価・分析を実施した。申請者は、まず、チロシン水酸化酵素の免疫染色を使って中脳水平スライスにて、当該領域の解剖学的な評価をしたうえで、記録電極位置と刺激電極部位を決定した。電気刺激を加えて腹側被蓋野部の反応を観察したところ、2つの陰性波を観測した。その後の薬理的検討により、早い成分はテトロドトキシン感受性の活動電位成分であり、遅い成分はCNQX感受性のシナプス後反応成分であることが判明した。さらにドーパミン神経細胞の後シナプス反応の貢献度を調べる目的で、ドーパミン神経毒 6-OHDA を事前投与した動物からスライス標本を調整し、その電場電位記録を実施した。その結果、早い成分は変化がないものの、遅い成分はその強度が半減した。従って、この遅い陰性波には少なくとも半分以上、ドーパミン神経細胞のシナプス応答成分が含まれることがわかった。このように薬物依存や精神疾患モデルにおけるドーパミン神経細胞活動を簡便に記録する電場電位記録法を本論文で開発した点に、学位論文としての価値を認める。