

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	<a href="https://doi.org/10.18910/52350">https://doi.org/10.18910/52350</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# 学位論文

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

2015年3月

大阪大学大学院歯学研究科 統合機能口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第一教室

(指導教官：古郷 幹彦 教授)

関 壮樹

## 緒言

ニューロペプチド Y (NPY) は、1982 年に Tatemoto, Mutt らによりブタの視床下部より分離、同定された 36 個のアミノ酸からなる神経ペプチドで (Tatemoto et al, 1982 ; Shimada et al, 1998) 、視床下部弓状核で産生され、中枢神経系に豊富に分布し、生理活性ペプチドの中で最も強力な摂食促進効果を持つと考えられている (Clark et al, 1985) 。これまでの研究で NPY をラットの脳室内に投与すると、摂食量、飲水量が増大し、体重が増加することが報告されている (Morley et al, 1987 ; Currie and Coscina, 1995) 。また我々の研究室では、NPY の脳室内投与により、摂食量の増大のみならず、咀嚼筋活動特性を含む摂食行動パターンが変化し、さらに高濃度の NPY を投与すると、多動性が亢進する結果、立ち上がり移動行動の頻度が上昇し、摂食効率は低下することを明らかにした (Ushimura et al, 2014) 。

摂食行動が適切に行われるためには、咀嚼の進行に合わせて変化する食物の性状など、歯牙や咀嚼筋などの末梢器官において受容される種々の感覚情報が正確にフィードバックされることが不可欠である。こうした口腔末梢感覚受容器からの求心性情報は主に三叉神経中脳路核に終始し、三叉神経中脳路核ニューロン (MTN) は脳幹内の他のニューロンとシナプスを形成して三叉神経運動ニューロン (TMN) からの運動出力を修飾している (Rokx et al, 1986 ; Shigenaga et al, 1989 ; Luo et al, 2002) 。これまで

の免疫組織学的検索より、TMN においては NPY 受容体の存在を否定する報告と (Chronwall et al, 1985 ; Yamazoe et al, 1985 ; De Quidt and Emson, 1986) 、肯定する報告があるが (Wolak et al, 2003) 、MTN においては NPY 産生ニューロンの投射や受容体の発現がみられるとの報告があり (Chronwall et al, 1985 ; Qu et al, 1996 ; Wolak et al, 2003) 、NPY は MTN に対して何らかの修飾作用を有する可能性が考えられる。

摂食制御ペプチドには、レプチン、メラニン凝集ホルモン (MCH)、アグーチ関連タンパク、グレリンなどがあるが (Zhang et al, 1994 ; Qu et al, 1996 ; Fan et al, 1997 ; Shimada et al, 1998 ; Nakazato et al, 2001) 、外側野で分泌されるオレキシンも NPY と同様に摂食促進作用を有する生理活性ペプチドで (Sakurai et al, 1998) 、ラットの脳室内に投与すると、摂食量の増大のみならず咀嚼筋活動特性を含む摂食行動パターンが変化することを、我々の研究室で明らかにしてきた (Tsuji et al, 2011) 。また *In vivo* の研究では、オレキシンと NPY は相互作用を示し、摂食促進作用が増強することが報告されている。(Dube et al, 2000 ; Yamanaka et al, 2000 ; Holmqvist et al, 2001)

NPY は摂食促進作用以外に、血圧やサーカディアンリズムの調節 (Hu and Dunbar 1997 ; Yannielli and Harrington, 2001) 、抗不安作用の出現 (Ehlers, 1997) 、てんかんと関連 (Xu et al, 2014) など様々な生理作用を持つことが明らかとなっている。そのため NPY による摂食運動発現において、三叉神経系が作用するメカニズ

ムを解明する上で、NPY のラット脳室内投与など *In vivo* の実験系では volume transmission による他の神経系への影響を排除することは困難であり、また現在まで MTN における NPY の神経修飾作用について、直接、作用の検討を行った報告はない。

そこで本研究では、MTN の活動特性に対する 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を行った。また、NPY 受容体の 6 種類のサブタイプのうち、摂食促進作用は主に Y1, Y5 受容体が関与していると考えられているが (Balasubramaniam et al, 2002 ; Lecklin et al, 2003 ; 桜井, 2003)、MTN においては不明であるため、それぞれの作動薬、拮抗薬を使用して、MTN における NPY 受容体サブタイプの解明を行った。さらに、MTN において NPY とオレキシンの相互作用がみられるのか、NPY にオレキシン受容体作動薬、拮抗薬を追加投与し、MTN の活動特性変化を検討した。

## 研究材料と方法

### スライス標本の作製

本研究における実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定（動物実験委員会承認番号：動歯-20-005-0）と動物の愛護及び管理に関する法律を順守して行った。実験には、生後 3 日から 17 日齢の Sprague-Dawley 系ラット(日本動物株式会社)を用いた。ハロタンにて深麻酔後断頭し、冷温まで冷却した Cutting 用人工脳脊髄液（cutting artificial cerebrospinal fluid；以下 C-ACSF. 組成は, 126 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 MgCl<sub>2</sub>, 4 lactic acid (mM)) に浸漬した状態で頭蓋骨を除去し脳組織を摘出した。脳幹ブロックを作成後、超低融点アガロースゲル（agarose type VII, Sigma-Aldrich 社製）に包埋して、スライス標本作成装置（linearslicer PRO 7, 堂板イーエム社製）を用い、尾側の MTN を含む厚さ 300 μm の冠状脳幹スライス標本作製した。作成したスライス標本を、室温（22-24 °C）の incubation 用人工脳脊髄液（incubation-ACSF；以下 I-ACSF. 組成は記録用の標準人工脳脊髄液 normal-ACSF；以下 N-ACSF（124 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>）に 4 lactic acid (mM) を加えたもの）に移し、37.0 °C で 40-50 分間静置し、以降は常温で維持した状態で記録に用いた。全ての細胞外液は、95%O<sub>2</sub> + 5%CO<sub>2</sub> 混合ガスにて飽和させた状態で使用した。

## Whole-cell patch-clamp 法を用いた記録

記録用チャンバー（アクリル製、容量 2.0ml）を正立型 Nomarski 赤外微分干渉顕微鏡（BX51W1, オリンパス社製）のステージ上に設置し、N-ACSF を 2 ml/min の速度で灌流した。スライス標本を記録用チャンバーに静置し、スライスアンカー（Warner Instruments 社製）にて固定した。赤外線透視条件下で中脳路核を同定し、直径約 20-40  $\mu\text{m}$  の偽単極性の類円形細胞である MTN からギガシール形成後、Whole-cell 記録を行った。記録用電極は、外形 1.5 mm、内径 1.12 mm のボロシリケート製ガラス管（150EA/PKG, インターメディカル社製）を微小ガラス管電極作成装置（P-87, Sutter Instruments 社製）を用いて、先端抵抗値 3-5  $\text{M}\Omega$  となるように製作した。電極内液は、カリウム塩を主成分とするものを用いた。電極内液の組成は、115 K-gluconate, 25 KCl, 9 NaCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 1  $\text{MgCl}_2$ , 3  $\text{K}_2\text{-ATP}$ , 1  $\text{Na-GTP}$  (mM) とし、KOH を用いて pH 7.25 に調整したものを用いた。ニューロン表層と電極間で形成されるアクセス抵抗値は 15  $\text{M}\Omega$  未満のニューロンを記録対象とし、Voltage-clamp (v-clamp) あるいは Current-clamp (c-clamp) 条件下で MTN の電気活動を記録した。電気信号は、パッチクランプ用増幅器（Multiclamp 700 B, Molecular Devices 社製）で増幅後、アナログ-デジタル変換器（Digideta 1322 A, Molecular Devices 社製）でデジタル変換し、パーソナルコンピュータと専用ソフトウェア（pCLAMP 9.0, Molecular Devices 社製）を用いて記録および解析を行った。

## 薬剤の投与

本研究において、MTN に対する神経修飾効果を検討するために用いた薬剤は、蒸留水または ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、以下の最終濃度となるように Bath 内灌流投与した。NPY (Human,Rat 0.1  $\mu$ M, 株式会社ペプチド研究所)、Ox-A (Human,Rat,Mouse 200 nM, 株式会社ペプチド研究所)、[Leu 31,Pro34]-NPY (Human,Rat 0.1  $\mu$ M, Tocris)、BWX 46 (0.1  $\mu$ M, Tocris)、BIBP 3226 trifluoroacetate (0.1  $\mu$ M, Tocris)、CGP 71683 hydrochloride (0.1  $\mu$ M, Tocris)、SB334867 (200 nM, Tocris)、tetrodotoxin (TTX: 1  $\mu$ M,和光純薬工業株式会社)

## 統計処理

データは平均値  $\pm$  標準誤差 (S.E.) の形で表示した。二群間の有意差検定には Student's t-test を用い、有意水準は 5%とした。



## 結果

### 1. NPYによるMTN活動電位特性の変化

MTN が静止膜電位下で NPY によっていかなる修飾作用を受けているか調べるため、c-clamp, v-clamp 条件下で NPY (0.1  $\mu\text{M}$ ) を灌流投与し、薬剤投与前後で膜電位、膜電流の変化を記録した。静止膜電位にて v-clamp 条件下で NPY を 3 min 灌流投与すると、内向きの電流が観察された (図 1 A)。c-clamp 条件下で NPY を 3 min 灌流投与すると可逆性の脱分極変化を認めた (図 1 B)。また、N-ACSF に TTX (1  $\mu\text{M}$ ) を加えた条件下であっても NPY を投与すると膜電位の脱分極変化が観察され、TTX 非存在下と比較して有意差を認めなかった (図 1 C,D)。

次に N-ACSF (2.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) 条件、細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件 (0.5 mM)、細胞外高  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件 (3.5 mM) で、それぞれ NPY 灌流投与後の脱分極変化を記録した。内向き電流は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の下降、上昇に伴って有意に減少、増加を認めた (図 2 A,B)。膜電位の脱分極変化は、N-ACSF 条件と比較し、細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件下で有意に減少を認めた (図 2 C)。また N-ACSF 中の NaCl (124 mM) を Choline-Cl (124 mM) に置換したところ、膜電流、膜電位の大きさは有意に減少した (図 3 A,B)。さらに、N-ACSF (3.0 mM  $\text{K}^{+}$ ) 条件、細胞外低  $\text{K}^{+}$  濃度条件 (1.5 mM)、細胞外高  $\text{K}^{+}$  濃度条件 (6.0 mM) で、それぞれ NPY 灌流投与後の脱分極変

化を記録したところ、各濃度間における膜電流、膜電位変化に有意差を認めなかった (図 3 C,D)。

MTN が NPY によって如何なる活動電位特性変化を示すか検討する目的で、c-clamp 条件下で静止膜電位の MTN に 3 ms の矩形波脱分極パルスを細胞内通電して誘発された活動電位 (Action potential: 以下 AP) を指標として、NPY 投与前後における各パラメータの変化 (図 4 A) について比較検討した。NPY 投与時は、control 条件下と比較して、AP 成分、AHP 振幅に有意な変化は観察されず、P 9-11 群、P 15-17 群において AHP の持続時間に有意な短縮が認められた (図 4 B、表 1)。Duration の減少率は P 3-5 群と比較して P 9-11 群、P 15-17 群と日齢が進むにしたがい、変化率が増大した (図 4 C)。

次に P 15-17 群において、N-ACSF (2.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) 条件、細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件 (0.5 mM)、細胞外高  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件 (3.5 mM) で、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。細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件では、N-ACSF 条件と比較し、活動電位の AHP 成分は減少する傾向がみられ、その結果、AHP の振幅値は短縮、持続時間は延長したが、NPY 投与による AHP の振幅増大効果、持続時間の短縮効果は増強する傾向が観察された (図 5 A-C)。一方、細胞外高  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件では、AHP 成分は増大する傾向がみられたが、NPY 投与による AHP の振幅値増大効果、持続時間の短縮効果ともに有意に減弱した (図 5 A-C)。

## 2. NPY による MTN 連続発火活動特性の変化

P 15-17 群において、1 s 矩形波脱分極パルスによって誘発される持続的発火 (Spike train: 以下 ST) に対する NPY の修飾作用を検討した。AP 同様に矩形波脱分極パルスを通電して誘発される ST 特性を NPY (0.1  $\mu$ M) 投与前後で比較検討したところ、ST 持続時間の短縮傾向と早期の spike frequency adaptation (SFA) が観察された (6 A,B)。ST 誘発に必要な基電流値は、NPY 投与によって有意に減少した (図 6 C)。周波数-時間曲線では、NPY 投与後にスパイク周波数の増加を認めた (図 6 D)。また ST における、F-I curve では NPY 投与によって 平均周波数に有意差はなかったものの、1st-ISI では全ての電流刺激条件で有意に増大した (図 6 E,F)。

次に N-ACSF (2.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) 条件、細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件 (0.5 mM)、細胞外高  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件 (3.5 mM) で ST を誘発し、NPY 投与における ST 特性変化を比較検討した。細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件において、ST 持続時間は N-ACSF 条件に比べ延長し、NPY 投与後の ST 持続時間短縮率は減少した (図 7 A)。一方、細胞外高  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件において、ST 持続時間は N-ACSF 条件に比べ短縮し、NPY 投与後の ST 持続時間短縮率は増大した (図 7 A)。細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件下において 1st-ISI、平均周波数は N-ACSF 条件と比較して増大し、NPY 投与後さらに増加した (図 7 B,C)。一方、細胞外高  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件下において 1st-ISI、平均周波数は N-

ACSF 条件と比較し減少、NPY 投与後さらに減少する傾向を認めた (図 7 B,C)。

TMN ニューロンと異なり MTN ニューロンでは P8 以降のニューロンにおいて、膜電位を持続的に脱分極させることによって、自発的な内因性バースト活動 (BA) が出現することが知られている。そこで P 15-17 群において、持続的な細胞内通電により内因性バースト活動 (図 8 A) を誘発し、NPY (0.1  $\mu$ M) 投与前後でのバースト特性変化を示す各パラメータの検討を行った。(図 8 A-C)

NPY 投与により、control 条件と比較し BA 誘発に必要な基電流値は減少した。また バースト持続時間、バースト間インターバルは有意に減少し、バースト周波数は有意に増加、バースト内スパイク周波数も増加する傾向にあった (図 9)。

### 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

P 15-17 群において、NPY 修飾作用に関与する受容体のサブタイプを明らかにする目的で、NPY Y1 受容体作動薬 ([Leu 31,Pro34]-NPY (0.1  $\mu$ M))、NPY Y5 受容体作動薬 (BWX 46 (0.1  $\mu$ M)) を用いて、膜電位変化、スパイク発射特性変化について NPY (0.1  $\mu$ M) 投与時と比較検討を行った。

c-clamp 条件下で NPY Y1 受容体作動薬、NPY Y5 受容体作動薬を 3 min 灌流投与すると可逆性の脱分極変化を認めたが、ともに NPY 投与時より脱分極変化は有意に減少した (図 10 C)。次に、静止膜電位にて v-clamp 条件下で NPY Y1 受容体作動薬、NPY Y5 受容体作動薬を 3 min 灌流投与すると、内向きの電流 (図 10 A) が観察されたが、ともに NPY 投与時より内向き電流は有意に減少した (図 10 B)。また、Y1、Y5 受容体作動薬灌流投与後に誘発された AP における AHP の振幅値 (図 10 D)、Duration 短縮率 (図 10 E) において、Y5 受容体作動薬投与時の Duration の変化率は有意に減少した。また Y1、Y5 受容体作動薬灌流投与後に誘発された ST における 1st-ISI (図 10 F)、平均周波数 (図 10 G) では、1st-ISI において NPY 投与時と比較し、Y1 受容体作動薬投与時は有意に周波数の増加率が減少した。

