The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	三叉神経中脳路核ニューロンにおける NPY の神経修飾作用
Author(s)	関, 壮樹
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52350
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（関　壮樹）	
論文題名	三叉神経中脳路核ニューロンにおける NPY の神経修飾作用

論文内容の要旨

【目的】

ニューロペプチドY　(NPY) は､視床下部弓状核およびその周辺に存在するニューロンより産生される脳内生理活性物質の一つであり、情動変化や血圧、概日リズムの調節に関わるだけでなく、摂食促進効果を示すことが知られている。当教室では、NPY の脳室内投与は多動性の亢進を伴い、視床下部外側野で産生されるオレキシン（Orexin）同様に、摂食量の増大や咀嚼筋活動特性を含む摂食行動パターンの変化を引き起こすことを明らかにしてきたが、咀嚼運動に関わる三叉神経系ニューロンに対して直接如何なる作用を及ぼすかは不明である。NPY による摂食促進作用には受容体サブタイプの内、Y1, Y5 が関与していると考えられているが、三叉神経運動ニューロン (TMN) に NPY 受容体の発現はないとの報告があり、TMN の活動修飾に関わっている三叉神経中脳路核ニューロン (MTN) には受容体の発現が報告されている。そこで本研究では、MTN における NPY の神経修飾作用を明らかにする目的で、ホールセルパッチクランプ法を用いて電気生理学的検討を行った。

【研究方法】

生後 3～17 日齢 (P 3-17) の SD 系新生仔ラットを用いて、ホールセルパッチクランプ法による検討を行った。ハロセン吸入麻酔下で脳幹を摘出後、三叉神経中脳路核を含む厚さ 300 μm の脳幹冠状スライス標本を作製し、赤外線透視条件下で MTN を同定後、先端抵抗値 3-4 MΩ のパッチ電極を用いてホールセル記録を行った。細胞内液にはグルコン酸カリウムを含む標準的内液、細胞外液には記録用標準人工脳脊髄液 (ACSF) を還流して、Voltage-clamp (v-clamp)もしくは Current-clamp (c-clamp) 記録条件下で以下の検討を行った。

研究１．NPY による MTN 活動電位特性の変化

1-1: v-clamp, c-clamp 記録条件下で、NPY (0.1 μM) 投与前後の膜電流および膜電位変化を記録した。また、細胞外液中の Na^+, K^+, Ca^{2+} 濃度変化による影響についても検討した。

1-2: 矩形波脱分極パルス (3 ms) を細胞内通電して活動電位 (AP) を誘発し、NPY 投与前後での AP 特性をそれぞれ比較検討した。また NPY による神経修飾効果を P 3-5, P 9-11, P 15-17 の三群間で比較検討し、生後変化について検討を行った。

1-3: 細胞外 Ca^{2+} 濃度 (control:2.0 mM) を変化 (0.5 mM, 3.5 mM) させた条件下で同様に AP を誘発し、NPY投与前後での AP 特性変化をそれぞれ比較検討した。

研究２．NPY による MTN 連続発火活動特性の変化

2-1: P 9-17 の MTN を対象として、矩形波脱分極パルス (1 s) を細胞内通電して連続発火活動 (spike train: ST) を誘発し、NPY 投与前後での ST 特性をそれぞれ比較検討した。

2-2: 細胞外 Ca^{2+} 濃度を変化させた条件下で ST を誘発し、NPY 投与前後での ST 特性変化をそれぞれ比較検討した。

2-3: P 12-17 の MTN を対象に持続的脱分極により内因性バースト活動 (BA) を誘発し、NPY 投与前後での BA 特性変化を検討した。

研究３．NPY 神経修飾作用におけるY1, Y5 受容体の関与ならびにオレキシンとの相互作用

3-1: Y1,Y5 受容体作動薬 ([Leu31,Pro34]-NPY, BWX46 ,0.1 μM) および拮抗薬 (BIBP3226, CGP71683 hydrochloride ,0.1 μM) を用いて、膜電流変化、スパイク発射特性変化について検討した。

3-2: NPY と Orexin との相互作用を明らかにする目的で、NPY (0.1 μM) と Orexin A (0.2 μM) を同時投与あるいは Orexin 受容体拮抗薬 (SB334867 ,0.2 μM) 存在下で NPY を投与した際の膜電流変化、スパイク発射特性変化について検討した。

