

平成20年 9月

佐竹隆宏 学位論文審査要旨

主査	大野耕策
副主査	大濱榮作
同	中込和幸

主論文

Individual and additive effects of neuromodulators on the slow components of afterhyperpolarization currents in layer V pyramidal cells of the rat medial prefrontal cortex

(ラット内側前頭前野第5層錐体細胞における後過分極電流の遅い成分に対する神経修飾因子の個別および相加効果)

(著者：佐竹隆宏、三谷秀明、中込和幸、兼子幸一)

平成20年 Brain Research 1229巻 47頁～60頁

学 位 論 文 要 旨

Individual and additive effects of neuromodulators on the slow components of afterhyperpolarization currents in layer V pyramidal cells of the rat medial prefrontal cortex

(ラット内側前頭前野第5層錐体細胞における後過分極電流の遅い成分に対する神経修飾因子の個別および相加効果)

セロトニン (5-HT)、アセチルコリン (ACh)、ノルアドレナリン (NA)、ドーパミン (DA) 系に代表される上行性神経修飾因子系 (ascending neuromodulatory system) の多くは哺乳類脳の内側前頭前野 (medial prefrontal cortex; mPFC) に投射し、これらの神経終末は互いに重なり合った分布を示している。

大脳新皮質深層(第5層)の錐体細胞において、NA、5-HT、ムスカリン性ACh作動薬カルバコール (CCh) が、スパイク発射後の後過分極afterhyperpolarization (AHP) を惹起する電流 (I_{AHP}) の遅い成分(sAHP電流; slow afterhyperpolarization currents; I_{sAHP}) を強く抑制することはほぼ確立された知見である。この抑制は、スパイク頻度の順応現象 (spike adaptation) を減弱することで発火頻度の上昇をもたらす。しかしながら、DAの錐体細胞のsAHPに対する影響は明らかにされていない。また、錐体細胞で惹起される I_{sAHP} に対する細胞レベルでの神経修飾因子の相互作用についてはまったく知られていない。

そこで著者らは、ラットmPFCの第5層錐体細胞において、4つの神経修飾因子、5-HT、NA、DA、CChの I_{AHP} への影響を、スライスパッチクランプ法を用いて解析した。また、異なる2種類の神経修飾因子の作動薬を同時投与することで I_{sAHP} に対する相加効果について検討した。

方 法

全ての実験はラット脳スライス標本を用いて *in vitro* で行った。Wistar rat (性差問わず、17~28日齢) を、ペントバルビタールによる深麻酔下で痛覚反応消失を確認した後に断頭。脳を速やかに取り出し、氷冷した人工脳脊髄液 (aCSF) の中で冷却。mPFCを含む冠状断スライス (300- μ m厚) を、両側半球からビブラトームを用いて作製。スライス標本は実験に使用するまで、95% O_2 -5% CO_2 混合ガス下に室温で回復させた。光学顕微鏡(水浸対物レンズ(40倍))を備えたチャンバーにスライスを移し、電気生理学的実験を行った。スラ

イスは室温で、常に酸素化されたaCSFで灌流した。

内側前頭前野第5層錐体細胞を赤外微分干渉顕微鏡で形態学的に同定し、EPC-9 amplifierを用いて、パッチクランプ法による全細胞記録(whole-cell recording)を行い、電位固定モードで I_{sAHP} を記録した。スパイク発火は電流固定モードで記録した。各神経修飾因子の濃度は30 μM とし、必要に応じて濃度依存性を調べた。

統計学的有意差の検定は、2群間の比較にはstudent's t test、同一群における神経修飾因子の効果判定にはpaired t testを行った。3群あるいはそれ以上の群間の多重比較では、一元分散分析で統計的有意差が認められた場合に、Tukey-Kramer multicomparison testを行った。 $p < 0.05$ を統計的有意とみなした。

結 果

CCh、5-HT、NAは錐体細胞で記録した I_{sAHP} を抑制し、同時にスパイクの順応現象を減弱させ、結果として発火頻度を増加させた。また、一部の錐体細胞では後脱分極(afterdepolarization)電流 (I_{sADP}) が惹起された。DAは上記の3作動薬と同程度に I_{sAHP} を抑制し、この抑制は濃度依存性を示した。しかし、 I_{sAHP} の抑制にもかかわらず、DAによる発火頻度の増加は認められなかった。

I_{sAHP} に対する神経修飾因子の相加効果の有無を検討するために、二つの作動薬を同時投与した。 I_{sAHP} の抑制と発火頻度増加が機能的連関を示した3種類の神経修飾因子の組合せ5-HT + NA、CCh + 5-HT、NA + CChについて検討した結果、CChを含む2つの組合せにおいて、遅い後過分極での相加効果が認められた。

考 察

5-HT、CCh、NAが I_{sAHP} を減少させることで発火頻度を増加させることは、先行論文の結果と一致した。対照的に、DAは他の作動薬と同様に I_{sAHP} を抑制したにもかかわらず、スパイク頻度の増加は認められなかった。この結果は濃度依存性の実験でも確認された。実際、ラット皮質錐体細胞におけるDAの発火特性への影響は、先行研究でも見解が一致しない。DAの発火特性の機序を明らかにするには、DA受容体別に I_{sAHP} に対する効果を検討する必要がある。

特定の認知課題を遂行中のラットmPFC5層では、複数の神経修飾因子の放出が共時的に起きることが報告されている。しかし、異なる神経修飾因子が錐体細胞の発火特性に対して及ぼす相互作用についてはほとんど知られていない。本研究は、CCh + NAあるいはCCh + 5-HTというCChを含む組合せが相加効果をもつことを初めて明らかにした。相加効果は、2つの

異なる機序、すなわち、 I_{sAHP} の抑制と、 I_{sADP} の発生で生じると考えられる。

おそらく、複数の上行性アセチルコリン作動性あるいはモノアミン作動性システムの活性化が共時的に起こり、これらの修飾因子のシナプスでの濃度が I_{sAHP} の抑制に十分な濃度に達しうる。この様な条件下では、神経修飾因子間の大域的な相互作用に加えて、細胞レベルでの興奮性調節に関する相互作用が生じることによって、既に賦活化された特定の認知機能を司るPFCの神経ネットワークの持続的興奮が生じうる。その上、神経修飾因子による活性化がさらに強まれば、相加効果によってsADPが生起するため、新たな興奮性入力がなくとも持続的発火が起こり、活動性の高まった神経回路において興奮が自律的に続く可能性が考えられる。

結 論

著者らは本実験で、3種類の神経修飾因子のsAHPとスパイク頻度に対する効果について電気生理学的手法を用いて検討した。他の3種類の修飾因子と異なり、DAではsAHPの抑制効果とスパイク発火頻度増加の機能的連関が認められなかった。また、AChを含む複数の神経修飾因子は、錐体細胞の後過分極と後脱分極に対する修飾作用で相加効果を示した。こうした神経修飾因子間の相加効果が、興奮性の高まったmPFC神経回路内の第5層錐体細胞において、それぞれの単独効果よりも強力に持続的発火を惹起する可能性が考えられた。