次に、NPY Y1 受容体拮抗薬 (BIBP 3226 (0.1  $\mu$ M))、NPY Y5 受容体拮抗薬 (CGP 71683 (0.1  $\mu$ M)) を前投与した条件下で、NPY (0.1  $\mu$ M) を投与し、膜電位

変化、スパイク発射特性変化について NPY 単独投与時と比較検討を行った。

c-clamp 条件下で NPY Y1 受容体拮抗薬、NPY Y5 受容体拮抗薬を、灌流投与した状態で NPY を 3 min 灌流投与すると、可逆性の脱分極変化を認めたが、ともに NPY 単独投与時より脱分極変化は有意に減少した (図 11 C)。さらに、静止膜電位にて v-clamp 条件下で NPY Y1 受容体拮抗薬、NPY Y5 受容体拮抗薬を、灌流投与した状態で、NPY を 3 min 灌流投与すると、内向きの電流 (図 11 A) が観察されたが、ともに NPY 単独投与時より内向き電流は有意に減少した (図 11 B)。

また、Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 灌流投与後に観察された活動電位における AHP の振幅値 (図 11 D)、Duration 短縮率 (図 11 E) において、Y1 受容体拮抗薬前投与条件下では、NPY 投与後の AHP 振幅値増大変化は有意に減少した。また Duration の短縮率は Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下においてともに有意な減少を認めた (図 11 E)。Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 灌流投与後の ST における 1st-ISI (図 11 F)、平均周波数 (図 11 G) は減少する傾向がみられた。

次に NPY とオレキシンの相互作用を明らかにする目的で、NPY (0.1  $\mu$ M) と Orexin A (0.2  $\mu$ M) を同時投与あるいは Orexin A 受容体拮抗薬 (SB334867 (0.2  $\mu$ M)) 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。NPY 単独投与、NPY と Orexin A 同時投与時における活動電位の AHP 振幅値 (図 12 A)、Duration 短縮率 (図 12 B) について、NPY に Orexin A を追加投与すると、

NPY 単独投与時と比較して有意差を認めないものの、AHP 振幅値、Duration 短縮率ともに増大する傾向を示した。NPY 単独投与、NPY と Orexin A 同時投与時における ST の 1st-ISI (図 12 C)、平均周波数 (図 12 D) について、NPY 単独投与時と比較して Orexin A の追加投与により、両周波数値はより上昇する傾向を認めた。

また、持続的脱分極刺激により誘発した BA について検討を行った。NPY 単独投与時 (図 13 B) と比較して Orexin-A 追加投与後 (図 13 C) バースト周波数の明らかな増大傾向を認めた。NPY, Orexin-A 投与前後における BA の各パラメータ変化について、バースト持続時間、バースト間インターバルは NPY 単独投与後と比較し、Orexin-A 追加投与により減少傾向を示し、バースト周波数、バースト内スパイク周波数は Orexin-A を追加投与することによりさらに増加傾向を示した (図 13 D)。

最後に、Orexin 1 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY を追加投与し、活動電位ならびに連続発火活動における変化について検討を行った。Orexin-1 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 投与前後の活動電位 における AHP 振幅値 (図 14 A)、Duration (図 14 B) について、NPY 投与後、AHP 振幅値、Duration ともに有意な変化を認めなかった。Orexin-1 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 投与前後の ST における 1st-ISI (図 14 C)、平均周波数 (図 14 D) について、Orexin-1 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY を灌流投与しても 1st-ISI、平均周波数ともに有意な変化を認めなかった。

## 考察

### NPY による MTN の膜興奮性作用

NPY が摂食行動に及ぼす影響については、第三脳室、側脳室、室傍核などへの投与によって摂食量が増大することや (Stanley and Leibowitz, 1984 ; Morley et al, 1987 ; Currie and Coscina, 1995)、第三脳室へ投与した際の摂食開始時間の短縮などが報告されている (Clark et al, 1985 ; Currie and Coscina, 1995)。我々の研究においてもラット側脳室への NPY の投与により、摂食量の増大のみならず、咀嚼筋活動特性を含む摂食行動パターンが変化することを、我々の研究室で明らかにしてきた (Ushimura et al, 2014)。また、NPY の側脳室内投与により咀嚼準備期、粉碎期における顎二腹筋、咬筋の放電頻度の上昇や筋活動量の増加を伴うことで摂食運動の促進に関与していることが示唆されている (Ushimura et al, 2014)。一方、ネットワークを構成する三叉神経系ニューロンに対する NPY の神経修飾作用について、詳細はほとんど明らかとはされていない。

本研究により NPY は中枢神経系の他のニューロン群においてこれまで報告されているのと同様に (Fu et al, 2004)、MTN に可逆的な脱分極を引き起こし、内向き電流を誘発してニューロンの興奮性を増大させることが明らかとなった。MTN におけるこの脱分極は、TTX によって抑制されなかったことから、MTN に対して NPY



が直接作用した結果であると推察される。三叉神経中脳路核における NPY 受容体の発現様式については成獣ラットなどにおける NPY 作動性神経、神経終末の存在や受容体の発現について、一部報告を認める以外に詳細は明らかとされておらず

(Yamazoe et al, 1985 ; Chronwall et al, 1985 ; De Quidt and Emson, 1986) 、新生仔期における受容体の発現様式や生後発達変化を含めて、今後免疫組織学的検索による検証が必要と考えられる。

膜電位の脱分極変化を引き起こす NPY の作用機序については、Na<sup>+</sup> チャネルのほか Ca<sup>2+</sup> チャネル、K<sup>+</sup> チャネルの制御が関与していることが、視床下部の弓状核ニューロンや延髄孤束核ニューロンなどで報告されている (Sun and Miller, 1999 ; Sun et al, 2001) 。 NPY はオーファン G 蛋白質共役受容体に対するリガンドとして知られており、NPY が受容体に結合した後、G 蛋白質の活性化に引き続き細胞内セカンドメッセンジャー機構を介して、K<sup>+</sup> チャネル、中でも G タンパク活性化内向き整流 K<sup>+</sup> チャネルである GIRK (G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels) が報告されている (Sun et al, 2001) 。本研究において細胞外 K<sup>+</sup> 濃度変化に伴って、膜電流、膜電位変化を認めなかったことから、GIRK の関与は低いと考えられるが、細胞外 Ca<sup>2+</sup> 高濃度、低濃度条件下において脱分極変化はそれぞれ増大、減少したこと、細胞外液中の Na イオンを Choline に置換すると脱分極変化は減少したことから、Na<sup>+</sup> ならびに Ca<sup>2+</sup> が電荷担体として作用していることが推察される。

## NPY による MTN 活動電位の修飾作用

新生仔ラットを用いた過去の報告より、MTN の活動電位には生後変化がみられ、生後早期には AHP 持続時間が長く、fast AHP と medium AHP による顕著な二峰性を示すのに対して、新生仔期後期には fast AHP の振幅増大と持続時間の短縮を伴って二峰性が消失し、AHP 持続時間の短縮が報告されている (Tanaka et al, 2003)。このことは、活動電位を構成する各イオンコンダクタンスの生後変化によるものと考えられる。本研究において NPY の投与により AP 成分に有意な変化は観察されず、AHP 成分について最大振幅値は増大し、持続時間は有意に短縮した。持続時間の短縮率は P 3-5 群と比較して P 9-11 群、P 15-17 群と日齢が進むにしたがい、変化率が増大する傾向を認めたことから、イオンコンダクタンスの生後変化が関係していると推察される。

MTN において AHP を構成するコンダクタンスには、4-AP 感受性活動電位依存性 K コンダクタンス、細胞内への Ca イオン流入により活性化される Ca<sup>2+</sup> 依存性 K コンダクタンス、内向き整流性 K コンダクタンスが知られている (Del Negro and Chandler ; 1997)。ラットの弓状核ニューロンや神経芽細胞における NPY の修飾効果には Ca<sup>2+</sup>依存性 K コンダクタンス、内向き整流性 K コンダクタンス双方が関与していると報告されている (Lemos and Takeda, 1995 ; Sun and Miller, 1999)。また、NPY は視床下部のニューロンにおいて N 型、P 型、Q 型の Ca<sup>2+</sup> チャ

ネルに作用して、高電位依存型の電流を阻害するとの報告がある (Lecklin et al, 2003)。MTN において細胞外の液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇、下降により AHP の振幅は増大、減少し、NPY による AHP の修飾効果については減少、増大した。以上の結果から NPY 投与による AHP の修飾効果には、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性 K コンダクタンスの関与のみではなく、その他のイオンコンダクタンスの関与の可能性もあるが、今後、v-clamp による各イオンコンダクタンスの詳細な検討が必要である。

#### NPY による MTN 連続発火活動の修飾作用

多くのニューロンにおける研究で、AHP のコンダクタンスは連続発火活動のスパイク発火頻度を決定する因子であることが明らかとされている (Yarom et al, 1985; Sahu, 2002; Meunier and Borejsza, 2005)。MTN においては、P8 以降のニューロンにおいてスパイク連続発火や内因性バーストなどのスパイク連続発火活動が出現することが報告されている (Dube et al, 2000; Holmqvist et al, 2001)。単一活動電位において NPY は AHP 持続時間を短縮したことから、連続発射活動において、次の閾値電位に達する電位上昇が加速してスパイク発火頻度に変化を及ぼすことが予想された。MTN において閾値以下におけるニューロンの興奮性に、内向き電流である持続性 Na 電流が関与していることがこれまでに報告されている (Wolak et al, 2003)。NPY 投与によりスパイク頻度は上昇したが、これは活動電位における変化と同様に、NPY により誘

発される内向き電流が AHP の静止膜電位まで戻る時間を短縮させている可能性を示唆するものである。

また連続発火活動において、NPY の投与により活動持続時間の短縮が観察された。これは、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件を上昇させるとより顕著となり、NPY 投与によるスパイク周波数の上昇効果は明らかに減少した。

以上のことより、NPY が MTN に作用した際には、内向き電流の形成による AHP 再分極過程の短縮効果と、 $\text{Ca}^{2+}$  流入による  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 K コンダクタンスの変化がもたらす連続発火活動の持続時間短縮、AHP の振幅増大が出現すると考えられる。MTN におけるバースト活動の発生には、閾値以下での振動が関係しており、持続性 Na コンダクタンスが関与しているといった報告や (Wu et al, 2001 ; Wu et al, 2005 ; Tanaka et al, 2006 ; Kang et al,2007)、一過性 Na コンダクタンス、持続性 Na コンダクタンス双方の関与の報告もあるが (Enomoto et al, 2006)、NPY の MTN への修飾作用についてそれらがいかに関与しているかについてはさらなる検討が必要である。

#### **NPY による MTN 神経修飾作用に関与する受容体サブタイプの解明**

NPY 受容体は 7 回膜貫通 G タンパク共役型受容体で、5 種類のサブタイプ (Y1-Y6) が存在する。Y1 受容体は NPY の摂食促進作用を発現する主な受容体であり、[Leu 31,Pro34]-NPY、BIBP 3226 はそれぞれ Y1 受容体に高い親和性を示す作動薬、

拮抗薬である (Dumont et al, 1996)。また Y5 受容体は Y1 受容体と同様に NPY の摂食促進作用を発現する受容体であり、BWX 46, CGP 71683 がそれぞれ Y5 受容体に高い親和性を示す作動薬、拮抗薬である (Balasubramaniam et al, 2002 ; Nanobashvili et al, 2004)。過食時の NPY による摂食行動のコントロールには Y1 受容体が働くといった報告や (Francois, 2002)、Y1 受容体はより摂食促進作用が強く、高濃度の NPY は Y5 受容体に作用するといった報告があるが (Leckline et al, 2003)、Y1 受容体作動薬、Y5 受容体作動薬には相互作用があり、それぞれの作用の違いについて詳細は不明である。また、免疫組織学研究により、成獣ラットの MTN に Y1, Y5 受容体双方が同程度存在すると報告されている (Wolak et al, 2003)。本実験においても、Y1, Y5 受容体作動薬投与時の MTN の膜電位、膜電流変化、スパイク発射特性変化は、NPY 投与時と同様の傾向を示し、変化率はともに減少する傾向を認めた。この傾向は、Y1, Y5 受容体拮抗薬と NPY 同時投与時でも同様であった。以上のことより、NPY による MTN の神経修飾には Y1, Y5 受容体双方が関与していることが示唆された。ヒトの腎細胞内の動態については、Y1 受容体に作動薬が結合した後、細胞内では G タンパクが活性化され、cAMP が形成、それにより電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルが開き、Ca イオンの細胞内流入が起こると報告されているが (Herzog et al, 1992)、MTN における細胞内動態についてさらなる詳細な研究が必要である。

## NPY と Orexin の相互作用と MTN 神経修飾の生理学的意義

一次感覚ニューロンである MTN は、中脳路核に投射している種々の神経伝達物質により興奮性が修飾され、筋紡錘や歯根膜受容器からの求心性情報を統合し (Majer, 1955 ; Zhang et al, 1994)、それらを TMN へ投射するだけでなく、脳幹内に細胞体を有し、介在ニューロンとしても機能することで、咀嚼や吸啜運動において観察される様々な顎運動パターンの形成に関わっている。本研究より NPY による MTN の神経修飾効果は、*in vivo* における NPY 脳室内投与実験において NPY が咀嚼筋活動量を有意に増大させた結果を支持するものと考えられる。

こうした摂食促進ペプチドの脳内分泌をコントロールすることにより、異常摂食行動や、肥満傾向を抑止しようとする試みが存在するが、脳室内投与による作用時間が短いことや、代償性にその他の摂食促進ペプチドが減少、増加することなどから、一側面からのアプローチには限界があると考えられている。摂食促進ペプチドには種々のものがあり、それぞれが相互に作用して摂食行動を制御している (Sahu, 2002)。

*In vivo* の研究で、オレキシンは NPY を産生するニューロンに投射しており、オレキシンによる摂食亢進には NPY ニューロンを介する経路が関与することや (Yamanaka et al, 2000)、オレキシンと NPY の相互作用は Y1,Y5 受容体双方が関与すること (Holmqvist et al, 2001)、オレキシンの受容体に対して直接 NPY が相互作用を示す可能性 (Dube et al, 2000 ; Jain et al, 2000) が報告されてきたが、本研究

において NPY と Orexin は脳室内レベルの相互作用のみならず、細胞レベルでの相互作用の可能性が示唆された。今後さらに MTN の膜興奮性を制御する各イオンコンダクタンスや、細胞内相互作用のメカニズムの解明について、他の摂食促進ペプチドによる作用も含めて検討を行う必要がある。

## 結語

本研究より、MTN では、NPY 投与により  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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。



## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました、大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）講師 田中晋先生に深甚なる謝意を表します。最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮、御協力を頂きました、大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）の教室員諸兄に深く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Balasubramaniam,A., Sheriff,S., Zhai,W.,and Chance,W.T. (2002) :  
Bis(31/31')[[Cys(31), Nva(34)]NPY(27-36)-NH(2)]: a neuropeptide Y (NPY)  
Y(5) receptor selective agonist with a latent stimulatory effect on food  
intake in rats. *Peptides*,23,1485-90.
- Chronwall,B.M.,DiMaggio,D.A.,Massari,V.J.,Pickel,V.M.,Ruggiero,D.A.,and  
O'Donohue,T.L. (1985) : The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat  
brain.*Neuroscience*,15,1159-1181.
- Clark,J.T., Kalra,P.S., and Kalra,S.P. (1985) : Neuropeptide Y stimulates  
feeding but inhibits sexual behavior in rats.*Endocrinal*,115,427-429.
- Currie,P.J.,and Coscina,D.V. (1995) : Dissociated feeding and  
hypothermic effects of neuropeptide Y in the paraventricular and  
perifornical hypothalamus.*Peptide*,16,599-604
- Del Negro,C.A., and Chandler,S.H. (1997) : Physiological and theoretical  
analysis of K<sup>+</sup> currents controlling discharge in neonatal rat  
mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurophysiol*,77,537-53.
- De Quidt,M.E., and Emson,P.C. (1986) : Distribution of neuropeptide Y-like

immunoreactivity in the rat central nervous system--II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 18, 545-618.

