

大脳皮質ニューロンの神経回路形成におけるセロトニン4型受容体の機能解析

加瀬谷 治樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 志賀 隆 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

セロトニン (5-HT) はモノアミンの一種であり、成体の脳では神経伝達物質として神経精神活動を制御し、その異常はうつ病などの精神疾患に関与する。また、発達期では神経栄養因子としてニューロンの生存や分化、樹状突起の発達、シナプス形成などの神経発生過程を制御するが、5-HT 受容体の役割について不明な点が多い。

神経回路は感覚や運動だけでなく記憶学習を含む高次機能などの神経機能の基盤をなす。この神経回路の形成における 5-HT 受容体の役割を理解するために、発達期の神経細胞を用いて、単一の細胞の形態変化に注目した。発達過程において、神経細胞は細胞体から複数の神経突起を伸ばし (神経突起の新生)、それらが伸長や分岐をしながら軸索と樹状突起に分化する。これらのプロセスによって、ニューロンは特徴的な樹状突起と軸索の形態をとるようになり、その形態は機能と密接な関連がある。神経細胞間の情報伝達は樹状突起や細胞体で情報を受け取り、軸索を通じて周囲の神経細胞に情報が伝達されている。そこで情報の受信側であり、神経回路形成の制御に関与している樹状突起に注目した。

5-HT 受容体は7つのファミリー (5-HT₁₋₇) に分類され、現在までに14種類のサブタイプが同定されている。5-HT₃ 受容体はイオンチャネル型受容体であり、その他の受容体はすべて G タンパク共役 7 回膜貫通型受容体である。これらの受容体の中で、5-HT_{1A}、1B と 2A、2C、4 受容体の発現が大脳皮質の前頭皮質において報告されている。

ラット胎仔の大脳皮質ニューロンを用いた培養実験で 5-HT_{1A} 受容体作動薬は神経突起の伸長と分岐形成を抑制する一方、5-HT_{2A/2C} 受容体作動薬は作用時間に応じて樹状突起形成を抑制、または促進することが報告されている。また、5-HT₄ 受容体作動薬がマウス新生仔の海馬ニューロンの全神経突起長と神経突起数を減少させるという報告があるが、大脳皮質ニューロンの樹状突起における 5-HT₄ 受容体の役割を調べた報告はまだない。そこで本研究では 5-HT₄ 受容体作動薬を用いて、ラット胎仔の前頭皮質の初代分散培養を行い、樹状突起の発達における 5-HT₄ 受容体の作用を探ることを試みた。

方法

1. 前頭皮質の初代分散培養

胎生 18 日目のラット (WistarST) の前頭皮質を剖出後に神経細胞を分散し、血清培地に 4×10^4 cells/cm² で播種した。8 時間後に無血清培地に交換し、5-HT₄ 受容体作動薬 (RS67333) を含む無血清培地に交換した。播種後 2 日目に培地を交換し、4 日目に 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。また、拮抗薬を添加する場合には作動薬を添加する 30 分前から添加した。

2. 蛍光免疫染色

分散培養したニューロンを樹状突起のマーカーである微小管関連蛋白 2 (MAP2) と抑制性ニューロンのマーカーであるグル

タミン酸脱炭酸酵素 65 (GAD65) に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色した。

3. 観察・画像解析

共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 META, Carl Zeiss) で画像を取得し、樹状突起解析ソフト Neurocyto Image Analyzer (KURABO) を用いて興奮性ニューロンの樹状突起の形態を解析した。解析では全樹状突起長 (すべての樹状突起の長さの合計)、一次樹状突起数 (細胞体から直接出る樹状突起の数)、平均樹状突起長 (全樹状突起長 / 一次樹状突起数)、平均分岐回数 (全分岐回数 / 一次樹状突起数) を測定した。なお、一次樹状突起数、平均樹状突起長、平均分岐回数はそれぞれ樹状突起の新生、伸長、分岐形成を示す指標と考えられる。

結果・考察

1 nM、10 nM、100 nM の RS67333 の 4 日間添加により、大脳皮質の興奮性ニューロンの全樹状突起長と平均樹状突起長、平均分岐回数が増加した。一方で、一次樹状突起数は 100 nM のときのみ増加した。次にこの作用の 5-HT₄ 受容体特異性を明らかにするために、RS67333 (100 nM) と 5-HT₄ 受容体の拮抗薬である GR125487 (1 nM) を同時添加したところ、作動薬による全樹状突起長と平均分岐回数の増加が拮抗薬により完全に打ち消された。また、一次樹状突起数の増加が拮抗薬によりほぼ打ち消された。したがって、5-HT₄ 受容体を介して、樹状突起の新生と分岐形成を促進させることが示唆された。この結果に対して、5-HT₄ 受容体に関する先行研究では海馬ニューロンの全神経突起長と神経突起数を減少させる。本研究と先行研究の結果の違いは、培養に用いたニューロン (大脳皮質 vs 海馬)、観察対象 (樹状突起 vs 神経突起)、培養期間 (4 日 vs 1 日)、作動薬 (RS67333 vs BIMU8)、薬剤の添加時間 (4 日 vs 20 時間) が異なることが考えられる。

5-HT₄ 受容体は G_s タンパク質と共役しているため、アデニル酸シクラーゼを活性化させる。そしてこの細胞シグナルの下流において脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現が活性化されるという報告がある。そこで BDNF の受容体である TrkB の拮抗薬 (Cyclotraxin-B) を用いて形態変化の観察を行った。RS67333 (100 nM) と Cyclotraxin-B (100 nM) を同時添加したところ、作動薬による全樹状突起長と平均樹状突起長、平均分岐回数の増加が拮抗薬により打ち消された。したがって、5-HT₄ 受容体の作用機序として BDNF / TrkB を介することで樹状突起の伸長と分岐形成を促進させることが示唆された。なお、作用機序についてはまだ解析した例数が十分ではないため、今後さらに検討する必要があると思われる。