

博士学位論文審査要旨

2024年1月30日

論文題目： Analysis of plasticity at the supramammillary nucleus to the dentate granule cell synapses
(乳頭体上核-歯状回顆粒細胞シナプスの可塑性メカニズムの解明)

学位申請者： 田淵 詠梨

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄
副査： 脳科学研究科 教授 御園生 裕明
副査： 脳科学研究科 教授 高橋 晋

要 旨：

海馬は記憶・学習を司る脳領域であり、海馬内のシナプス可塑性は記憶・学習の素過程であると考えられている。大脳皮質からの入力、嗅内皮質第2層から貫通繊維(MPP)を介して歯状回(DG)へと入るが、海馬内ではDG→CA3野→CA1野へと3つの領域を一方向で繋ぐ古典的な3シナプス性の回路を通して嗅内皮質第4～6層へと出力される。一方、海馬内の細胞は、他の脳領域からも入力を受けており、それらによる活動制御が脳機能に重要な役割を果たすと目されている。田淵氏は、そういった海馬への長距離投射の一つである乳頭体上核(supramammillary nucleus: SuM)からDG顆粒細胞に投射するシナプスに着目し、学位研究を行った。SuM-DGのシグナル伝達は、空間学習・睡眠・情動・環境的新奇性の検出に寄与している。また、SuM-DGシナプスでは、グルタミン酸による興奮性の伝達とGABAによる抑制性の伝達が同時に行われており、その生理学的な意義についての解明が待たれる。田淵氏は、まず、SuM-DGシナプスの特性を電気生理学的に解析するために、乳頭体上核のグルタミン酸ニューロン特異的にチャンネルロドプシン2を発現するマウスを作製した。このマウスから調製した海馬急性スライスに青色光を照射しつつ、DG顆粒細胞にパッチクランプ法を適用することにより、SuM-DG間のシナプス伝達を選択的に記録した。第一に、DG顆粒細胞に強い脱分極刺激を与えると、グルタミン酸シナプス伝達選択的に長期増強(LTP)が誘導されることを見出した。また、このLTPがシナプス後細胞へのCa²⁺流入に依存すること、CaMKII依存的事であること、AMPA受容体のエキソサイトーシスによることなど、分子メカニズムを明らかにした。次に、DG顆粒細胞の人工的な脱分極刺激で観察されたLTPが、より生理的的刺激で起こるかを調べた。その結果、MPPを刺激することにより、SuM-DGシナプスのLTPを惹起できた。さらに、LTPが誘導された状態では、SuM-DGシナプス単独で、DG顆粒細胞の発火を引き起こすことを見出した。これらの発見により、従来から知られていた3シナプス性回路における活動亢進が、他の脳領域から投射しているシナプスの伝達効率に影響を与え、結果として回路全体の活動が亢進することを明らかにした。これらの研究成果は、SuM-DGシナプスにおける長期シナプス可塑性の発見に加え、その神経回路における役割についても示唆を与える点で、神経科学の先端的研究成果である。よって、本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位を授与するのにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2024年1月30日

論文題目： Analysis of plasticity at the supramammillary nucleus to the dentate granule cell synapses
(乳頭体上核-歯状回顆粒細胞シナプスの可塑性メカニズムの解明)

学位申請者： 田淵 詠梨

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄
副査： 脳科学研究科 教授 御園生 裕明
副査： 脳科学研究科 教授 高橋 晋

要 旨：

博士論文提出者は、2019年4月に本学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻一貫制博士課程に入学し、現在、在籍中である。分子細胞脳科学分野・シナプス分子機能部門に属し、視床下部乳頭体上核から海馬歯状回顆粒細胞に投射するシナプスの可塑性に関する研究を行った。本研究を通じて、急性スライスを用いた長時間のパッチクランプ記録や、最新の光遺伝学を応用した実験法など、非常に高度な実験手法を体得した。本博士論文の骨子となる研究内容は、すでに国際的な自然科学雑誌である *PNAS* 誌に筆頭著者として刊行された。

2024年1月30日午前9時より約1時間30分、公聴会にて提出論文の内容を英語でプレゼンテーションを行い、質疑応答を行った。プレゼンテーションでは、研究の背景、目的、方法、結果、結論、考察が過不足なく適切に説明され、十分な語学力（英語）を有していることが認められた。プレゼンテーション後の質疑応答においても的確に回答がなされたと評価できる。