Dube, M.G., Horvath, T.L., Kalra, P.S., and Kalra, S.P. (2000) : Evidence of NPY Y5 receptor involvement in food intake elicited by orexin A in sated rats. *Peptides*, 21, 1557-60.

Dumont, Y., St-Pierre, J.A., and Quirion, R. (1996) : Comparative autoradiographic distribution of neuropeptide Y Y1 receptors visualized with the Y1 receptor agonist [125I][Leu31,Pro34]PYY and the non-peptide antagonist [3H]BIBP3226. *Neuroreport*, 22, 901-4.

Ehlers, C.L., Somes, C., Lopez, A., Kirby, D., and Rivier, J.E. (1997) : Electrophysiological actions of neuropeptide Y and its analogs: new measures for anxiolytic therapy? *Neuropsychopharmacology*, 17, 34-43

Enomoto, A., Han, J.M., Hsiao, C.F., Wu, N., and Chandler, S.H. (2006) : Participation of sodium currents in burst generation and control of membrane excitability in mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurosci*, 29, 3412-22.

Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997) : Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385, 165-168

Francois,P. (2002) : The neuropeptide Y Y1 receptor regulates leptin-mediated control of energy homeostasis and reproductive functions. *The FASEB Journal*,714,Vol. 16.

Fu,L.Y., Acuna-Goycolea,C., and van den Pol,A.N. (2004) : Neuropeptide Y inhibits hypocretin/orexin neurons by multiple presynaptic and postsynaptic mechanisms: tonic depression of the hypothalamic arousal system. *J Neurosci*,24,8741-51.

Herzog,H., Hort,Y.J., Ball,H.J., Hayes,G., Shine,J., and Selbie,L.A. (1992) : Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*,89,5794-8.

Holmqvist,T., Akerman,K.E.,and Kukkonen,J.P. (2001) : High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neurosci Lett*,305,177-80.

Hu,Y., and Dunbar,J.C. (1997) :Intracerebroventricular administration of NPY increases sympathetic tone selectively in vascular beds.*Brain Res Bull*,44,97-103

Jain,M.R., Horvath,T.L., Kalra,P.S., and Kalra,S.P. (2000) : Evidence that NPY Y1 receptors are involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. *Regul. Pept*,87, 19-24

Kang,Y., Saito,M., Sato,H., Toyoda,H., Maeda,Y., Hirai,T., and Bae,Y.C. (2007) : Involvement of persistent Na<sup>+</sup> current in spike initiation in primary sensory neurons of the rat mesencephalic trigeminal nucleus. *J Neurophysiol*,97,2385-93.

Lecklin,A., Lundell,I., Salmela,S., Männistö,P.T., Beck-Sickinger,A.G., and Larhammar,D. (2003) : Agonists for neuropeptide Y receptors Y1 and Y5 stimulate different phases of feeding in guinea pigs. *Br J Pharmacol*, 139,1433-40.

Lemos,V.S., and Takeda,K. (1995) : Neuropeptide Y2-type receptor - mediated activation of large-conductance Ca(2+)-sensitive K<sup>+</sup> channels in a human neuroblastoma cell line. *Pflugers Arch*,430,534-40.

Luo,P., and Dessem,D. (2002) : Morphological evidence for recurrent jaw-muscle spindle afferent feedback within the mesencephalic trigeminal nucleus. *Brain Res*,710,260-4

Majer,J. (1955) :Rerulation of energy intake and body weight:the glucostatic theory and the lipostatic hypothesisi. *Ann N Y Acad Sci*,63,15-43

Morley,J.E., Levine,A.S., Gosnell,B.A., Kneip,J., and Grace,M. (1987) : Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol*, 252,599-609.

Nakazato,M., Murakami,N., Date,Y., Kojima,M., Matsuo,H., Kangawa,K., and Matsukura,S. (2001) : A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*,409,194-198.

Nanobashvili,A., Woldbye,D.P., Husum,H., Bolwig,T.G.,and Kokaia,M. (2004) : Neuropeptide Y Y5 receptors suppress in vitro spontaneous epileptiform bursting in the rat hippocampus. *Neuroreport*,15,339-43.

Qu,D.,Ludwig,D.S.,Gammeltoft,S.,Piper,M.,Pellemounter,M.A.,Cullen,M.J., Mathes,W.F.,Przypek,R.,Kanarek,R.,and Maratos-Flier,E. (1996) :A role for melanin-concentrating hormone in the cetral regulation of feeding behavior. *Nature*,380,243-247

Rokx,J.T., Jüch,P.J., and van Willigen,J.D. (1986) :Arrangement and connections of mesencephalic trigeminal neurons in the rat. *Acta anat*,127,7-15

Sahu,A. (2002) : Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-I (orexin A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats. *Brain Res*, 944,232-8.

Sakurai,T., Amemiya,A., Ishii,M., Matsuzaki,I., Chemelli,R.M., Tanaka,H., Williams,S.C., Richarson,J.A., Kozlowski,G.P., Wilson,S., Arch,J.R., Buckingham,R.E. Haynes,A.C., Carr,S.A., Annan,R.S., McNulty,D.E., Liu,W.S., Terrett,J.A., Elshourbagy,N.A., Bergsma,D.J., and Yanagisawa,M. (1998) :

Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*,92,573-585

Shimada,M., Tritos,N.A., Lowell,B.B., Flier,J.S., and Maratos-Flier,E. (1998) : Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*,396,670-674

Shigenaga,Y., Doe,K., Suemune,S., Mitsuhiro,Y., Tsuru,K., Otani,K., Shirana ,Y., Hosoi,M., Yoshida,A., and Kagawa,K. (1989) : Physiological and morphological characteristics of periodontal mesencephalic trigeminal neurons in the cat--intra-axonal staining with HRP. *Brain Res*,505,91-110.

Stanley,B.G.,and Leibowitz,S.F. (1984) : Neuropeptide Y stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci*,33,2635-2642

Sun,Q.Q., Huguenard,J.R.,and Prince,D.A. (2001) : Neuropeptide Y receptors differentially modulate G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels and high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in rat thalamic neurons. *J Physiol*,531,67-79.

Sun,L.,and Miller.R.J. (1999) : Multiple neuropeptide Y receptors regulate K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels in acutely isolated neurons from the rat arcuate nucleus. *J Neurophysiol*,81,1391-403.

Tanaka,S., Wu,N., Hsiao,C.F., Turman,J.Jr., and Chandler,S.H. (2003) :  
Development of inward rectification and control of membrane excitability  
in mesencephalic v neurons. *J Neurophysiol*,89,1288-98.

Tatemoto,K., Carlquist,M., and Mutt,V. (1982) : Neuropeptide Y--a novel brain  
peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide.  
*Nature*,296,659-660.

Tsuji,T., Yamamoto,T., Tanaka,S., Bakhshishayan,S., and Kogo,M. (2011) :  
Analyses of the facilitatory effect of orexin on eating and masticatory muscle  
activity in rats. *J Neurophysiol*,106,3129-3135

Ushimura,A., Tsuji,T., Tanaka,S., Kogo,M., and Yamamoto,T. (2014) :  
Neuropeptide-Y modulates eating patterns and masticatory muscle activity in rats.  
*Behav Brain Res*,10,520-526.

Wolak,M.L., DeJoseph,M.R.,Cator,A.D.,Mokashi,A.S.,Brownfield,M.S.,and Urban,  
J.H. (2003) : Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in  
the rat brain by using immunohistochemistry. *J Comp Neurol*,464,285-311.

Wu,N., Hsiao,C.F., and Chandler,S.H. (2001) : Membrane resonance and  
subthreshold membrane oscillations in mesencephalic V neurons: participants in  
burst generation. *J Neurosci*,21,3729-39



Wu,N., Enomoto,A., Tanaka.S., Hsiao,C.F., Nykamp,D.Q., Izhikevich,E., and Chandler,S.H. (2005) : Persistent sodium currents in mesencephalic v neurons participate in burst generation and control of membrane excitability. *J Neurophysiol*,93,2710-22.

Xu,X., Guo,F., He,Q., Cai,X., Min,D., Wang,Q., Wang,S., Tian,L., Cai,J., and Zhao,Y. (2014) : Altered expression of neuropeptide Y, Y1 and Y2 receptors, but not Y5 receptor, within hippocampus and temporal lobe cortex of tremor rats *Neuropeptides*,48,97-105.

Yamanaka,A., Kunii,K., Nambu,T.,Tsuji no,N.,Sakai,A.,Matsuzaki,I., Miwa,Y.,Goto,K.,and Sakurai,T. (2000) : Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res*,859,404-9.

Yamazoe,M., Shiosaka,S., Emson,P.C., and Tohyama,M. (1985) : Distribution of neuropeptide Y in the lower brainstem: an immunohistochemical analysis.*Brain Res*,335,109-120.

Yannielli,P.C., and Harrington,M.E. (2001) : Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses.*Peptide*,22,547-556.

Yarom,Y.,Sugimori,M.,and Llinás,R. (1985) : Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons in vitro. *Neuroscience*,16,719-37.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994)  
: Positional cloning of the mouse obese gene and its human Homologue. *Nature*,  
372, 425-432

桜井武 (2003) : 摂食関連ペプチドの生理. 日本薬理学会雑誌, 122, 236-242.

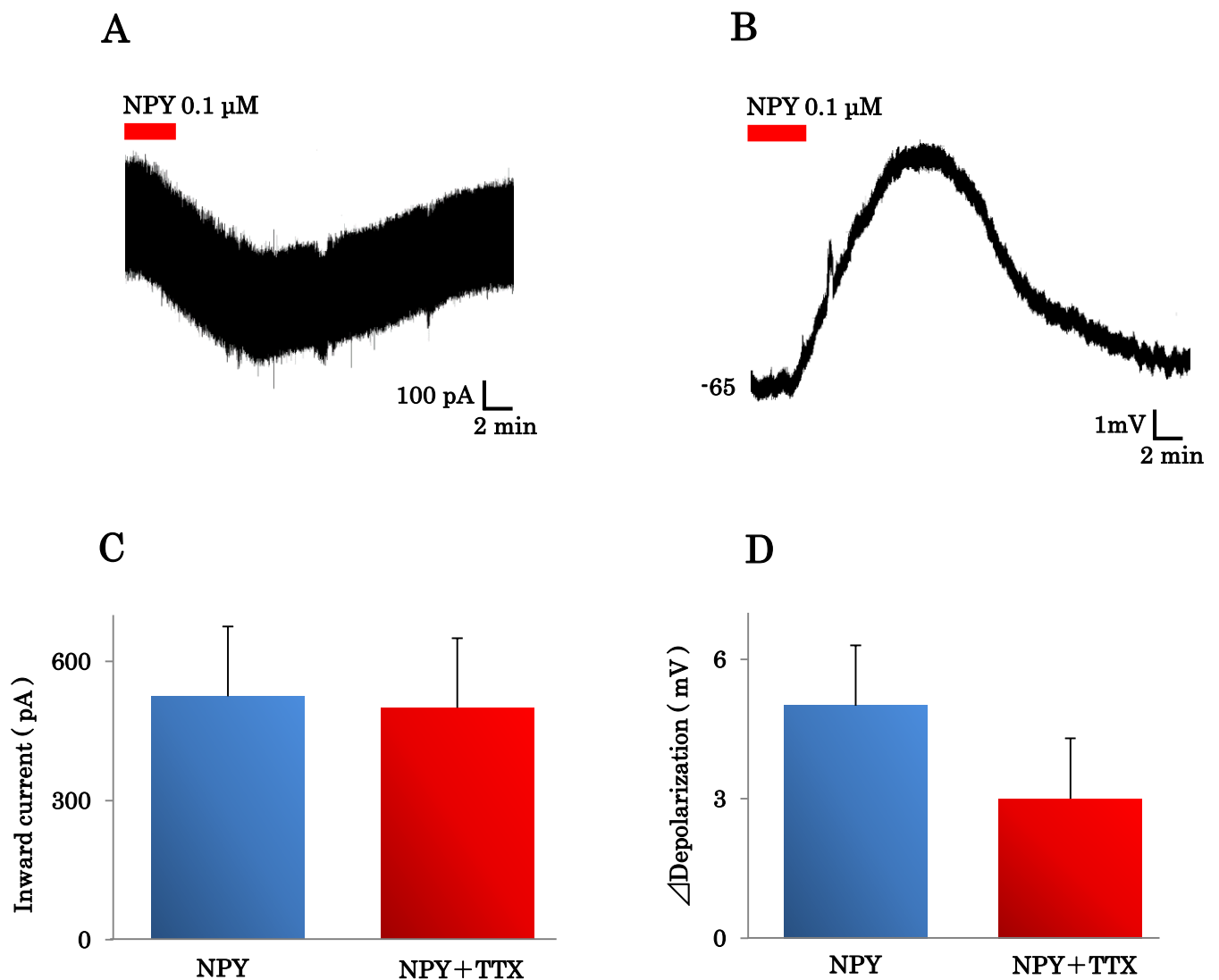


図1 NPY 投与によるMTNの膜電流、膜電位変化

A, B: NPY 投与後、v-clamp 条件下において誘発された内向き電流 (A) ならびに c-clamp 条件下で誘発された脱分極変化 (B) をそれぞれ示す。

