

## 学位論文題名

# 加齢および一過性脳虚血による海馬長期増強 (long-term potentiation ; LTP) の変化とそのメカニズム

## 学位論文内容の要旨

近年高齢社会を迎え、老年期に引き起こされる痴呆が大きな社会問題になってきている。そこで記憶学習の電気生理学的基盤であると考えられている海馬の長期増強現象 (long-term potentiation; LTP) に着目して、老年期における記憶学習障害の科学的論拠を検討した。さらに老齢期における記憶学習障害の要因の一つである脳虚血に焦点を当て、脳虚血が引き起こす記憶学習障害の神経科学的基盤を電気生理学的、行動学および生化学的観点から検証した。

老齢のモデルとしては、20-22 月齢の Fischer344 雄性ラットを用いた。老齢ラットの記憶学習障害を検討する目的で、電気生理学的検討として LTP の測定、生化学的検討としてマイクロダイアリシス法を用いた。老齢ラットにハロセン吸入麻酔を施行し、刺激電極を海馬の Schaffer 側枝および貫通線維に挿入し、記録電極を海馬 CA1 および歯状回に挿入した。高頻度電気刺激を与え、シナプスの伝達効率の変化を 1 時間比較検討した。また LTP 形成の際、逆行性の神経伝達物質の一つであると考えられている一酸化窒素 (Nitric oxide; NO) 産生の指標として、その酸化代謝物 (NOx; NO<sub>2</sub>-と NO<sub>3</sub>-の和) をマイクロダイアリシス法を用いて測定し、老齢期の LTP 形成の変化の誘因を検討した。すなわち Schaffer 側枝に高頻度刺激をした際の NO 動態とシナプス伝達効率の変化を同時測定し、LTP 形成と NO 産生の関連性を老齢ラットと若年ラットを用いて比較検討した。海馬 CA1 領域では、高頻度刺激による海馬内 NO は、シナプス伝達効率の増加に伴って有意に増加し、その変化は 2 時間以上持続した。老齢ラットでは海馬の CA1 および歯状回領域での LTP 現象も抑制され、高頻度刺激による NO の増加も認められなかった。

脳虚血のモデルとしては Wistar 系雄性ラットを用いた。両側総頸動脈を 10 分間結紮し、再還流したもの (2-vessel occlusion; 2-VO) を不完全一過性脳虚血モデルとし、椎骨動脈を永久焼灼した後に両側総頸動脈を 10 分間結紮し、再還流したもの (4-vessel occlusion; 4-VO) を完全脳虚血モデルとした。これらのモデルを用いて、電気生理学的と生化学的検討とあわせて行動学的検討を行った。脳虚血の際、過大なグルタミン酸の細胞内への流入が引き金となるサイトカインの増加および誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase; iNOS) の誘導が脳虚血に対し障害的に働くことが知られている。そこで炎症性サイトカインの一種である IL-1 $\beta$  とその拮抗薬、および iNOS の阻害薬である aminoguanidine を用いて、脳虚血モデルでの海馬 LTP、NO の変化を比較検討した。さらに実際にラットに記憶学習行動をさせ、虚血による記憶学習障害と NO の関与を検討した。LTP は Schaffer-CA1、貫通線維-歯状回に加え mossy fiber-CA3 についても検討した。虚血による NO の変化に関して

はマイクロダイアリシス法を用いて、虚血1日、4日、7日後の変化を検討した。行動学的には記憶学習のタスクであると考えられている Y 字迷路テストと contextual fear conditioning (文脈的恐怖条件付け) を行った。

脳虚血のモデルである 2-VO では組織学的には細胞の脱落などの変化は認められなかった。LTP は虚血1日後には CA1 領域のみ有意な抑制が認められたが、歯状回領域では軽度の抑制にとどまった。虚血4日後には CA1、歯状回領域ともに有意な抑制が認められた。NO の変化は虚血1日後、4日後ともに有意な変化は認められなかった。iNOS の阻害薬である aminoguanidine の前投与によっても LTP の改善は認められなかった。

4-VO での NO は虚血1日後、および4日後に増加が認められた。虚血7日後には NO の増加は認められず、偽手術群との間に差異は認められなかった。IL-1 $\beta$  の拮抗薬および aminoguanidine の前投与によりこれら NO の増加は有意に抑制された。LTP に関しては、4-VO により CA1、歯状回領域では有意に抑制されたが、CA3 領域に関しては変化は認められなかった。IL-1 $\beta$  拮抗薬および aminoguanidine の前投与により歯状回領域の LTP 形成は改善されたが、CA1 領域に関しては変化が認められなかった。行動学的には Y 字迷路テスト、contextual fear conditioning とともに 4-VO により障害が認められ、それらの障害は aminoguanidine の前投与により改善された。また、コントロール群のラットに対し IL-1 $\beta$  を側脳室内投与することにより海馬の NO は有意に増加し、CA1、歯状回領域の LTP は有意に抑制された。

これらのことから加齢により、海馬 LTP 形成の抑制が認められることが示唆された。また高頻度刺激の際、逆行性神経伝達物質の一つである NO の産生障害が LTP 形成障害の一つの誘因となっている可能性が示された。