更に、2024年1月30日午後1時30分より約1時間30分、主査1名副査2名により論文内容並びに関連する脳科学分野の諸問題について非公開の口頭試問を実施した結果、本論文提出者は当該分野の研究者として十分な知識と、ディベート能力を有していることが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

Abstract of Doctoral Dissertation

論文題目: Analysis of plasticity at the supramammillary nucleus to
Title of Doctoral the dentate granule cell synapses
Dissertation (乳頭体上核-歯状回顆粒細胞シナプスの可塑性メカニズムの解明)
氏名: 田淵 詠梨
Name

要旨: Abstract

ニューロンは細胞体、樹状突起、軸索からなる細胞である。ほとんどのニューロンは樹状突起と細胞体を通して信号を受け取り、軸索を通して信号を送る。神経細胞は、電気シナプスや化学シナプスと呼ばれる軸索と樹状突起の接合部で互いに連絡を取り合う。中枢神経系の細胞の大半は化学シナプスを使用している。化学シナプスはシナプス前細胞からの電気信号を、神経伝達物質と呼ばれる化学伝達物質の放出に変換する。シナプス前終末では、神経伝達物質はシナプス小胞と呼ばれる直径 40 nm ほどの丸い細胞内小器官に貯蔵される。活動電位がシナプス前終末に到達すると、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開く。 Ca^{2+} の流入によってシナプス小胞がシナプス前膜と融合し、神経伝達物質がシナプス前細胞とシナプス後細胞の間の 20-100 nm の隙間（シナプス間隙）に放出される。そして神経伝達物質が拡散し、シナプス後膜上に存在する特異的受容体に結合することで、シナプス後細胞の興奮または抑制を引き起こす。この一連のシグナル伝達をシナプス伝達という。シナプス伝達の強度は活動依存的に変化することが知られており、シナプス可塑性と呼ぶ。シナプス可塑性は数ミリ秒から数日間に亘って持続し、特に 1 時間以上継続するものを長期増強 (LTP) または長期抑制 (LTD) という。ある神経細胞 A と A から投射を受ける神経細胞 B について、A がくり返し B の発火に関わり活動が同期するとき、A と B のシナプス結合は強化されるという法則をヘブ則と呼ぶ。NMDA 型グルタミン酸受容体は静止電位付近で Mg^{2+} によりブロックされており、シナプス後細胞の脱分極によって解除される。このため、NMDA 型受容体は神経活動の同時性検出器として機能することができる。NMDA 型受容体依存的な LTP が見つかっており、ヘブ則に従うシナプス可塑性として注目されてきた。このようなシナプス可塑性は記憶・学習の素過程と考えられ多くの研究が行なわれてきた。

海馬は、記憶形成に必須の脳領域である。その構造は歯状回 (DG) と CA1 野、CA2 野、CA3 野に大別でき、DG には顆粒細胞 (GC)、CA1 野から CA3 野には錐体細胞が主な細胞として存在する。大脳皮質からの情報は主に嗅内皮質 (第 2 層) から貫通線維 (MPP) を介して DG に入る。つぎに DG から CA3 野、そして CA1 野へと 3 つの領域を一方向に繋ぐ興奮性回路が存在する。このいわゆる 3 シナプス性の回路を通して嗅内皮質 (第 4~6 層) に出力される。このような古典的な 3 シナプス性の海馬内回路だけでなく、海馬は他の脳領域からも入力を受けており、様々に活動が調節されている。そういった長距離投射の中でも、視床下部に位置する乳頭体上核 (SuM) は、DG と CA2 野に投射することが解剖学的に知られている。SuM から海馬への出力は空間学習や睡眠、情動、環境的新奇性の検出に寄与することが示唆されている。最近の研究で、成熟したマウス脳の SuM と GC が直接シナプスを形成し、グルタミン酸と GABA という 2 種類の神経伝達物質が共放出されることが明らかになった。しかし、なぜ興奮性と抑制性の速い作用を持つ神経伝達物質が同じ神経終末から放出されるのか、その生理的意義はよくわかっていない。同じように成熟脳でグルタミン酸と GABA が共放出されるシナプスがいくつか見つかっており、なかでも外側手綱核においてグルタミン酸と GABA の共放出の比が鬱やコカイン摂取によって変化することが報告されている。このことから共放出比がダイナミックに変化する可