C: NPY 投与時 (n=5) と、NPY+TTX 投与時 (n=5) において、膜電流変化に有意差を認めなかった。

D: 膜電位変化についても、NPY 投与時 (n=5) と、NPY+TTX 投与時 (n=5) において有意差を認めなかった (D)。

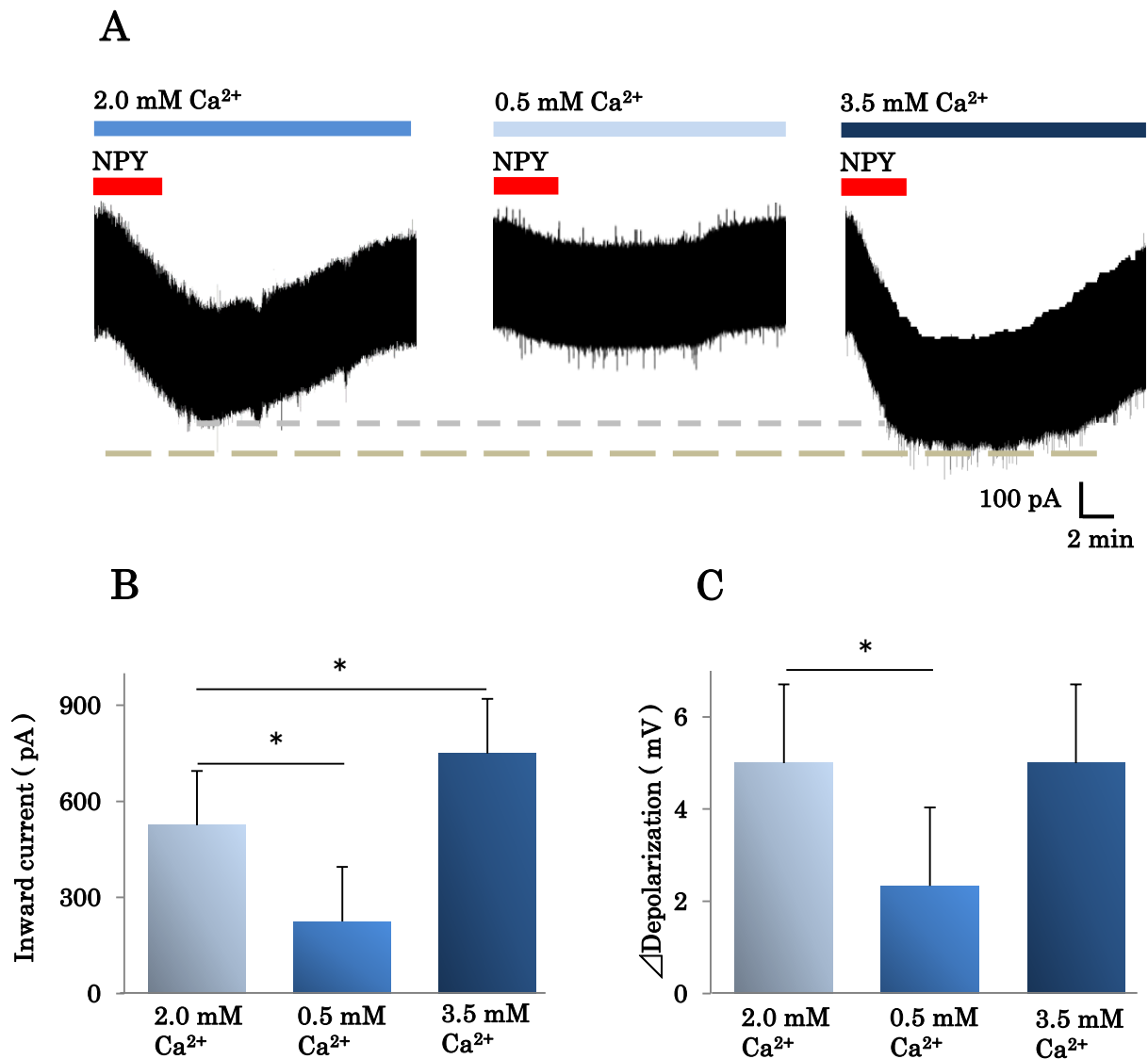


図2 細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件変化時のNPYによる脱分極変化および内向き電流

A: N-ACSF (2.0 mM Ca<sup>2+</sup>)、細胞外低 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件 (0.5 mM Ca<sup>2+</sup>)、細胞外高 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件 (3.5 mM Ca<sup>2+</sup>) で NPY 投与によって誘発された内向き電流を示す。B: 内向き電流は、細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度の下降、上昇に伴って有意に減少、増加を認めた (n=5, \*p<0.05)。C: 膜電位の脱分極変化は、N-ACSF (2.0 mM Ca<sup>2+</sup>) 条件と比較し、細胞外低 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件で有意に減少を認めた (n=5, \*p<0.05)。

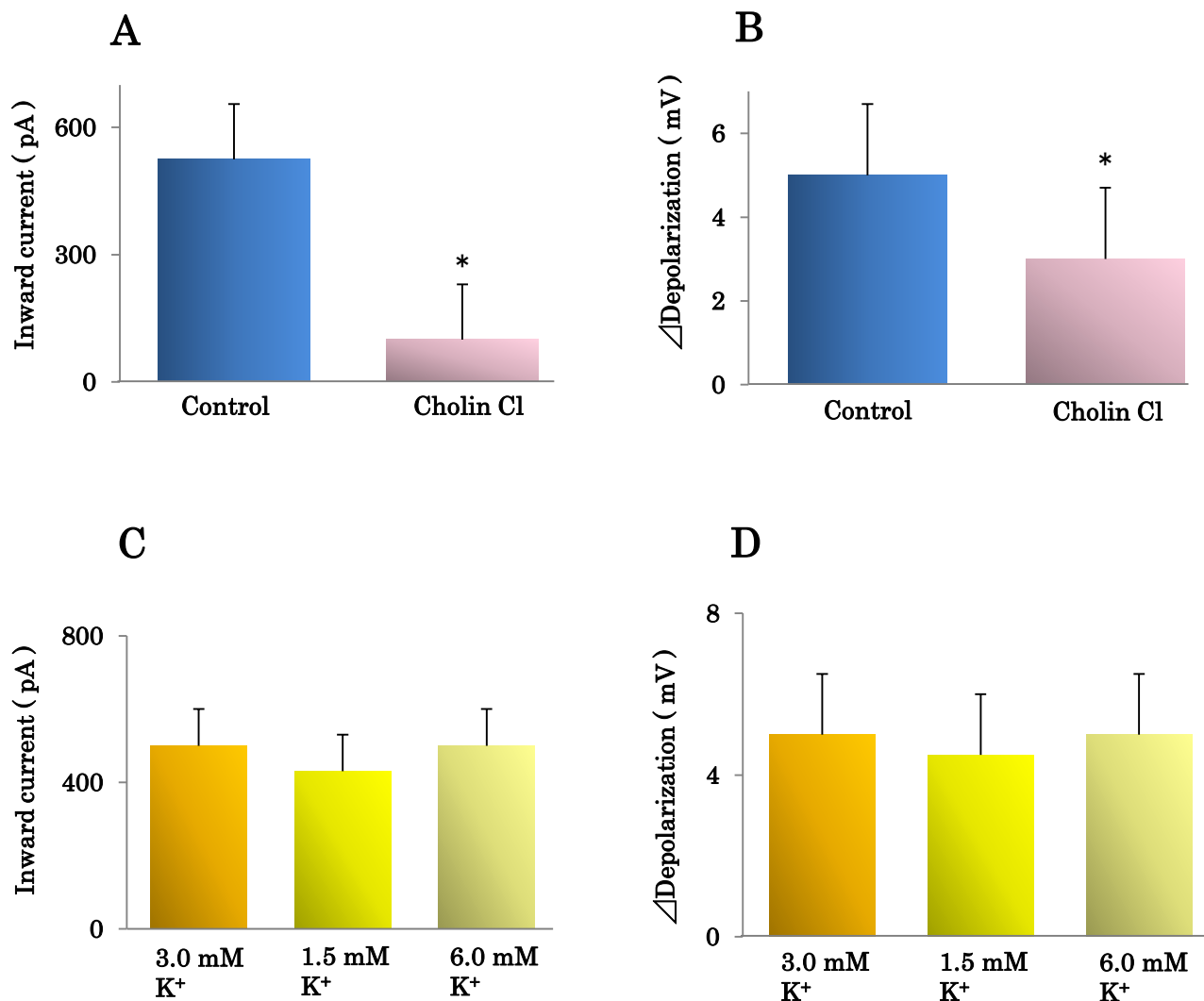


図3 細胞外 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 濃度条件変化時の NPY による脱分極変化および内向き電流

N-ACSF (2.0 mM Ca<sup>2+</sup>) 条件、NaCl を Choline-Cl に置換した条件で、NPY 灌流投与後に誘発された膜電流変化 (A)、膜電位変化の値 (B) をそれぞれ示す。Choline-Cl に置換条件下において膜電流変化、膜電位変化は有意に減少した (n=5, \*p<0.05)。N-ACSF (1.5 mM K<sup>+</sup>) 条件、細胞外低 K<sup>+</sup> 濃度条件 (1.5 mM)、細胞外高 K<sup>+</sup> 濃度条件 (6.0 mM) で、NPY 投与後に誘発された膜電流変化 (C)、膜電位変化 (D) の値に有意差を認めなかった (n=5)。

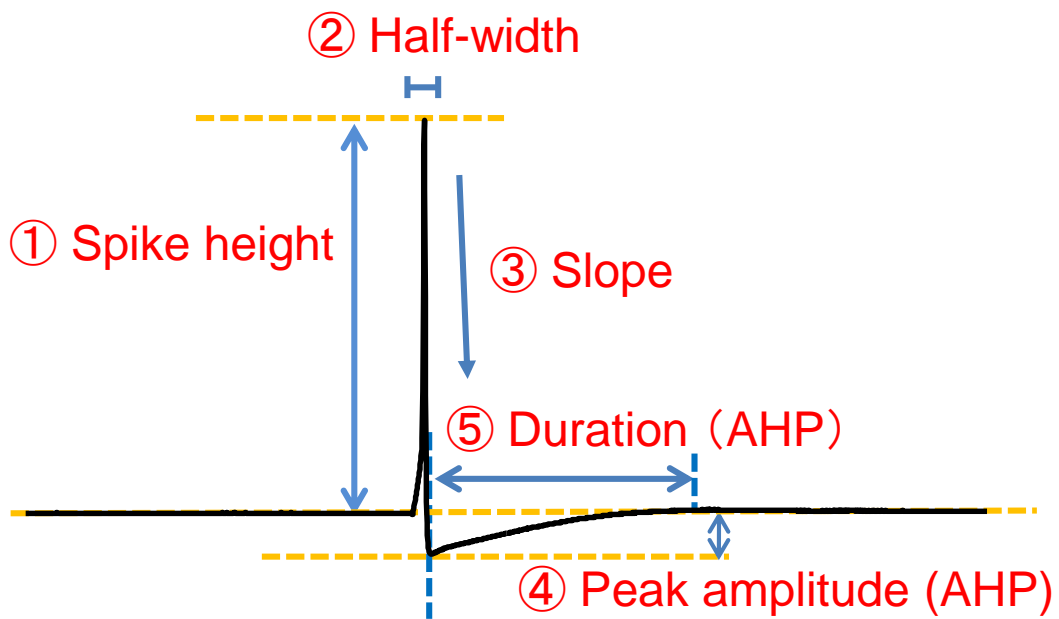


図4-A AP 特性の解析

Action potential (AP) におけるパラメータを示す。①: スパイクの高さ (Peak amplitude, mV) ②: ①の50%を示す位置の時間幅 (Half-width, ms) ③: スパイクの減衰における最大の傾き (Slope, mV/ms) ④: 後過分極 (AHP) ピーク値 (Peak amplitude, mV) ⑤: ④の時間幅 (Duration)

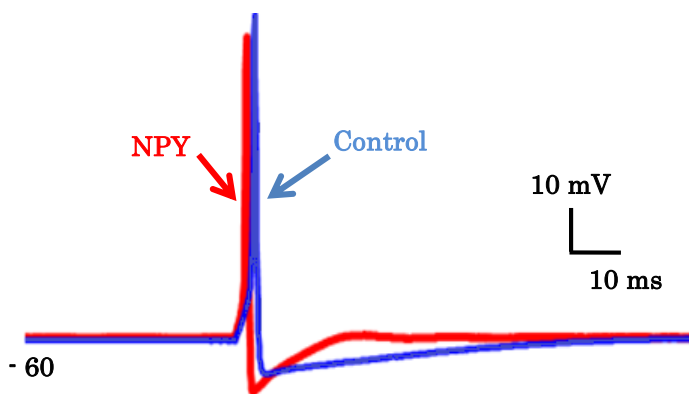


図4-B NPY 投与前後での MTN の典型的な AP 波形

P17のMTN より誘発された、NPY 投与前後での AP の波形を示す。NPY 投与後に Spike height は低下、AHP の Peak amplitude は増大、Duration は短縮する傾向を認めた。

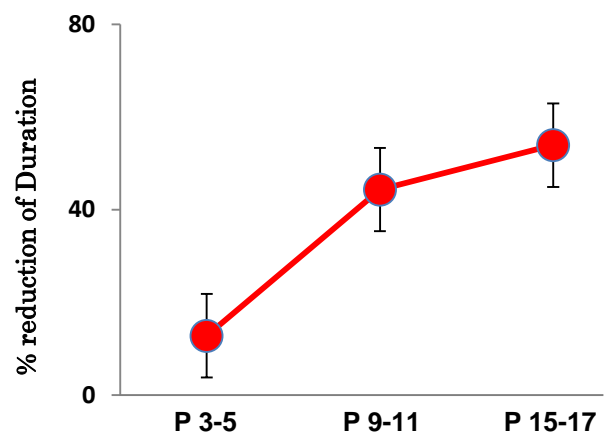


図4-C Duration の変化

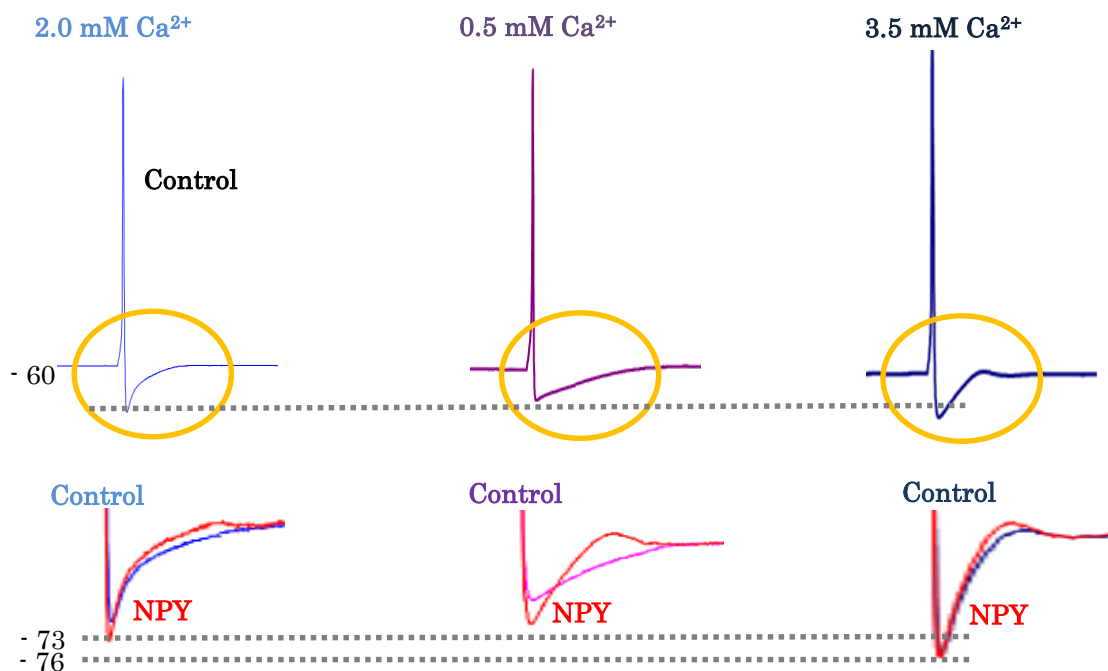
Duration の減少率は P3-5 ニューロン群 (n=5) と比較し P9-11(n=7)、P15-17ニューロン群 (n=7)と日齢が進むにしたがい、変化率が增大する傾向を認めた。

