

氏 名 高 木 佐知子

学位 (専攻分野) 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第703号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Synaptically induced changes in cell volume in
the rat hippocampal slice

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 小幡 邦彦
教授 岡田 泰伸
教授 柿木 隆介
教授 福田 敦夫 (浜松医科大学)

論文内容の要旨

It is widely accepted that swelling of brain cells is one of the physiological responses associated with neuronal activation. Such alterations lead to changes in the size of extracellular space and in ephaptic and field effect interaction, which may cause synchronized activation of neurons and local spread of epileptic discharges (Jefferys, 1995). Mass changes in volume of cortical cells in response to electrical stimulation can be detected in terms of characteristics of extracellular spaces *in vivo* (Dietzel et al., 1980). In the human brain, transient swelling of cortical cells due to visual stimulation was recently detected by diffusion-weight magnetic resonance imaging (DW-MRI) (Darquie et al., 2001). Mechanisms underlying activity-dependent volume changes have been pursued in several *in vitro* studies using brain slice preparations. However, mechanisms and candidate ion channels and/or transporters which might be involved remain unclear.

In the present study, they analyzed interactions between changes in cell volume and synaptic responses in the hippocampal slices from rodents. Swelling within the CA1 area were detected as increases in transmittance of near-infrared light (IR), and field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded simultaneously. High frequency stimulation (HFS) of afferent fibers induced a transient increase in IR transmittance in both somatic and dendritic regions. Stimulus-induced increases in transmittance were strongly reduced in the presence of APV and CNQX, indicating involvement of glutamate receptors. MacVicar and Hochman (1991) also reported, and they confirmed their results about this point. they also investigated that the contribution of GABAergic input to the optical signals. Application of a GABA-A receptor antagonist, bicuculline, increased the amplitude and time course of the fEPSPs but rather decreased HFS-induced optical signals. To examine the contribution of Cl⁻ flux through GABA-A receptor channels, they measured HFS-induced signals when the extracellular solution was stepwise depleted of Cl⁻ (72.5 mM, 41.5 mM, 10.5 mM). The peak amplitude of HFS-induced signals was decreased according to the extracellular Cl⁻ concentration. When the extracellular Cl⁻ was reduced to 10.5 mM, HFS induced a decrease in transmittance, which was also blocked by bicuculline. In hippocampal slices obtained from mice deficient in the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase, HFS-induced signals were significantly smaller than in the wild-type mice, although fEPSP profiles did not differ. These results suggest that Cl⁻ influx into postsynaptic neurons through GABA-A receptor channels that are activated by synaptically-released GABA is a major cause of activity-dependent swelling in the hippocampal CA1 region.

Since the GAD65 KO mouse is prone to epileptic seizure as a behavioral phenotype, their results suggest that the GABAergic system is not only required for stabilizing neuronal activities but also significant for swelling in the hippocampal CA1 region. It might be expected that generation, synchronization and/or propagation of epileptic activity may be caused by a variety of different mechanisms (see Hochman et al., 1995). The present results provide a new concept that

can relate mechanisms of the excitability control and the volume regulation in CNS neurons, which may lead to the better understanding of epilepsy.

References

Jefferys, J.G.R., 1995. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiological Reviews* 75, 689-715.

Dietzel, I., Heinemann, U., Hofmeier, G., Lux, H.D., 1980. Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp. Brain Res.* 40, 432-439.

Darquie, A., Poline, J.B., Poupon, C., Saint-Jalmes, H., Bihan, D.L., 2001. Transient decrease in water diffusion observed in human occipital cortex during visual stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9391-9395.

MacVicar, B.A., Hochman, D., 1991. Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 11, 1458-1469.

Hochman, D.W., Baraban, S.C., Owens, J.W.M., Schwartzkroin, P.A., 1995. Dissociation of synchronization and excitability in furosemide blockage of epileptiform activity. *Science* 270, 99-102.

論文の審査結果の要旨

脳において神経活動に伴って細胞膨張 (swelling) が起こることが広く認められてきた。この現象は、細胞間隙の減少と細胞間結合 (ephapse) の増加をもたらし、ニューロンの興奮性を上昇させる結果として脳内でニューロン活動の同期化やてんかん波の局所伝播を引き起こす可能性が示唆されている。動物の *in vivo* 実験で大脳皮質の電気刺激による細胞間隙の減少やヒトの脳で視覚刺激による大脳皮質細胞の膨張を示す MRI 変化が検出されている。この神経活動依存的な細胞容積変化のメカニズムを調べるために、脳スライス標本を用いた *in vitro* 実験が行われ、グルタミン酸シナプスの関与やグリア細胞の膨張が報告されているが、容積調節に関わるイオンチャンネルやトランスポーターの候補については未だ良くわかっていない。

本研究で申請者は細胞容積の変化とシナプス応答との関係を、げっ歯動物 (主にラット、一部スナネズミ及び遺伝子ノックアウトマウス) から得られた海馬スライス標本を用いて解析した。CA1 野における細胞膨張を近赤外光の透過率増加として光学的に検出し、同時に興奮性フィールド電位を記録した。入力線維を高頻度刺激すると細胞体層と樹状突起層の両方で一過性の透過率増加が起こった。これに伴って細胞膨張が起こっていることを単一錐体細胞の体積を二光子レーザー顕微鏡で測定することにより確認した。またグリオトキシン投与または一過性脳虚血によりそれぞれグリアまたはニューロンを破壊したスライスでの実験から、細胞膨張はニューロンに起こっていることを確認した。透過率増加は APV と CNQX の存在下で著しく減少したことから、グルタミン酸受容体の関与が示唆された。逆向性刺激によりニューロンがバースト発火しても透過率変化に影響がないことから、ナトリウムスパイクは容積膨張に必要ではないと考えられた。つぎに GABA 性入力の関与を調べた。GABA-A 受容体のアンタゴニストであるビキュキュリンを投与すると、興奮性フィールド電位の振幅や時間経過は増加したが、光学シグナルは予想外にも半減した。光学シグナルのピーク値は、細胞外液のクロライド濃度低下にともなって減少した。細胞外クロライド濃度が 10.5mM の時には、GABA 受容体の活性化でクロライドは逆に流出すると考えられるが、高頻度刺激は透過率の減少を引き起こし、これもまたビキュキュリンで抑制された。GABA 合成酵素の一つである 65kDa 型グルタミン酸脱炭酸酵素を欠損させて脳内 GABA が低下しているマウスから得られた海馬スライスでは、野生型マウスの海馬スライスと比べ、興奮性フィールド電位の特性には違いが無かったが、高頻度刺激によって誘発される光学シグナルが有意に小さかった。これらの結果は、興奮性シナプス伝達によって生じるグルタミン酸受容体を介したナトリウムイオン流入と抑制性シナプス伝達によって生じる GABA-A 受容体を介したクロライド流入とが、海馬 CA1 野における活動依存的な容積増加の要因であることを示している。

本研究の結果は、GABA を伝達物質とした抑制系がニューロン活動を安定化させるのに必要であるばかりでなく、ニューロン容積の増加にも関わっていることを示している。本研究で検出された細胞膨張は推定 2-3% と小さいものであるが、5 パルス/秒で 1 秒間という生理的範囲のシナプス活動で引き起こされるものである。その生理学的、病態生理学的意義は今後明らかにされなければならないが、興奮性シナプスと抑制性シナプスとが協調して、神経活動を直接的にコントロールしているだけでなく、ニューロンの容積変化を介して間接的に調節するという新しい概念を本研究が提出したことは、神経科学に対する重要な貢献である。