

論文の内容の要旨

氏名：鰐原 賀子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Cholinergic modulation of firing properties and IPSCs in rat nucleus accumbens shell

(ラット側坐核における発火特性および抑制性シナプス後電流に対するコリン作動性調節)

側坐核は前脳の前方部に存在する神経細胞の集団であり、薬物依存やオーラルディスキネジアといった病態生理学的徴候の誘発に関与していることが報告されている。側坐核にはコリン作動性介在ニューロン(ChN)と3種類のGABA作動性ニューロンが存在しており、中型有棘(MS)細胞が約95%を占めている。MS細胞は近傍のMS細胞やfast spiking (FS)細胞から抑制性入力を受け、黒質網様部や腹側淡蒼球へ投射する主要なニューロンである。これに対して、側坐核におけるChNの局在はわずかに2%以下であるが、そのはたらきは側坐核でのドーパミンの放出やシナプス活性、電気生理学的特性の調節に重要な役割を担っていることが知られている。近年、光活性化イオンチャンネルを用いた研究により、*in vivo* 実験下における側坐核ChNの活性がMS細胞の自発的発火を抑制することが明らかになってきた。しかし、側坐核の局所回路における細胞レベルでのアセチルコリンの作用に関して、内因性アセチルコリンの効果や受容体のサブタイプ別の修飾メカニズムは未だ不明な点が多い。そこで本研究では、生後15-32日齢の幼若期ラットの側坐核を含む脳スライス標本を用いてホールセルパッチクランプ法を行い、MS細胞の連続発火特性と単位抑制性シナプス後電流(uIPSC)に対するコリン作動性調節について検討した。

第I章では、アセチルコリン受容体刺激によるMS細胞に対する効果を外因性ならびに内因性の観点から検討した。まず、外因性アセチルコリンの作用を検討するために、アセチルコリン受容体の非選択的アゴニストであるcarbachol (10 μ M)の灌流投与によるMS細胞の閾膜電位下応答ならびに発火特性の変化を観察した。その結果、入力抵抗の増加を伴う静止膜電位の脱分極、基電流の増加、carbacholの濃度依存的な発火頻度-入力電流(*fI*)曲線の右方移動を認めた。

次に、内因性アセチルコリンの作用を検討するためにChNを連続発火させたところ、同時記録したMS細胞の基電流は増加し、記録したMS細胞の38.9%で活動電位の発生が抑制されたが、静止膜電位の変化はわずかであった。以上の抑制作用はそれぞれムスカリン型受容体のアンタゴニストであるatropine (100 μ M)ならびにpirenzepine (10 μ M)によって拮抗されたことから、ムスカリン型受容体を介していることが推察された。

第II章では、ニコチン型ならびにムスカリン型受容体による抑制性シナプス伝達の相反的な修飾機構について検討した。側坐核におけるシナプス伝達は、少なくとも2種類のGABA作動性抑制性ニューロンを介して行われていることが知られているが、シナプス前細胞の種類によってシナプス結合の割合やuIPSCの振幅、failure rateは全く異なっている。例えば、MS-MS細胞間シナプスはシナプス結合の割合が低くuIPSCの振幅が小さい一方で、FS-MS細胞間シナプスではfailure rateが低くuIPSCの振幅は大きいことが報告されており、GABA作動性の入力源をMS細胞とFS細胞で区別して抑制性シナプス伝達のコリン作動性調節を理解する必要がある。そこでまず、MS-MS細胞間におけるuIPSCの修飾にアセチルコリン受容体のどのサブタイプが関与しているかを検討した。Carbachol (1 μ M)の灌流投与により、MS-MS細胞間におけるuIPSCの振幅は58.3%まで抑制され、paired-pulse ratio (PPR)とfailure rateの増加を認めたが、この作用はatropine (100 μ M)によって拮抗された。同様に、acetylcholine (1 μ M)とM1受容体のアゴニストであるpilocarpine (1 μ M)ではuIPSCが抑制されたものの、ニコチン型受容体アゴニストであるnicotine (1 μ M)では抑制されなかった。以上の結果から、アセチルコリンはMS細胞のムスカリン型受容体を介してシナプス前終末からのGABAの放出確率を低下させることが分かった。

次に、FS-MS細胞間のuIPSCにおけるコリン作動性調節を検討した。MS-MS細胞間シナプスとは対照的に、FS-MS細胞間ではnicotineならびにacetylcholineはfailure rateとPPRを減少させ、uIPSCの振幅を増加させたが、pilocarpineの効果はわずかであった。また、ニコチン型受容体のアンタゴニストであるhexamethonium (5 μ M)の同時投与下ではnicotineによるuIPSCの促進が拮抗された。このことから、nicotineによるuIPSCの促進もまた、シナプス前細胞の機構を介していることが示唆された。最後に、それぞれのシ

ナプス結合における acetylcholine (1 μ M) の作用を比較した。MS-MS 細胞間では uIPSC の振幅は減少し PPR と failure rate は増加したが, FS-MS 細胞間では uIPSC の振幅は増加して PPR と failure rate は減少し, 相反的な結果を得た。

以上の結果より, 側坐核において(1) carbachol の灌流投与によって, MS 細胞の連続発火頻度は抑制され, (2) ChN から放出されるアセチルコリンによっても近傍の MS 細胞の連続発火が抑制され, さらに(3) その作用はムスカリン受容体を介している可能性が示唆された。また, 側坐核のシナプスにおいては(4) MS-MS 細胞間ではムスカリン型受容体, (5) FS-MS 細胞間ではニコチン型受容体を介した抑制性シナプス伝達の修飾がなされており, シナプス前細胞のムスカリン型ならびにニコチン型受容体のサブタイプが GABA の放出に対して異なる役割を担っていることが明らかとなった。これらの所見は, 側坐核における抑制性シナプス伝達において, シナプス前細胞のアセチルコリン受容体のサブタイプによって GABA の放出を調節している可能性を示唆しており, その相反的な作用が示された。