	P 3-5		P 9-11		P 15-17	
	Control	NPY	Control	NPY	Control	NPY
AP						
Spike height (mV)	84.5 ± 7.2	79.2 ± 9.3	92.1 ± 5.2	81.5 ± 10.2	87.6 ± 4.2	89.6 ± 13.0
Half width (ms)	0.87 ± 0.05	0.98 ± 0.03	0.46 ± 0.06	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.07	0.47 ± 0.01
Slope (mV/ms)	-106.6 ± 15.1	-87.7 ± 8.5	-254.4 ± 23.8	-240.3 ± 22.3	-212.9 ± 15.9	-237.8 ± 10.7
AHP						
Peak amplitude (mV)	-7.7 ± 1.0	-7.3 ± 1.1	-13.5 ± 1.5	-15.1 ± 1.8	-10.4 ± 2.0	-13.8 ± 1.3
Duration (ms)	124.7 ± 4.3	121.6 ± 7.9	31.4 ± 6.3	17.9 ± 4.9*	26.4 ± 4.3	18.9 ± 8.9*

表-1 NPYによるMTN活動電位(AP)特性の修飾作用

P 3-5 群において、各パラメータで NPY 投与前後で有意差を認めるものはなかった。P 9-11 群、P 15-17 群において、AHP Duration は NPY 投与後有意に短縮した。その他のパラメータに有意差はなかった。(P 3-5 n=5, P 9-11 n=7, P 15-17 n=7 \*p<0.05)

A



B

C

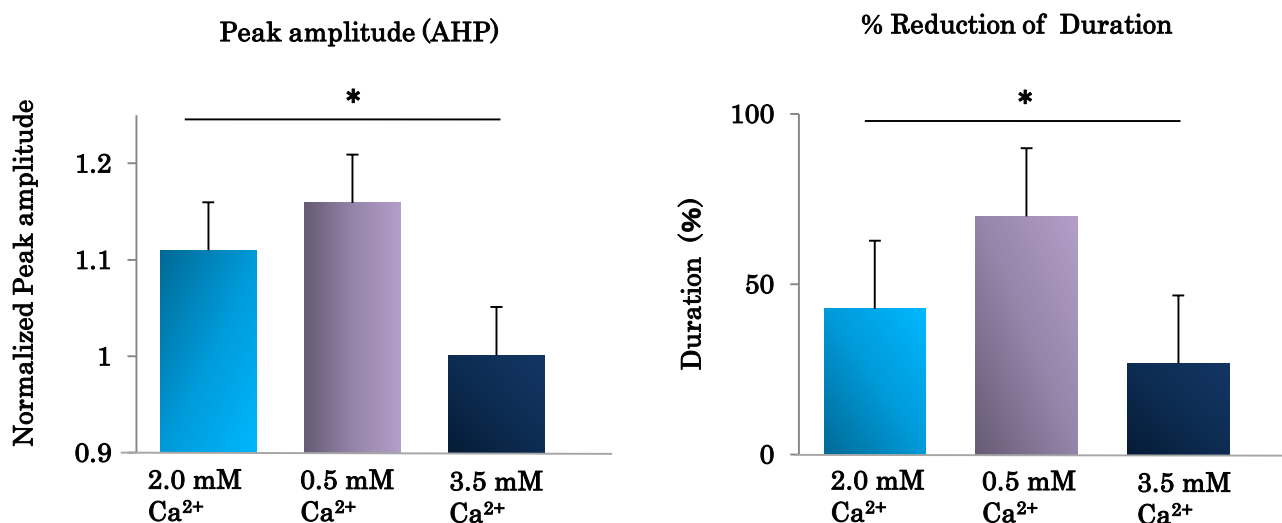
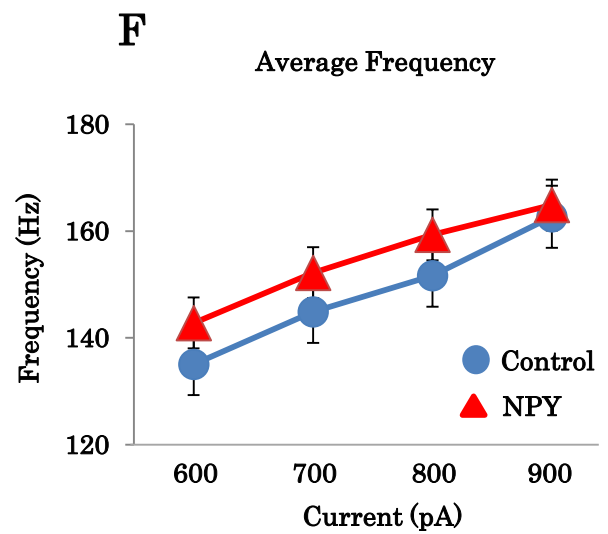
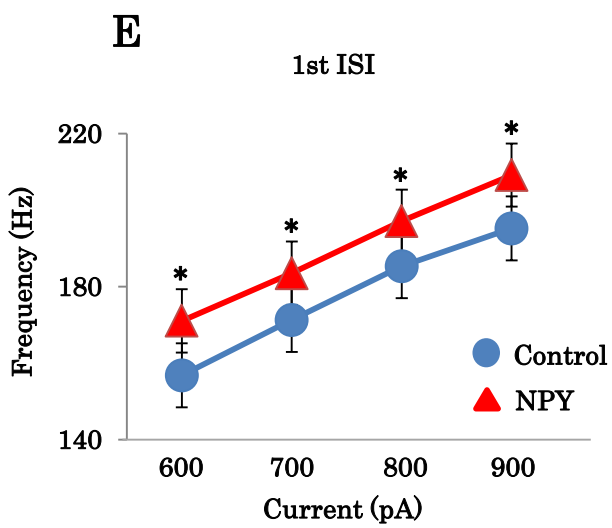
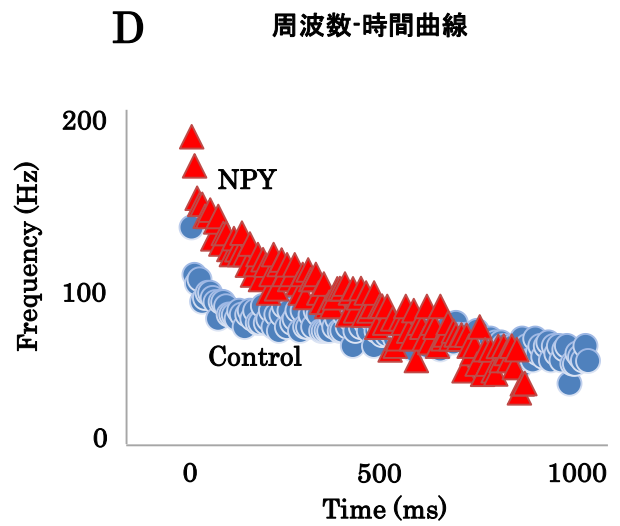
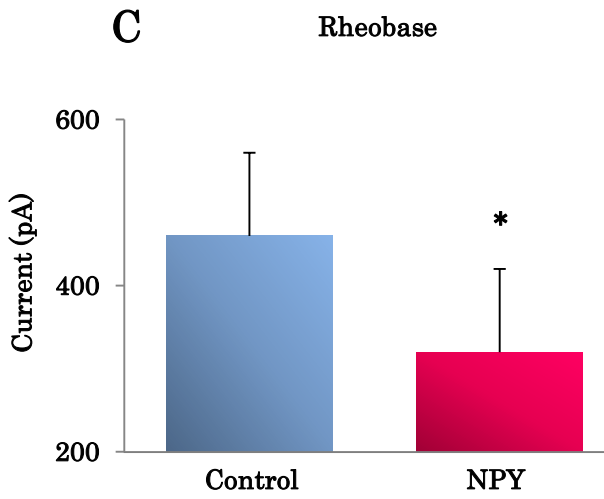
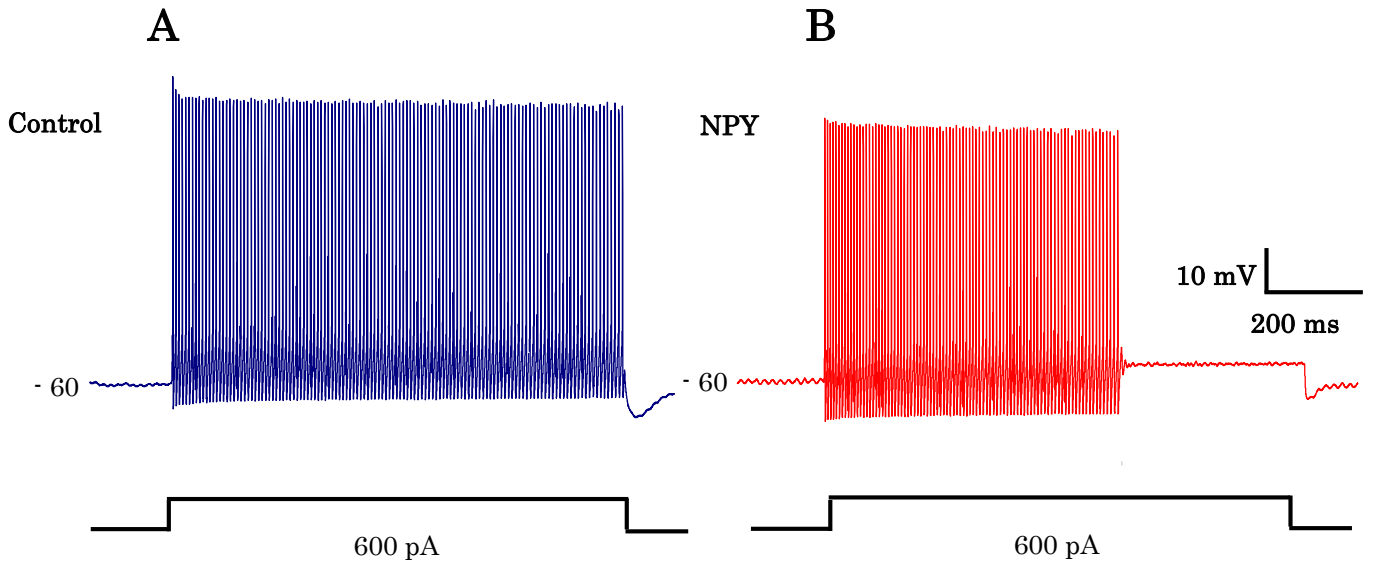


図5 細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件変化時の NPY による AHP の修飾作用

P15-17 において、N-ACSF (2.0 mM Ca<sup>2+</sup>)、細胞外低 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件 (0.5 mM Ca<sup>2+</sup>)、細胞外高 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件 (3.5 mM Ca<sup>2+</sup>) で誘発した活動電位波形と NPY 投与前後における AHP の重ね合わせを示す (A)。各細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件下で NPY を投与した際の AHP Peak Amplitude (B)、Duration 短縮率 (%) (C) をそれぞれ示す。N-ACSF 条件と比較し、細胞外高 Ca<sup>2+</sup> 濃度条件では、Peak amplitude, Duration 短縮率はともに有意に減少した (n=5, \*p<0.05)。





## 図6 NPYによるMTN連続発火活動(Spike train)特性の修飾作用

A,B: P17のMTNにおいて1 secの矩形波脱分極刺激により誘発されたSpike train (ST) 波形を示す(A: control, B: NPY)。C: ST誘発に必要な基電流値はNPY投与後有意に減少した( $n=8$ ,  $*p < 0.05$ )。D: 周波数-時間曲線においてNPY投与後、ST持続時間の短縮傾向と早期のSpike frequency adaptation (SFA)が観察された。E,F: 周波数-電流曲線においてNPY投与後、1st-ISI (E)は全ての電流刺激条件下で有意に上昇した( $n=8$ ,  $*p < 0.05$ )。平均周波数(F)についても、NPY投与後有意差はなかったが上昇傾向を認めた。

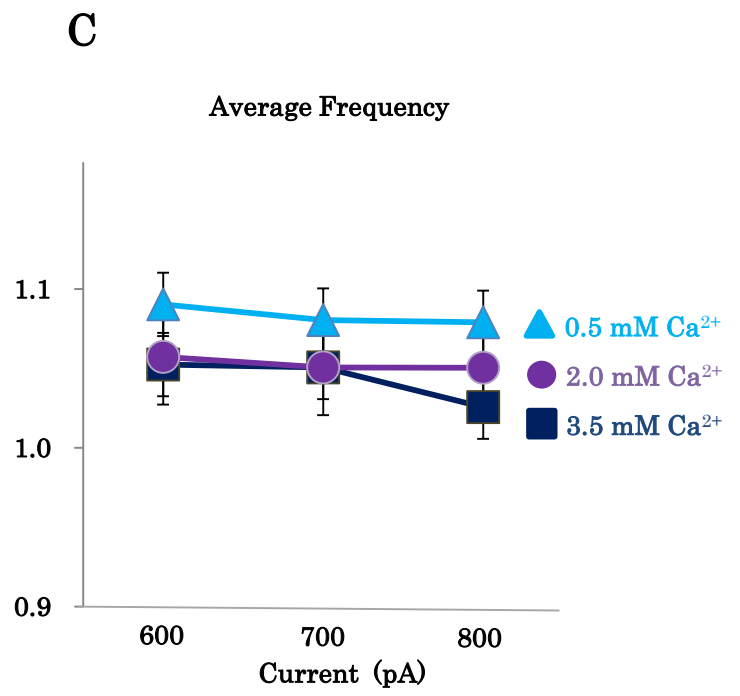
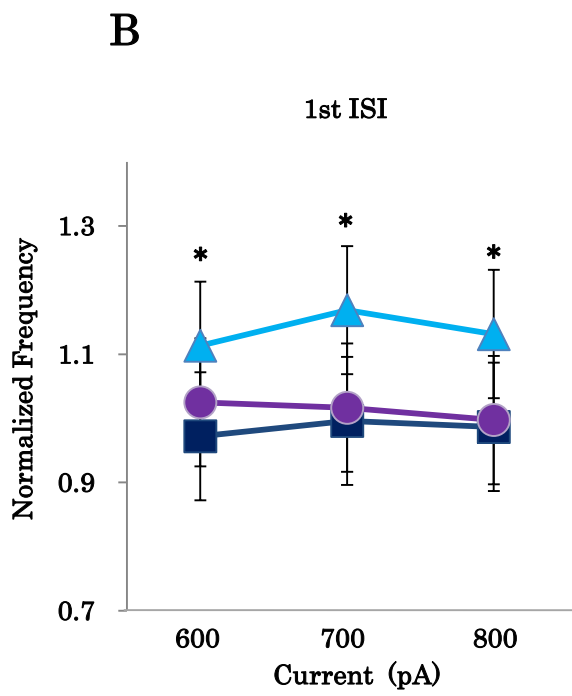
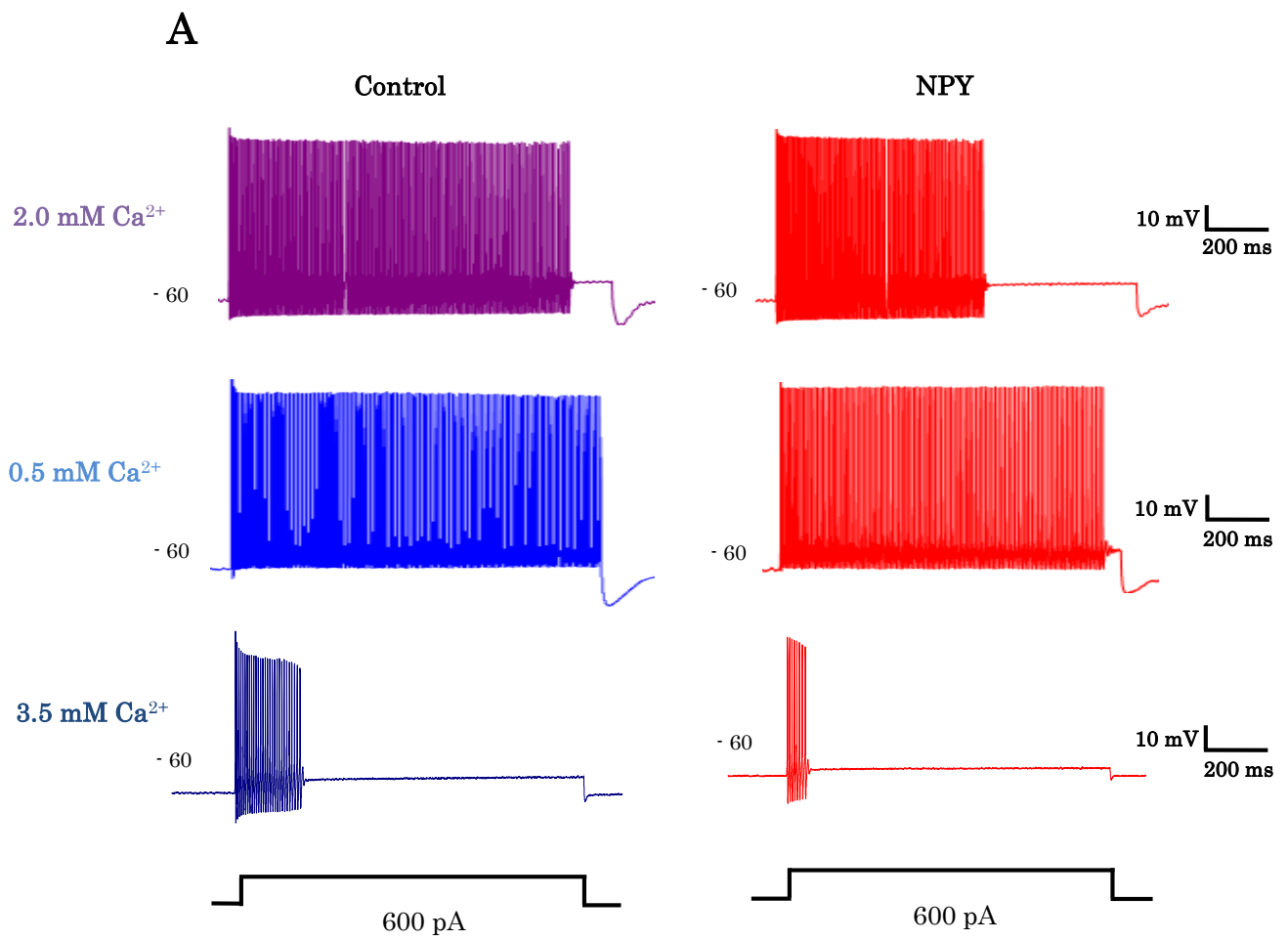