一方、炎症性サイトカインが引き金となる iNOS 由来の NO は脳虚血 24 時間後をピークに遅発性に増加し、その NO の増加が海馬、とくに歯状回領域の LTP の抑制および記憶学習障害に一部関与している可能性が示された。また NO は記憶学習に対し両方向性の作用を有することが明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 岡 充 弘  
副 査 教 授 小 山 司  
副 査 教 授 本 間 研 一

学 位 論 文 題 名

## 加齢および一過性脳虚血による海馬長期増強

### (long-term potentiation ; LTP) の変化とそのメカニズム

近年高齢社会を迎え、老年期に引き起こされる痴呆が大きな社会問題になりつつある。そこで記憶学習の電気生理学的基盤であると考えられている海馬の長期増強現象 (long-term potentiation; LTP) に着目して、老年期における記憶学習障害の科学的論拠を検討した。さらに老齢期における記憶学習障害の要因の一つである脳虚血に焦点を当て、脳虚血が引き起こす記憶学習障害の神経科学的基盤を電気生理学的、生化学的および行動学的観点から検証した。

老齢ラットの記憶学習障害を検討する目的で、電気生理学的検討として LTP の測定、生化学的検討としてマイクロダイアリシス法を用いた。Schaffer 側枝を高頻度刺激した際のシナプス伝達効率の変化と逆行性神経伝達物質である NO の動態を同時測定し、LTP 形成と NO 産生の関連性を老齢ラットと若年ラットを用いて比較検討した。若年ラットの海馬 CA1 領域では、高頻度刺激によるシナプス伝達効率の増加に伴って NO 産生が有意に増加したのに対し、老齢ラットでは LTP 現象は抑制され、高頻度刺激による NO の増加も認められなかった。脳虚血のモデルとして、両側総頸動脈を 10 分間結紮したもの (2-VO) を不完全一過性脳虚血モデルとし、椎骨動脈を永久焼灼した後に両側総頸動脈を 10 分間結紮したもの (4-VO) を完全脳虚血モデルとして、電気生理学的、生化学的ならびに行動学的検討を行った。また炎症性サイトカインの一種である IL-1 $\beta$  の拮抗薬、および iNOS の阻害薬である aminoguanidine を用いて、脳虚血モデルでの海馬 LTP ならびに NO 産生の変化を比較検討した。さらに、実際にラットの記憶学習関連行動を観察し、虚血による記憶学習障害と NO の関連性を検討した。LTP は Schaffer-CA1、貫通線維-歯状回に加え mossy fiber-CA3 についても検討した。虚血による海馬 NO 産生に関してはマイクロダイアリシス法を用いて、虚血 1 日、4 日、7 日後の変化を検討した。行動学的検討として記憶学習のタスクと考えられている Y 字迷路テストと contextual fear conditioning を行った。2-VO モデルでは、LTP は虚血 1 日後には CA1 領域のみ有意な抑制が認められたが、歯状回領域では軽度の抑制にとどまった。虚血 4 日後には CA1、歯状回領域ともに有意な LTP の抑制が認められた。NO 産生については、虚血 1 日後、4 日後ともに有意な変化は認められず、iNOS の阻害薬である aminoguanidine の前投与による LTP の改善も認められなかった。4-VO モデルでは、虚血 1 日後、および 4 日後に NO の

増加が認められた。一方、虚血7日後にはNOの増加は認められず、偽手術群との間に差異は認められなかった。IL-1 $\beta$ 拮抗薬およびaminoguanidineの前投与により、これらNOの増加は有意に抑制された。LTPに関しては、4-VOにより、CA1、歯状回領域では有意に抑制されたが、CA3領域では変化は認められなかった。IL-1 $\beta$ 拮抗薬およびaminoguanidineの前投与により、歯状回領域のLTP形成は改善されたが、CA1領域に関しては有意な改善効果は認められなかった。記憶学習行動については、Y字迷路テスト、contextual fear conditioningともに4-VOにより障害が認められ、それらはaminoguanidineの前投与により改善された。これらのことから、加齢により、海馬LTP形成の抑制が認められること、また高頻度刺激の際にみられるようなNOの産生障害がLTP形成障害の誘因のひとつとなっている可能性が示された。一方、一過性脳虚血時には、炎症性サイトカインを引き金とするiNOS由来のNO産生が24時間後をピークに増加し、そのNOの増加が、海馬、とくに歯状回領域のLTPの抑制および記憶学習障害に関与している可能性が示された。このように、NOは記憶学習に対し両方向性の作用を有することが明らかとなった。

発表後、副査本間教授から、LTPとNOの相関性について、2-VOモデルでのNOとLTPとの間のdiscrepancyについて、および海馬でのLTP抑制の部位的差異について、副査小山教授から、2-VO、4-VOモデルと異なったモデルを用いた理由、老齢ラットと脳虚血でのNOの役割の違いについて、およびLTP形成におけるNOより下流のカスケードについて質問された。また主査吉岡教授からは、虚血後のLTP抑制におけるNO以外の要因の関与について質問された。これらに対し申請者は、実験成績と過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。