

# Modulation of allopregnanolone on excitatory transmitters release from single glutamatergic terminal

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-05-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩田, 暁美 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/2814">http://hdl.handle.net/10271/2814</a>

博士(医学) 岩田 暁美

論文題目

Modulation of allopregnanolone on excitatory transmitters release from single glutamatergic terminal

(アロプレグナノロンによる単一グルタミン酸作動性神経終末からの興奮性神経伝達物質放出の調節)

論文の内容の要旨

[はじめに]

アロプレグナノロンなどの神経ステロイドは脳の海馬や皮質などに広く存在し、 $\gamma$ -aminobutyric acid type A ( $GABA_A$ ) 受容体のポジティブアロステリック作用を持つ。 $GABA_A$  受容体はシナプス後膜だけでなくシナプス前神経終末にも存在し、その活性化はシャント効果によりシナプス前活動電位を抑制し、神経伝達物質の放出を減少させる(シナプス前抑制)。シナプス後ニューロンでは神経ステロイドの  $GABA_A$  受容体調節機構がよく知られているが、シナプス前  $GABA_A$  受容体への作用については、神経終末が小さく直接記録が困難などの理由から、殆ど調べられていない。

本研究では、海馬 CA3 錐体ニューロンを機械的に単離し、機能的なグルタミン酸作動性神経終末(ブートン)が多数付着した単一ニューロンを用いて、ブートンからのグルタミン酸放出に対するアロプレグナノロンの作用を調べた。

[材料ならびに方法]

本研究は熊本保健科学大学動物実験委員会の承認を得て実験を行った。生後 14-18 日齢のウィスター系ラットより脳を摘出し、厚さ 400  $\mu\text{m}$  の海馬脳薄切片標本を作成した。その後、海馬 CA3 錐体ニューロンを機械的処理のみで単離し、単一 CA3 ニューロンのシナプス・ブートン標本を作成した。そして、得られたシナプス・ブートン標本にホールセルパッチクランプ法を適用して、シナプス後ニューロンの CA3 ニューロンより自発性グルタミン酸遊離によるシナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic currents, sEPSCs) を記録した。また、単一ブートンをシングルパルスまたはペアパルスで焦点電気刺激することで、活動電位依存性のシナプス後電流 (evoked excitatory postsynaptic currents, eEPSCs) を誘発し記録した。そして、sEPSCs と eEPSCs の発生頻度、電流振幅、シナプス後電流の発生失敗率やペアパルス比(1 発目振幅に対する 2 発目振幅の相対比)を指標として、アロプレグナノロンのこれら電流要素への効果を検討し、グルタミン酸作動性神経終末へのシナプス前作用を評価した。

[結果]

膜電位固定した海馬 CA3 錐体ニューロンにアロプレグナノロンを投与すると濃度依存的に外向き電流を誘発した。また、 $GABA_A$  受容体アゴニストのムシモール (100 nM) により誘発した外向き電流に対し、低濃度のアロプレグナノロンを同時投与すると、

後者の濃度依存的に電流を増大させた。しかし、グルタミン酸 (10  $\mu\text{M}$ ) 誘発の内向き電流に対しては、アロプレグナノロンの同時投与は効果がなかった。この結果から、アロプレグナノロンは低濃度で  $\text{GABA}_A$  受容体応答を増強し、高濃度では直接的に膜に外向き電流を誘発することがわかった。一方で、sEPSCs に対しては 10 nM アロプレグナノロンは頻度を増加させたが振幅は変化させず、30 nM では振幅と頻度の両方を増加させ、100 nM 以上では、頻度だけをわずかに減少させた。

シングルパルスの焦点電気刺激による eEPSCs では、10 nM のアロプレグナノロン投与で振幅が有意に増加し、発生失敗率は減少した。しかし、100 nM では逆に eEPSCs の振幅が有意に減少し、発生失敗率は増加した。ペアパルスの焦点電気刺激による eEPSCs では、10 nM アロプレグナノロンの投与で振幅が増加し、1 つ目の電流の発生失敗率とペアパルス比が減少した。一方で、100 nM では振幅が減少し、発生失敗率とペアパルス比が増加した。これらの変化は  $\text{GABA}_A$  受容体遮断薬で消失した。

シナプス後の電位依存性 Na チャネルと Ca チャネルに対しては、30-1000 nM アロプレグナノロンはどちらにも有意な効果はなかったが、3000 nM では有意に Na 電流を抑制した。

以上の結果から、アロプレグナノロンがシナプス前  $\text{GABA}_A$  受容体を介して、グルタミン酸放出を調節することが明らかとなった。

#### [考察]

sEPSCs に対する低濃度 (10-30 nM) アロプレグナノロンでの頻度の増加は、シナプス前  $\text{GABA}_A$  受容体の活性化によって適度にシナプス前終末が脱分極し、終末の興奮性が増加した可能性がある。一方で、高濃度での頻度の減少は、シナプス前  $\text{GABA}_A$  受容体のより強い活性化によってシナプス前終末に強い脱分極が起こり、シナプス前  $\text{Na}^+$ チャネルの不活性化やシャント効果により伝達物質の放出が減少したためと考えられる。これは、ムシモールを低濃度及び高濃度で投与した場合にも同様の効果が得られることから支持される。また、このような濃度依存性の相反的シナプス前作用は eEPSCs でもみられた。アロプレグナノロンのペアパルス比への影響から、低濃度(10 nM) では  $\text{GABA}_A$  受容体を介してわずかにシナプス前終末を脱分極させ、シナプス前活動電位発火または  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性化を促進してグルタミン酸放出確率を増やすことを示唆する。また 100 nM 以上の高濃度では、細胞膜抵抗のシャントまたはシナプス前  $\text{GABA}_A$  受容体の持続的な脱分極による  $\text{Na}^+$ チャネルの不活性化の寄与が考えられる。

$\text{GABA}$  作動性介在ニューロンの活性化は、直接的(シナプス後)及び間接的(シナプス前)に CA3 錐体ニューロンの興奮性を調節する。アロプレグナノロンのシナプス前作用は、シナプス後  $\text{GABA}_A$  受容体の調節に加え、CA3 ニューロンへのフィードフォワード抑制をももたらす。アロプレグナノロンの脳内での濃度は、性周期や妊娠、ストレスやアルコール摂取により変化するので、アロプレグナノロンによるグルタミン酸放出の濃度依存的調節は、海馬が関わる病態生理学的状態における、種々の脳機能変

化の一因となっている可能性がある。

[結論]

アロプレグナロンは、グルタミン酸作動性神経終末の **GABAA** 受容体の活性化を介した脱分極によりグルタミン酸放出を調節することが明らかになった。