図7 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変化させた状態での ST における NPY の修飾作用

N-ACSF ( $2.0 \text{ mM Ca}^{2+}$ )、細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件 ( $0.5 \text{ mM}$ )、細胞外高  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件 ( $3.5 \text{ mM}$ ) で誘発した NPY 投与前後における ST 波形を示す (A)。N-ACSF 条件と比較し、ST 持続時間は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇、下降に伴い、短縮、延長する傾向が観察された。周波数 - 電流曲線において、NPY 投与後に観察される 1st-ISI (D)、平均周波数 (E) の上昇変化は、細胞外低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度条件下において N-ACSF 条件と比較して増大する傾向を認めた ( $n=6, *p<0.05$ )。

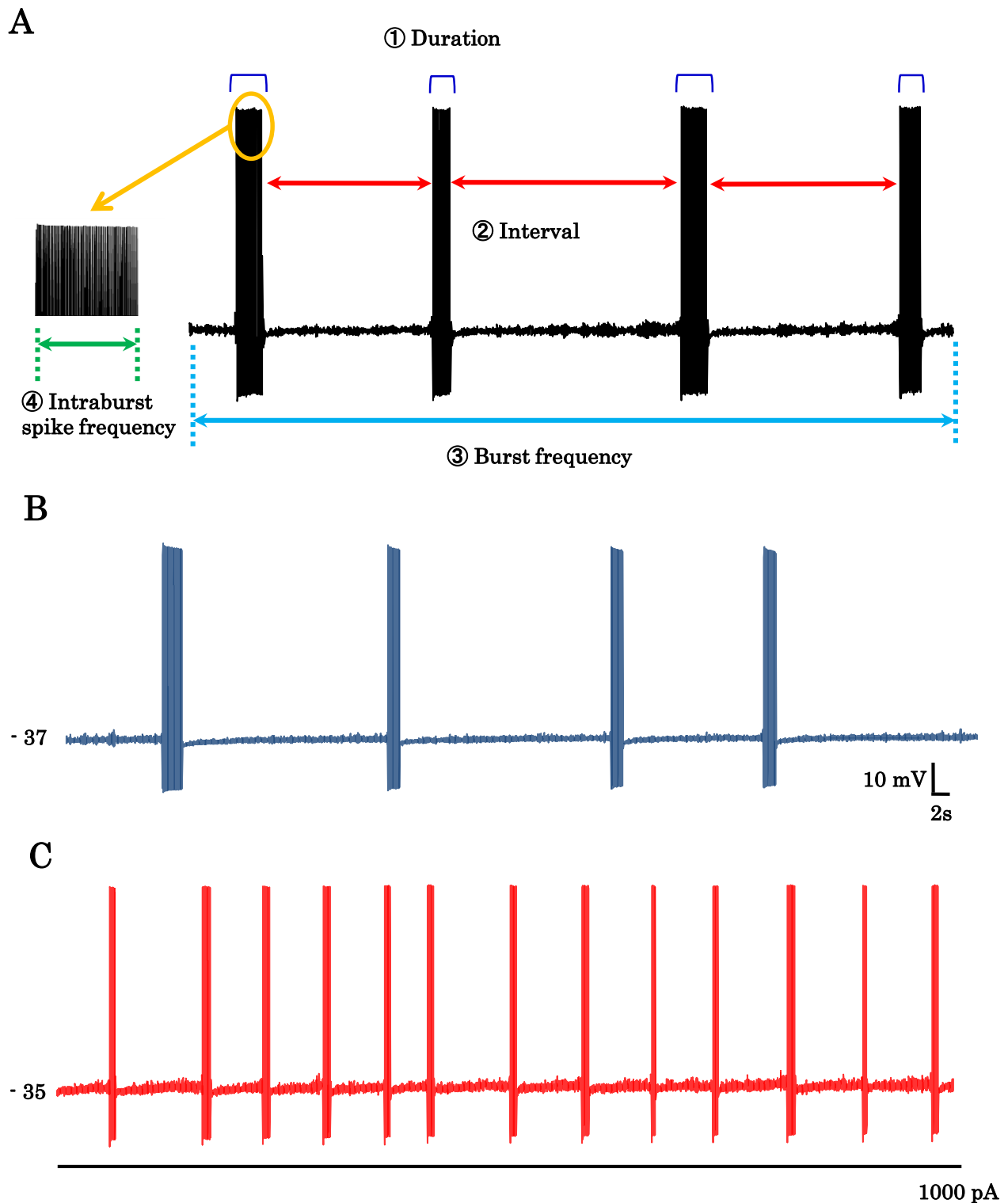


図8 MTN のバースト活動 (BA) における NPY の修飾作用

A: BA の計測項目のうち、①バースト持続時間 (Duration), ②バースト間インターバル (interval), ③バースト周波数 (Burst frequency), ④バースト内スパイク周波数 (Intraburst spike frequency) をそれぞれ示す。

B: P15 MTN において誘発したBA を示す。C: NPY 投与後、バースト持続時間短縮とバースト周波数上昇が観察された。

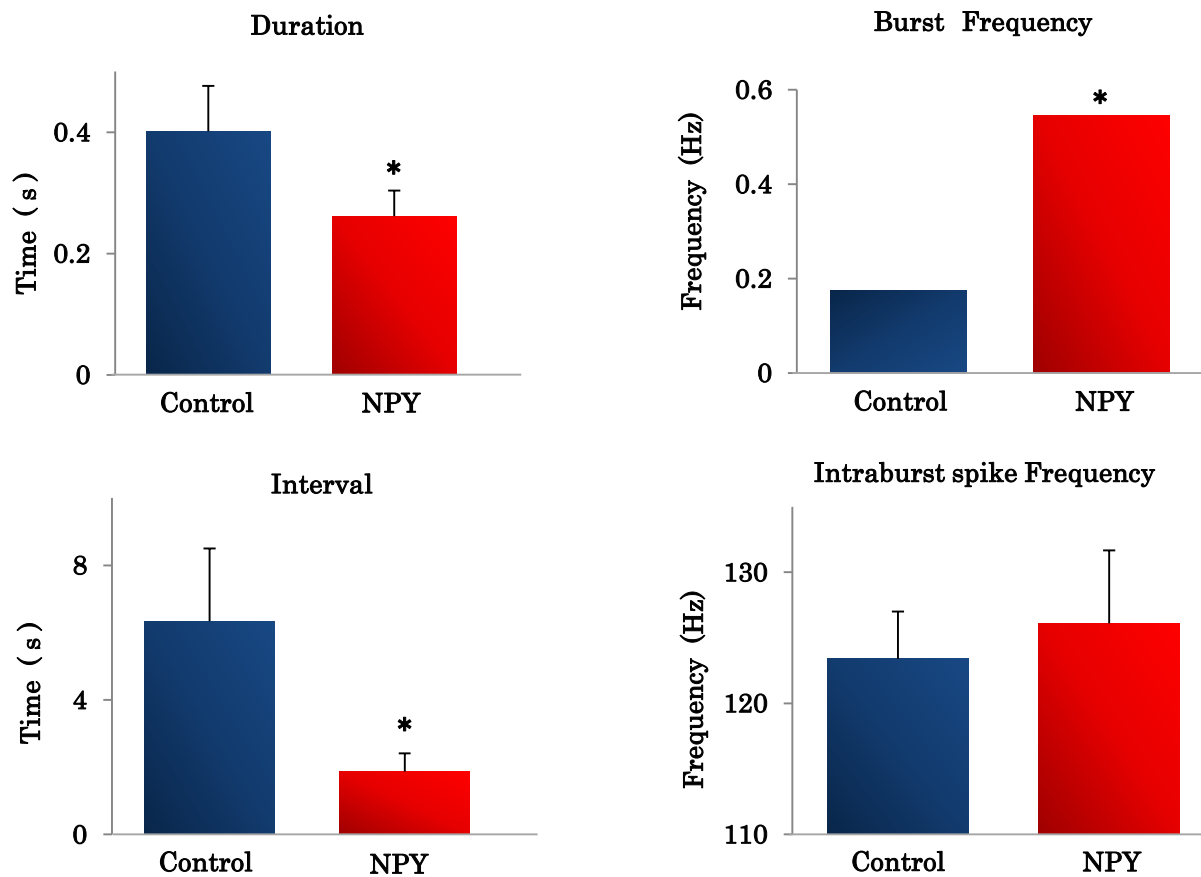


図9 MTN の BA における NPY の修飾作用

NPY 投与前後におけるBA の各パラメータの平均値を示す。バースト持続時間、バースト間インターバルは NPY 投与後有意に減少、バースト周波数は NPY 投与後で有意に増加した (n=4, \*p<0.05)。

