



Title	三叉神経運動ニューロンにおけるオレキシンの神経修飾作用についての検討
Author(s)	樋口, 将隆
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59286
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	樋口 将隆
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 24901 号
学位授与年月日	平成23年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	三叉神経運動ニューロンにおけるオレキシンの神経修飾作用についての検討
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 姜 英男 准教授 社 浩太郎 講師 加藤 隆史

論文内容の要旨

【目的】

オレキシン(Orexin; 以下Ox)は、オーファンG蛋白質共役型受容体の内因性リガンドとして同定された神経ペプチドであり、オレキシンA(Ox-A)およびオレキシンB(Ox-B)の二つのアイソペプチドからなる。Oxは覚醒の維持に深く関与しており、近年Ox産生ニューロンの入出力系解明により、大脳辺縁系、睡眠・覚醒の制御系、摂食行動の制御系における相互の関係が明らかになってきた。摂食行動については、覚醒レベルを維持して摂食行動を促進することが示唆されている。当教室ではこれまでの研究より、脳内Ox濃度が上昇することで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促進されることを明らかにしてきた。摂食行動の発現に関わる咀嚼運動は、三叉神経運動ニューロン(TMN)によって支配されている咀嚼筋群によって遂行されるが、中枢レベルにおいて個々のTMNに対するOxの作用を詳細に検討した報告はない。そこで本研究では、TMNの活動特性が、Oxにより如何なる神経修飾作用を受けているか電気生理学的検討を行った。

【研究方法】

電気生理学的検討にはホールセルパッチクランプ法を用いた。生後2日から7日齢のSD系新生仔ラットを対象に、三叉神経運動核を含む厚さ300 μm の脳幹冠状スライス標本を作製し、赤外線透視下にてTMNを同定後、先端抵抗値3-4 M Ω 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Ox投与前後における以下の検討を行った。

研究1. Ox投与におけるTMNの膜電位および膜電流の変化

1-1: v-clamp, c-clamp記録条件下でACSFを還流し、Ox-AもしくはOx-B(100 nM)投与前後における膜電流および膜電位の変化を記録した。

1-2: TTX(1 μM)のBath内投与条件、ACSF中のNaClを塩化コリンに置換した条件、ならびに細胞外Ca²⁺

濃度(control:2.0 mM)を変化(0.1 mM, 3.5 mM)させた条件下でのOx投与時の膜電位および膜電流変化を記録した。さらにTRPチャネルの拮抗薬であるSKF96365(10 μM)をBath内投与した条件下でも同様にOx投与による膜電位および膜電流変化を記録した。

研究2. Ox投与におけるTMN活動電位特性の変化

2-1: 矩形波脱分極パルス(3 ms or 1 s)を細胞内通電して活動電位(AP)もしくは持続的発火 (spike train: ST)を誘発し、Ox投与前後でのAPならびにST特性をそれぞれ比較検討した。

2-2: *N*-methyl-D-aspartate(NMDA,50 μM), serotonin (5-HT,10 μM)をBath内投与して誘発されるバースト活動(Bursting activity: BA)に対して、Oxを投与してBA特性変化を比較検討した。

研究3. OxによるTMN活動電位特性変化における細胞内外Ca²⁺濃度変化の影響

3-1: 細胞外Ca²⁺濃度(control:2.0 mM)を変化(0.1 mM, 3.5 mM)させた条件下で、研究2-1同様にAP, STを誘発し、Ox投与前後でのAPならびにST特性変化をそれぞれ比較検討した。

3-2: 細胞内液にCa²⁺キレート剤であるBAPTA (10 mM)を加えて、Ox投与前後でのAPならびにST特性変化をそれぞれ比較検討した。

【研究結果】

研究1. Ox投与におけるTMNの膜電位および膜電流の変化

Ox投与により膜電位は脱分極変化を示した。またv-clamp条件下では内向き電流が観察された。TTX存在下でもOx投与後同様の変化が観察されたが、NaClを塩化コリンに置換した条件では脱分極変化ならびに内向き電流は減少した。さらに、細胞外Ca²⁺濃度上昇に伴い内向き電流は増大した。一方、SKF96365存在下においてOxによる脱分極および内向き電流は減少した。

研究2. Ox投与におけるTMN活動電位特性の変化

Ox投与によりAP特性のうち、後過分極(AHP)ピーク値は有意に増大した。また、ST誘発に必要な刺激電流値はOx投与後明らかに減少し、F-I curveにおいて電流の単位増加量に対する発火頻度(周波数)上昇の割合は、初期(1st-inter spike interval), 後期(steady-state)においてともに増大した。さらに、Ox投与によりNMDA+5-HTのBath内投与により誘発されるBAの発生頻度、スパイク周波数は増大し、バースト持続時間は延長した。

研究3. OxによるTMN活動電位特性変化における細胞内外Ca²⁺濃度変化の影響

細胞外Ca²⁺濃度上昇(3.5 mM)によりAHPピーク値は増大し、STにおける発火頻度減少が観察された。また、低Ca²⁺濃度(0.1 mM)条件下では、AHPの消失傾向と発火頻度の増加がみられ、Ox投与によりAHP成分に変化はみられず、発火頻度は増加した。さらにBAPTA投与条件下ではAHPは消失し、ST誘発に必要な刺激電流値はcontrol条件下と比較して増大傾向を示したが、Ox投与により低下し発火頻度は増加した。

【考察および結論】

1. TMNではOx投与により膜電位の脱分極と内向き電流が観察され、静止膜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。この内向き電流は荷電担体(キャリア)としてNa⁺, Ca²⁺が関与していると考えられた。また、TRPチャネルの拮抗薬SKF96365存在下でOx投与後の内向き電流が抑制されたことは、上記結果を支持するとともに、他のニューロンの報告例同様に、TMNにおけるOxの修飾作用発現にTRPチャネルが関与していることが示唆された。

2. Ox投与によりAPにおけるAHPピーク値は増大するとともに、ST誘発における最小刺激電流値は減少

し、ST,BAにおける発火頻度は増加した。特にAHPは、細胞外Ca²⁺濃度依存的に大きくなる傾向を示しOxによりさらに大きくなることが明らかとなり、Oxによる細胞内へのCa²⁺流入の関与が示された。一方、Oxによる発火頻度の減少が高Ca²⁺条件下で観察されたことより、Ca²⁺の細胞内流入によるAHPピーク値の増大が連続発火を抑制的に制御する可能性が示唆された。また、細胞内外Ca²⁺の濃度に関わらず、Oxによって最小刺激電流値の低下が起こっておりこの修飾発現には細胞内Ca²⁺を介した細胞内情報伝達機構が含まれない可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、三叉神経運動ニューロンにおけるオレキシンの神経修飾作用について検討したものである。本研究によってオレキシンの三叉神経運動ニューロンに対する脱分極作用が確認され、発火活動に対する促進作用が明らかにされた。さらに、この脱分極作用にはTRPチャンネルが関与することが確認された。

本研究は、今後の咀嚼運動の生理学的研究に対し有用な基礎的情報を提供するものであり、博士（歯学）の学位申請に値するものである。