

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	脳神経科学領域神経生理学講座 氏名 上野 達哉
<p>(論文題目) Morphological and electrophysiological changes in intratelencephalic-type pyramidal neurons in the motor cortex of a rat model of levodopa-induced dyskinesia (レボドパ誘発ジスキネジアモデルラット運動皮質錐体神経細胞における形態学的・電気生理学的変化)</p>	
<p>【背景】レボドパ誘発ジスキネジア (levodopa-induced dyskinesia; LID) は、パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) に対するドパミン補充療法により出現し、進行期 PD 患者にとっては深刻な運動合併症である。動物実験にて皮質線条体シナプスの興奮性伝達における感受性の増大が LID 発現に関与していることが示されてきている。一方、LID を伴う PD 患者の大脳運動皮質においても長期増強の過剰維持といった皮質線条体シナプスと類似した可塑性異常が経頭蓋磁気刺激法により示されている。シナプス可塑性には樹状突起スパインの形態変化が重要な役割を果たしていることが知られているが、LID 患者に見られる運動皮質の可塑性異常について細胞レベルでの検討はない。線条体に投射する大脳皮質運動野の神経細胞には Intratelencephalic-type neuron (ITN) および Pyramidal-tract type neuron があり、前者は主に直接路を形成する線条体神経細胞へ、後者は主に間接路の線条体神経細胞へ投射する。LID 発現には直接路が中心的な役割を果たしていることから、私たちは LID モデルラットにおける運動皮質 ITN の樹状突起スパインの形態変化および ITN の電気生理学的変化を検討した。</p> <p>【方法】雄 Wistar rat (生後 18-20 週) を使用。コントロール、6-hydroxydopamine (6-OHDA) による PD モデルラット、LID モデルラット、レボドパを投与したコントロールラット (levodopa-treated control : LTC) の 4 群を作成。6-OHDA を右 medial forebrain bundle へ注入し右脳の前脚質脱神経を行い PD モデルを作成、PD モデルにレボドパ (50 mg/kg) + ベンセラジド (12.5 mg/kg) を 1 日 2 回 14 日間投与を行い abnormal involuntary movement score により LID を確認した。LTC も同様の方法でレボドパ投与を行った。</p> <p>① ITN 樹状突起スパインの形態学的変化の検討では、上記 4 群を使用した。左線条体背外側部に逆行性トレーサーの Fast blue を注入。4 日後灌流固定し、厚さ 250 μ m の切片を作成。Fast Blue によりラベルされた右運動皮質第 5 層の ITN 細胞体に蛍光色素の Lucifer Yellow を注入しスパインを可視化した。共焦点顕微鏡を用い樹状突起を撮影、Image J を用いて、スパイン密度とスパイン頭部断面積をコントロール、PD モデル、LID モデル、LTC モデル (各 8 匹) のそれぞれ 51 細胞、56 細胞、49 細胞、47 細胞から計測した。</p> <p>② ITN の電気生理学的検討では、左線条体背外側部に逆行性トレーサーの DiI を注入し 4-7 日後、運動野を含む冠状切片を作成し、DiI で標識された右運動皮質 5 層の ITN から patch-clamp 法を用いて miniature excitatory synaptic current (mEPSC) を記録した。コントロール 9 匹、PD モデル 6 匹、LID モデル 12 匹の、それぞれ 30 細胞、24 細胞、39 細胞から記録した。</p>	

統計は Schapiro-Wilk 検定で正規性を確認した。スパイン密度・スパイン頭部断面・mEPSC 振幅は Kruskal-Wallis 検定後に Steel-Dwaas 多重比較を行った。また、mEPSC 周波数は ANOVA を用い、Post hoc 検定として Tukey 法による多重比較を行った。

【結果】 スパイン密度は 4 群間で有意差はみられなかった(コントロール: 8.1 ± 0.47 (mean \pm SEM); PD: 9.3 ± 0.25 ; LID: 9.0 ± 0.66 ; LTC: 12.0 ± 1.42)。スパイン頭部断面積はコントロール<PD<LID で有意に増大し、LID は LTC よりも優位に増大していた(コントロール: $0.31 \pm 0.062 \mu\text{m}^2$; PD: $0.41 \pm 0.014 \mu\text{m}^2$; LID: $0.48 \pm 0.020 \mu\text{m}^2$; LTC: $0.31 \pm 0.030 \mu\text{m}^2$)。mEPSC 周波数は 3 群間で有意差がみられなかったが(control: $7.5 \pm 0.54 \text{ Hz}$; PD: $7.8 \pm 0.56 \text{ Hz}$; LID: $9.2 \pm 0.52 \text{ Hz}$)、mEPSC 振幅はコントロールと比較し LID で有意に増大していた(コントロール: $10.0 \pm 0.23 \text{ pA}$; PD: $10.9 \pm 0.31 \text{ pA}$; LID: $11.4 \pm 0.29 \text{ pA}$)。

【考察】 今回の結果は LID 発現には ITN のスパイン密度の変化ではなくスパインの肥大が重要な役割を果たしていることを示している。mEPSC 周波数の決定要因の一つにスパイン数があり、LID モデルにおいてスパイン密度が不変であったことは mEPSC 周波数が不変であったことと合致していた。一方でスパインの肥大はシナプス後膜への AMPA 受容体挿入量と相関するため、LID モデルにおけるスパイン肥大は mEPSC (AMPA current を計測している) 頻度の増大と合致した結果であった。即ち今回の LID モデルにおける形態学的変化と電気生理学的変化はともに ITN が興奮刺激に対して感受性が高まっていることを示している。しかしながらジスキネジアが起こらない PD モデルにおいてもスパインの肥大が軽度認められたことは、スパインの肥大だけで ITN の過感受性獲得を説明できないことを示唆している。

【結語】 運動野 ITN の樹状突起スパインの肥大による同神経細胞の過感受性の獲得が LID 発現に関与している可能性がある。