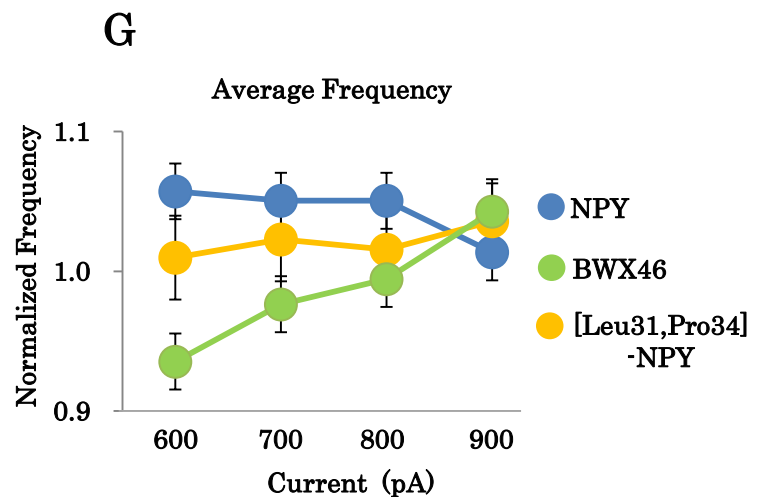
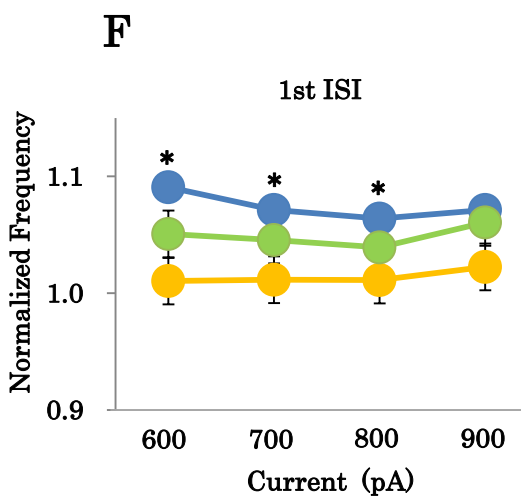
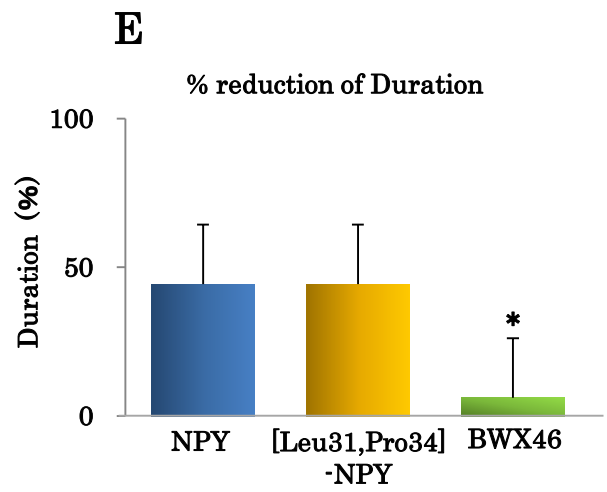
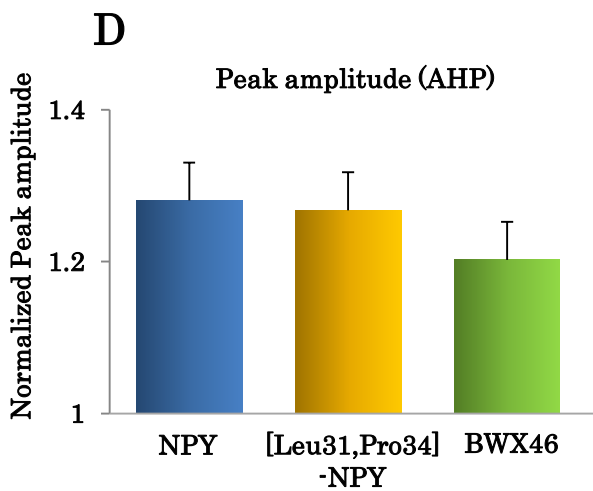
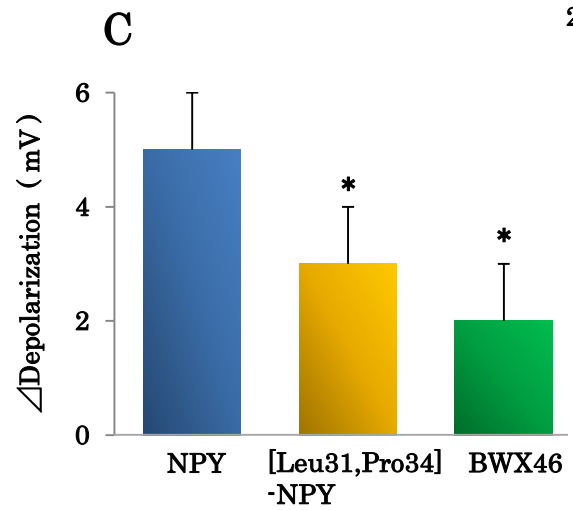
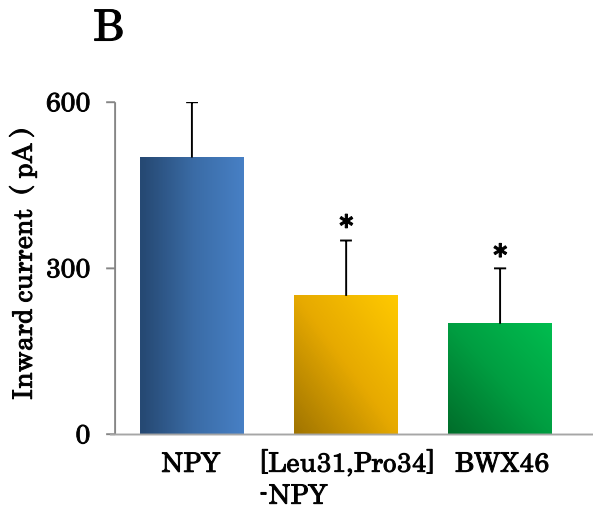
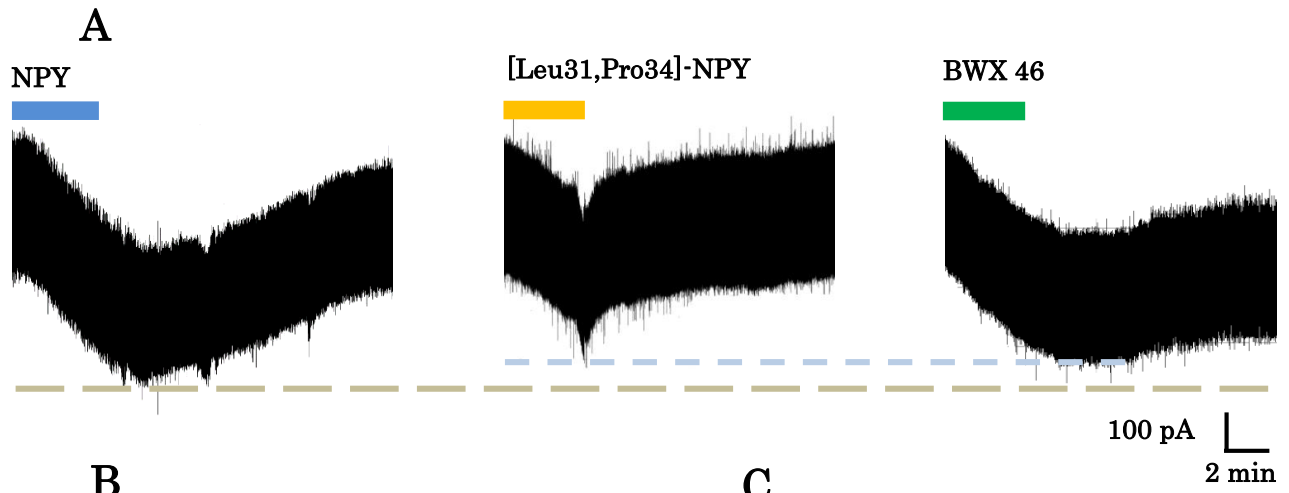


図10 Y1, Y5 受容体作動薬により誘発された脱分極変化および内向き電流

Y1 受容体作動薬、Y5 受容体作動薬によって誘発された内向き電流を示す (A)。Y1, Y5 受容体作動薬灌流投与後に誘発された膜電流変化 (B)、膜電位変化 (C) を示す。NPY 投与時の膜電流変化、膜電位変化と比較し、Y1, Y5 受容体作動薬投与時の膜電流変化、膜電位変化はそれぞれ有意に減少した ( $n=4, *p<0.05$ )。Y1, Y5 受容体作動薬灌流投与後に誘発された AP における Peak amplitude (D)、Duration (E) を示す。Y5 受容体作動薬投与時の Duration の変化率は有意に減少した ( $n=4, *p<0.05$ )。Y1, Y5 受容体作動薬灌流投与後に誘発された ST における 1st-ISI (F)、平均周波数 (G) を示す。1st-ISI において NPY 投与時と比較し、Y1 受容体作動薬投与時は有意に周波数の増加率が減少した ( $n=4, *p<0.05$ )。



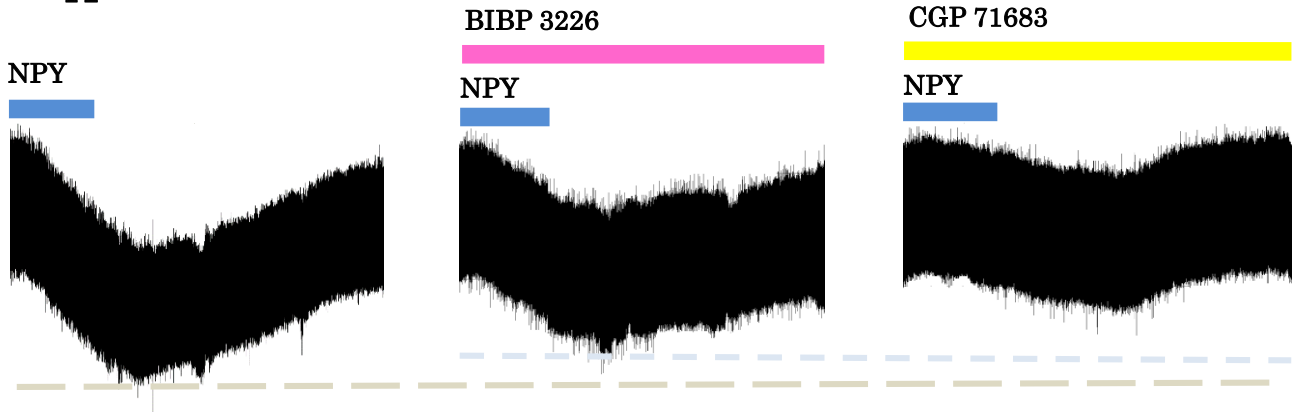
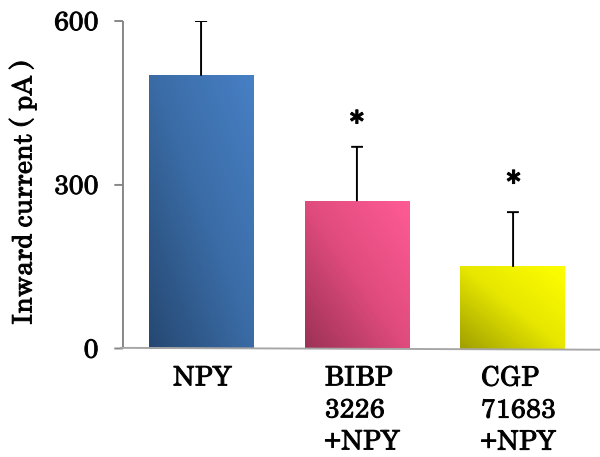
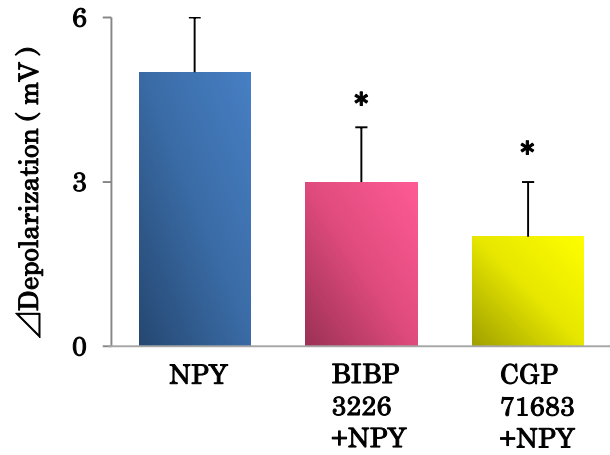
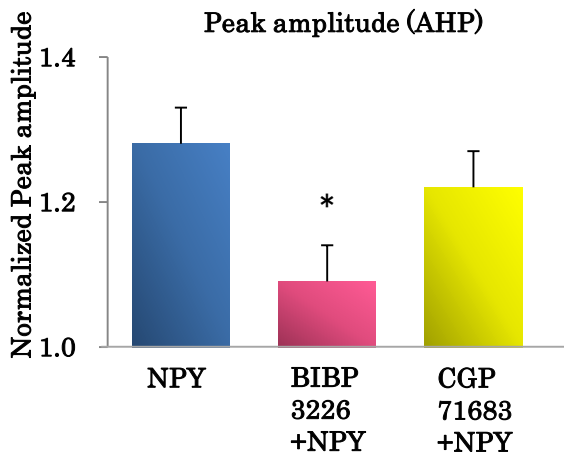
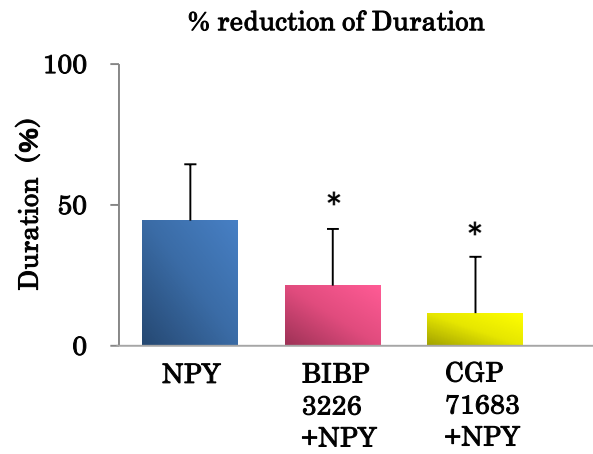
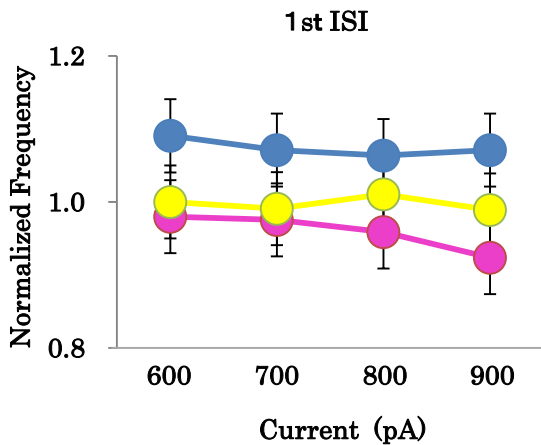
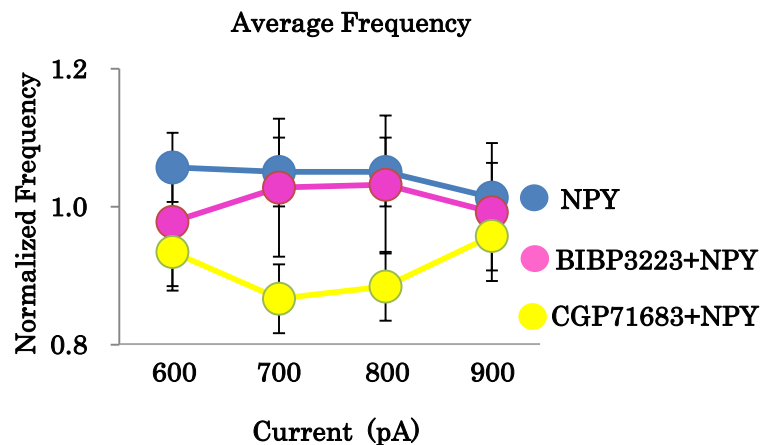
**A****B****C****D****E****F****G**

図11 Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 投与により誘発された内向き電流と脱分極変化

A: Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY によって誘発された内向き電流を示す。B, C: Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY によって誘発された膜電流変化 (B)、膜電位変化 (C) は、NPY 単独投与時と比較して有意に減少した (n=4, \*p<0.05)。D, E: Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 灌流投与後に観察された活動電位における AHP の振幅値 (D)、Duration 短縮率 (E) をそれぞれ示す。Y1 受容体拮抗薬前投与条件下では、NPY 投与後の振幅値増大変化は有意に減少した。また Duration の短縮率は Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下においてともに有意な減少を認めた (n=4, \*p<0.05)。F, G: Y1, Y5 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 灌流投与後の ST における 1st-ISI (F)、平均周波数 (G) は減少する傾向がみられた。