【研究結果】

研究１．NPY による MTN 活動電位特性の変化

1-1: NPY 投与により v-clamp 条件下で内向き電流、c-clamp 条件下で膜電位は脱分極する傾向が観察された。上記変化は TTX 還流下でも観察され、低 Ca^{2+} 濃度条件、Na-Choline 置換液条件下で内向き電流は減少した。

1-2: AP 誘発にて AP 成分のパラメータ値に明らかな変化は観察されなかったが、AHP 成分については持続時間が有意に短縮した。異なる日齢群間での比較では、P 3-5 群と比較してP 9-11、P 15-17 群では AHP 持続時間の短縮率はより増大する傾向がみられた。

1-3: 細胞外 Ca^{2+} 濃度上昇 (3.5 mM) により AHP ピーク値は増大し、NPY 投与による AHP 持続時間の短縮効果は減弱する傾向がみられた。一方、低 Ca^{2+} 濃度（0.5 mM) 条件下では AHP の振幅値は減少し、NPY 投与による AHP 持続時間の短縮効果は増大する傾向が観察された。

研究２．NPY による MTN 連続発火活動特性の変化

2-1: NPY 投与により膜電位の脱分極変化がみられ、ST 誘発に必要な基電流値は減少し、同一入力電流刺激条件により誘発される ST 持続時間は短縮する傾向がみられた。また、スパイク間電位の上昇に伴い、初期 (1st ISI) および平均スパイク周波数は control 条件と比較して有意に増加した。

2-2: 細胞外高 Ca^{2+} 濃度 (3.5 mM) 条件により ST 持続時間は短縮した。NPY 投与後、ST 持続時間はさらに短縮し、スパイク周波数は減少する傾向がみられた。一方、低 Ca^{2+} 濃度（0.5 mM) 条件下では ST の持続時間は延長し、NPY 投与により ST 持続時間は有意に短縮したものの control 条件と比較して短縮効果は減少した。

2-3: BA に対して NPY を投与すると、バースト持続時間は短縮、バースト周波数ならびに、バースト内スパイク周波数はともに上昇する傾向がみられた。

研究３．NPY 神経修飾作用におけるY1、Y5 受容体の関与ならびにオレキシンとの相互作用

3-1: [Leu31,Pro34]-NPY あるいは BMX46 投与により、NPY 投与時と同様の膜電位変化がみられたが、NPY 単独投与時と比較して効果は減弱する傾向が観察された。また、BIBP3226 前投与後に NPY を投与すると NPY 単独投与時と比較して修飾効果は減弱した。

3-2: NPY と Orexin を同時投与すると NPY 単独投与時と比較して修飾効果は増強する傾向が認められた。また SB334867 還流下で NPY を投与すると NPY 単独投与時と比較して修飾効果は減弱する傾向がみられた。

【考察および結論】

本研究より、MTN では、NPY 投与により Na^{+}、Ca^{2+} を電荷担体とする内向き電流が誘発され、定常状態におけるニューロンの興奮性は増大することが明らかとなった。NPY によるニューロンの興奮性増大には、活動電位における AHP 持続時間の短縮と、連続発火活動におけるスパイク周波数やバースト出現頻度の上昇が関わっていると推察された。また、本修飾作用は細胞外 Ca^{2+} 動態変化により調節され、修飾発現にはY1、Y5 受容体双方が関与していることや、オレキシンとの相互作用が関与していることが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　関　壮樹　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教　授	古郷　幹彦
	副 査　教　授	吉田　篤
	副 査　准教授	社　浩太郎
	副 査　講　師	斎藤　充

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラットの三叉神経中脳路核ニューロン（MTN）における ニューロペプチドY（NPY） の神経修飾作用について電気生理学的手法を用いて検討したものである。

本研究より、MTN では、NPY 投与により Na^{+}、Ca^{2+} を荷電担体とする内向き電流が誘発され、定常状態におけるニューロンの興奮性は増大することが明らかとなった。NPY によるニューロンの興奮性増大には、活動電位における AHP 持続時間の短縮と、連続発火活動におけるスパイク周波数やバースト出現頻度の上昇が関わっていると推察された。また、本修飾作用は細胞外 Ca^{2+} 動態変化により調節され、修飾発現には Y1、Y5 受容体双方が関与していることや、オレキシンとの相互作用が関与していることが示唆された。

以上より本研究は、摂食行動を上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。