能性が示唆される。すなわち興奮と抑制のバランスをダイナミックに変化させ DG の情報処理に重要な役割を果たす可能性が示唆される。このように SuM から DG への投射がいくつかの脳機能に寄与しているという新たな証拠が得られているにもかかわらず、細胞レベル、シナプスレベル、回路レベルでどのように脳機能に関与しているかは不明なままである。

本研究では、活動依存的な長期可塑性が SuM-GC シナプスで誘導され、DG 情報処理に寄与しているかどうかを明らかにするため実験を行った。SuM-GC シナプスにおけるシナプス可塑性を調べるために、電気生理学の手法を用いた。海馬は多様な領域からの投射を受けているため、従来の電極を用いた刺激では、乳頭体上核から歯状回顆粒細胞に投射する神経線維を選択的に刺激することが困難であった。この点を解決するために光遺伝学の手法を用いた。歯状回顆粒細胞に投射する乳頭体上核ニューロンは VGluT2 陽性であるため VGluT2-Cre マウスを用い、生後 19~20 日齢の乳頭体上核にアデノ随伴ウイルス (AAV-DIO-ChR2-eYFP) を定位脳手術によりインジェクションした。インジェクション後 3 週目のマウスから海馬急性スライスを作製し、顆粒細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。この際、 -60 mV に電圧を固定し、青色光の照射 (5 ms) でチャンネルロドプシン-2 を発現している乳頭体上核由来の神経線維を活性化し、興奮性シナプス後電流 (EPSC) または抑制性シナプス後電流 (IPSC) を計測した。光は 40 倍の対物レンズを通して視野を中心にスライスに照射した。光照射は 0.05 Hz、2 発刺激 (100 ms 間隔) で行った。細胞外液を灌流し、計測時の温度は $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ を保つようにした。

実験の結果、SuM-GC シナプスにおいてシナプス後細胞に脱分極刺激 ($+0\text{ mV}$ 、2 秒間、5 秒ごとに 10 回) を与えることで LTP が生じることが明らかになった。この LTP について次の 3 点のことを明らかにした。① LTP の誘導メカニズム：各種の阻害剤を用いることで LTP の誘導メカニズムを明らかにした。この脱分極誘導性の LTP はグルタミン酸の NMDA 型受容体には非依存的であり、ヘブ則に従わない LTP であることが明らかになった。電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルを介した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) の活性化、AMPA 型グルタミン酸受容体のエキソサイトーシスが必要であった。また、MPP に生理的な条件下の活動を模倣した刺激を与えることで GC が脱分極し、SuM-GC シナプスにおいて LTP が誘導されることも確認した。② 入力特異性と細胞特異性がある：LTP はどのシナプスにおいても等しく生じるわけではない。GC への入力には MPP を介した嗅内皮質からの入力の主である。しかしながら、GC に脱分極刺激を与えても MPP-GC シナプスの EPSC に変化は生じなかった。また、SuM は DG の抑制性神経細胞 (IN) や CA2 野の錐体細胞にも直接シナプスを形成している。SuM-IN、SuM-CA2 錐体細胞においても、シナプス後細胞に脱分極刺激を与えたが、EPSC に変化は見られなかった。このことから入力特異性や細胞特異性があることが明らかになった。③ 脱分極誘導性の LTP は興奮/抑制バランスを大きく興奮側にシフトさせる：SuM-GC シナプスはグルタミン酸と GABA を共放出しているが、IPSC は脱分極刺激の前後で変化しなかった。つまり、SuM-GC シナプスの興奮性入力においてのみ引き起こされる作用を持つことが明らかになった。

本研究では、SuM-GC シナプスの脳機能への寄与についてシナプス、細胞レベルから明らかにすることを試みた。その結果、グルタミン酸と GABA の共放出が、機能的意味を持つことを明らかにした。すなわち、興奮と抑制のバランスを嗅内皮質からの入力に応じて動的に調節できるのである。このようなシナプス可塑性は、DG の情報処理を調節し、SuM-DG 回路に関連した脳機能に寄与すると考えられる。