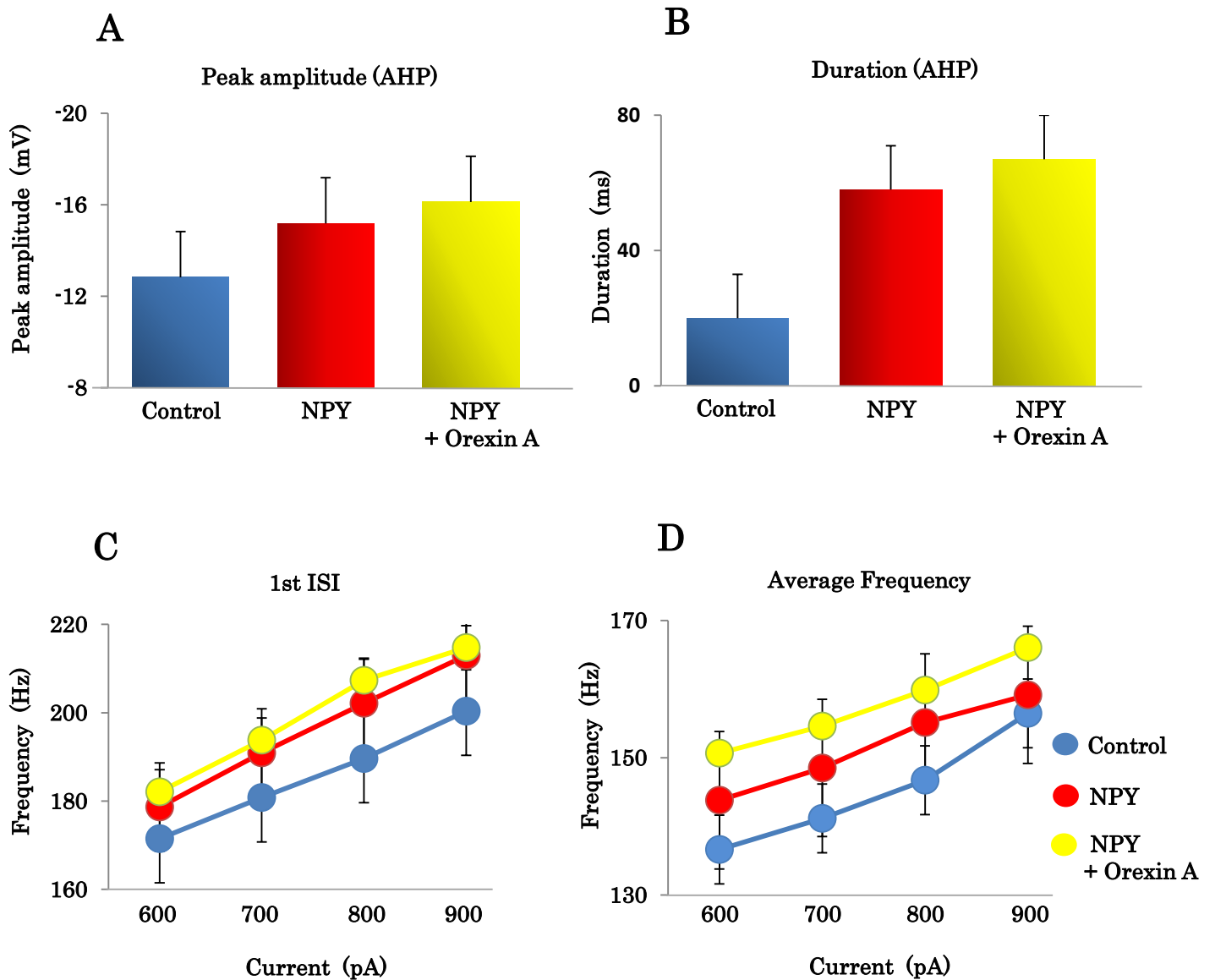


図12 NPY Orexin A 同時投与により誘発されたスパイク発射特性変化

A, B: NPY 単独投与、NPY と Orexin A 同時投与時における活動電位の AHP Peak amplitude (A)、Duration 短縮率 (B) をそれぞれ示す。NPY に Orexin A を追加投与すると、NPY 単独投与時と比較して有意差を認めないものの、Peak amplitude、Duration 短縮率ともに増大する傾向を示した (n=5)。C, D: NPY 単独投与、NPY と Orexin A 同時投与時における ST の 1st-ISI (C)、平均周波数 (D) を示す。NPY 単独投与時と比較して Orexin A の追加投与により、両周波数値はより上昇する傾向を認めた (n=5)。

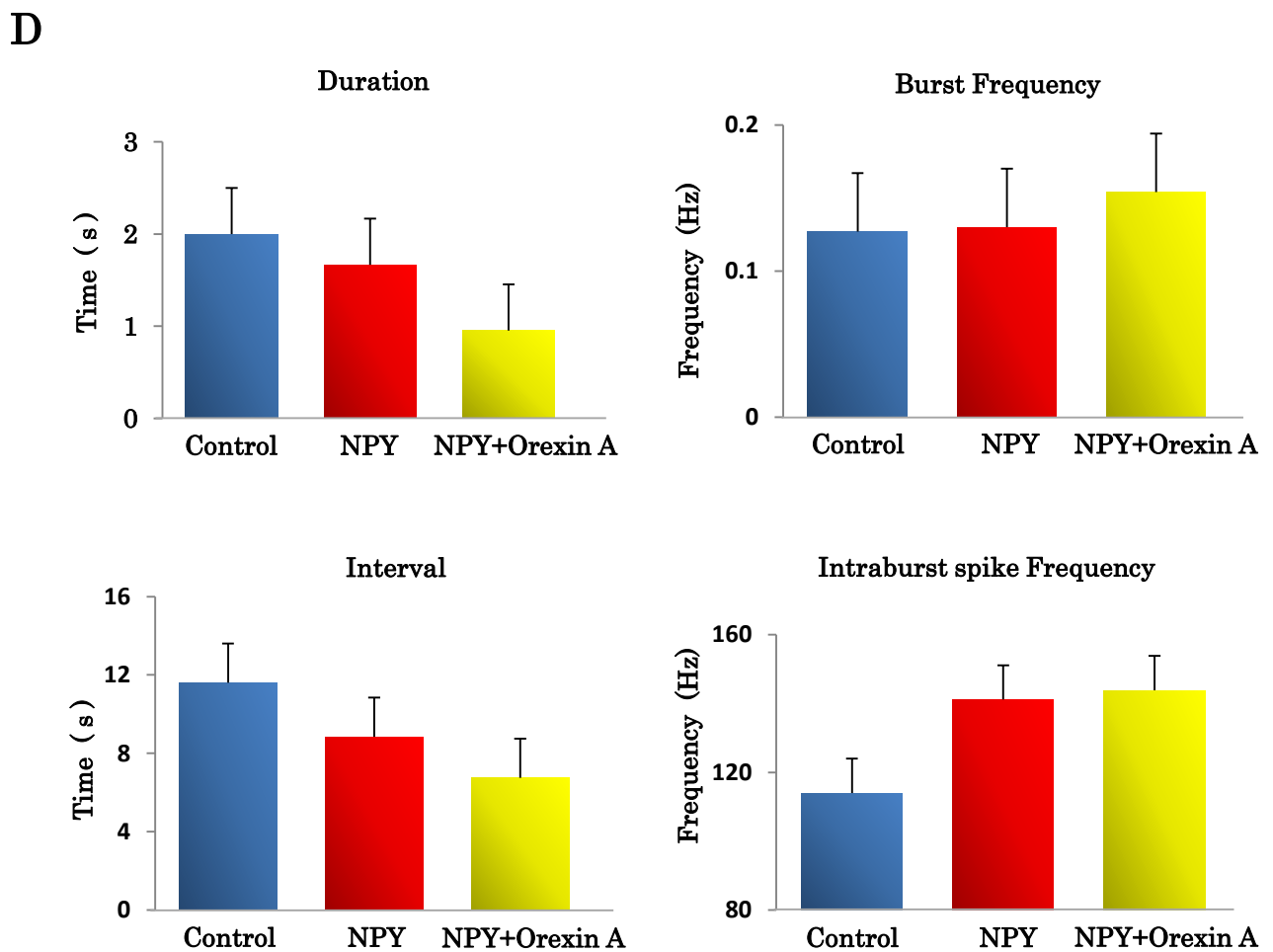
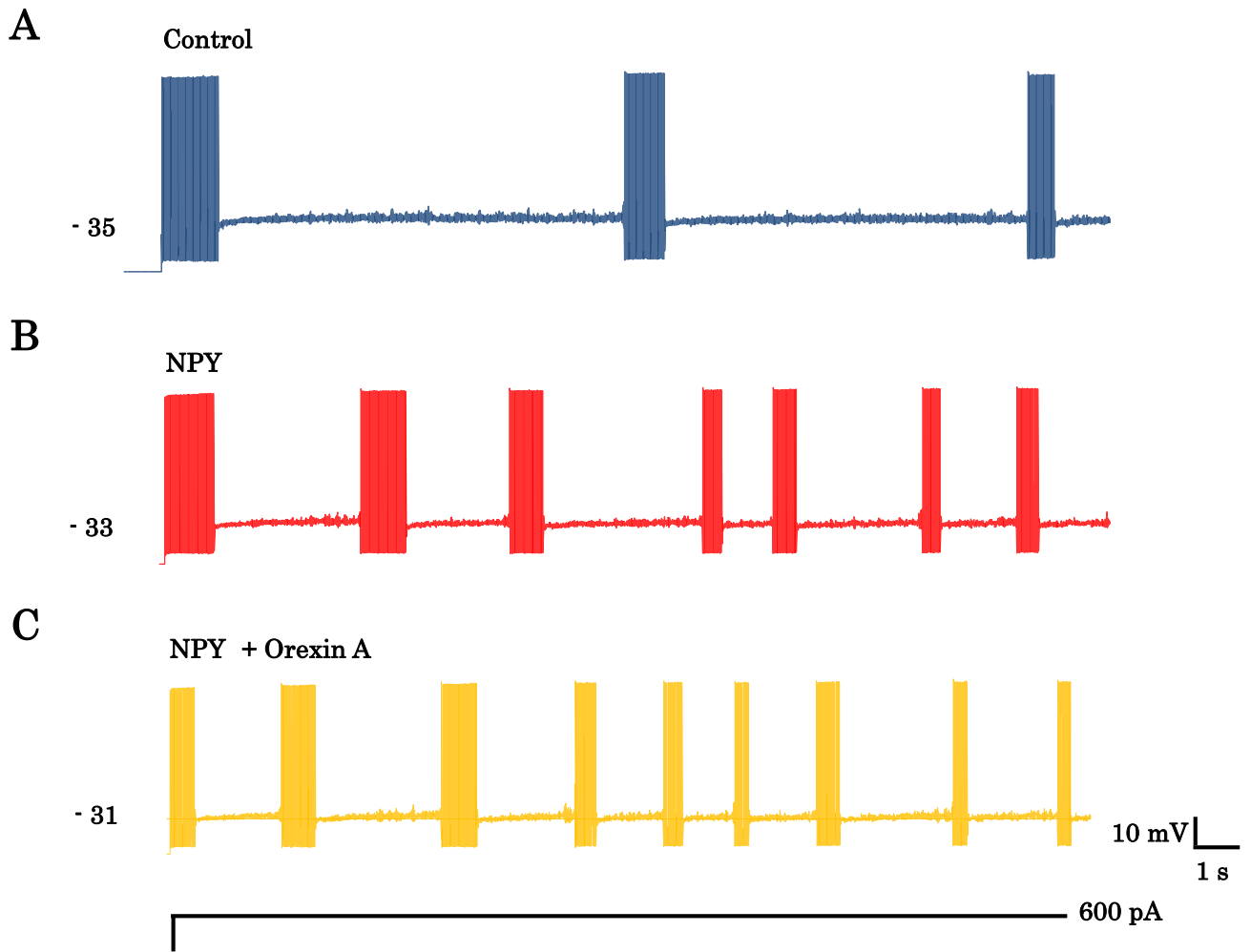


図13 NPY と Orexin 同時投与による MTN のバースト活動特性変化

A-C: P15 MTNより持続的脱分極刺激により誘発した BA の典型例を示す (A)。NPY 単独投与時 (B) と比較して Orexin-A 追加投与後 (C) バースト周波数の明らかな増大傾向を認めた。D: NPY , Orexin-A 投与前後における BA の各パラメータの平均値を示す。バースト持続時間、バースト間インターバルは NPY 単独投与後と比較し、Orexin-A 追加投与により減少傾向を示し、バースト周波数、バースト内スパイク周波数は Orexin-A を追加投与することによりさらに増加傾向を示した (n=3)。

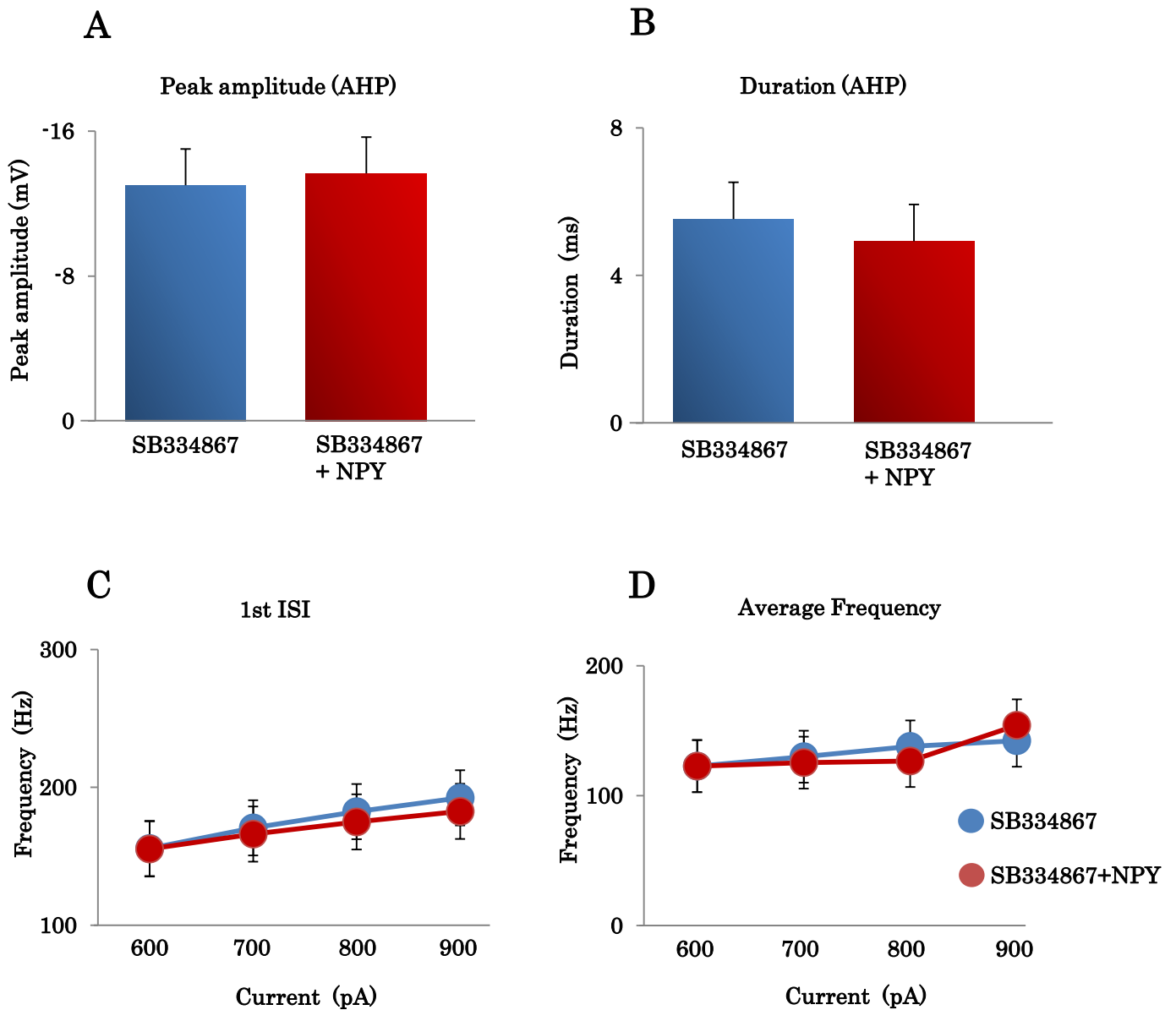


図14 Orexin-1 受容体拮抗薬前投与条件下での NPY により誘発されたスパイク発射特性変化

A, B: Orexin-1 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 投与前後の活動電位における AHP 振幅値 (A)、Duration (B) を示す。NPY 投与後、AHP 振幅値、Duration ともに有意な変化を認めなかった (n=6)。

C, D: Orexin-1 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY 投与前後の ST における 1st-ISI (C)、平均周波数 (D) を示す。Orexin-1 受容体拮抗薬前投与条件下で NPY を灌流投与しても 1st-ISI、平均周波数ともに有意な変化を認めなかった (n=6)。