

学位論文の内容の要旨

清水 英雄 印

Allopregnanolone increases mature excitatory synapse along dendrite via protein kinase A signaling
(アロプレグナノロンによるProtein Kinase Aを介した興奮性シナプス増加効果)

アロプレグナノロン (AP α ; 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one) は末梢、中枢の神経系でプロゲステロンから代謝される。先行研究から、AP α はアルツハイマー病やうつ病といったシナプスの機能不全に関係する疾患の症状を改善する作用を持っていることが示唆されている。このことから、AP α は興奮性シナプスを調節する働きがあるのではないかと考えられる。

アクチン結合タンパク質であるドレブリンは、樹状突起スパインの形態形成のほか、PSD-95やグルタミン酸受容体の樹状突起スパイン内への集積にも関与している。これは、ドレブリンの樹状突起スパインへの集積が、スパインの成熟と密接に関わっていることを示唆している。アルツハイマー病や軽度認知機能障害患者の脳では、ドレブリンの量は認知機能レベルと正の相関があることが報告されている。加えて、我々は、可溶性アミロイドベータオリゴマーによって、樹状突起スパインへのドレブリンの集積が阻害されることが報告した。

本研究では、AP α が成熟海馬培養神経細胞において興奮性シナプス密度を増加させるかどうかを、ドレブリンを成熟した興奮性シナプスの指標として用いて検討した。

Banker法に従って作製した低密度海馬初代培養神経細胞にAP α を添加し、24時間後に固定した後、蛍光免疫細胞化学染色を用いてドレブリンの集積を調べた。ドレブリンは樹状突起スパインに集積する性質があるため、樹状突起上のドレブリンの集積を解析することで、興奮性シナプスの評価を定量的に行うことが可能である。この集積の解析は、メタモルフソフトウエアを用いて行った。神経細胞の蛍光免疫染色画像において、樹状突起の平均輝度を算出した後、その平均輝度の2倍以上の輝度を持つ領域を同定して、この領域の樹状突起上の密度を測定した。また、GFPの強制発現により形態を可視化した神経細胞においても、同様にAP α を添加し、樹状突起スパインの密度と形態についても観察した。

GFPを発現させた神経細胞を用いた形態解析の結果、0.3 μ Mと1 μ MのAP α 24時間処理では対照群と比較して有意に樹状突起スパイン密度が高かった。また、AP α が樹状突起スパインの形態に影響を与えるかどうかを調べるために、スパインの幅と長さを計測したが、有意な差は見られなかった。

AP α の興奮性シナプスに対する影響を調べるために、ドレブリンクラスター数を計測した結果、樹状突起スパイン密度の結果と同様に、0.3 μ Mと1 μ MのAP α 24時間処理で対照群と比較して有意にドレブリンクラスター密度が増加していた。これらのAP α による樹状突起スパインとドレブリンクラスターの増加は、AP α が興奮性シナプスを増加させたことを示している。また、このAP α によるドレブリンクラスター密度の増加は、Protein kinase A (PKA) 阻害剤であるH-89の前処理により阻害されることが示された。このことから、AP α はPKAシグナルを介して、興奮性シナプスの増加に働いている可能性が示唆された。

PKAはCREBをリン酸化させることが知られており、それにより樹状突起スパイン形成を促進しているということが報告されている。また、近年では、AP α がcAMPを増加させることが報告されており、cAMPはPKA-CREBシグナル経路を活性化させる。これらのことは、本研究において、cAMP-PKA-CREBシグナル経路がAP α による興奮性シナプスの増加に関係していることを示唆している。また、PKAの活性化はAMPA受容体の樹状突起スパイン表面での発現を促進し、AMPA受容体の活性化はドレブリンの樹状突起ス

スパイン内への集積に関わっている。このことから、本研究では、AP α によって活性化したPKAがAMPA受容体の活性化を通して、ドレブリンの樹状突起スパイン内への集積を促進した可能性も考えられる。

AP α の投与によってアルツハイマーモデルマウスの認知機能が正常レベルまで回復するという報告があり、また、アルツハイマー病患者の脳皮質ではAP α 濃度が低いという報告もある。本研究では、AP α は興奮性シナプスを増加させるということを示した。これらのことから、AP α は、シナプスの減少を伴うアルツハイマー病に対して抑制的に作用するかも知れない。

以上をまとめると、本研究は、AP α がPKAシグナル経路を介して興奮性シナプスを増加させることを示している。この結果は、近年提唱されている、アルツハイマー病やうつ病といったシナプスの機能不全に関わる精神神経疾患に対して、AP α が治療的な効果を持つ可能性を支持している。