



Title	三叉神経中脳路核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)	小野, 雄大
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59980
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 8 】	
氏 名	小 野 雄 大
博士の専攻分野の名称	博 士（歯学）
学 位 記 番 号	第 2 5 7 7 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 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	三叉神経中脳路核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 竹村 元秀 准教授 和田 孝一郎

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

摂食行動は、エネルギー恒常性を維持するために不可欠な生命活動の一つであり、認

知機能、情動などが複雑に組み合わさり、視床下部腹内側核と外側野の二つの中枢により高次に統合・制御されている。摂食促進ペプチドであるオレキシシン(0x)は、視床下部外側野およびその周辺に存在するニューロンより産生され、脳幹を含む中枢神経系の広範囲に投射することが明らかとなっている。当教室ではこれまでの研究より、0xの脳室内投与により摂食量の増大や咀嚼筋活動特性を含む摂食行動様式に変化がみられることや咀嚼筋活動発現に関わる三叉神経運動ニューロン (TMN) においては膜特性を変化させて興奮性を増大させることを明らかにしてきた。本研究では、口腔末梢感覚受容器からの求心性情報を統合し、運動ニューロン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)に対する0x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。

【研究方法】

実験には、生後2日から14日齢のSD系ラットを用いた。ハロタン深麻酔下で脳幹組織を摘出し、MTNを含む厚さ300 μm の冠状脳幹スライス標本を作製した。赤外線透視条件下で中脳路核を同定し、標準人工脳脊髄液(N-ACSF)灌流下で先端抵抗値3-5 $\text{M}\Omega$ の記録用電極を用いてWhole-cell記録を行った。電極内液は、グルコン酸カリウムを主成分とする標準的な内液を用いた。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。

【研究結果】

1. 0x投与におけるMTNの膜電位および膜電流の変化
MTNが0xによりいかなる修飾作用を受けるか調べるため、0x投与前後で膜電位、膜電流の変化を記録した。c-clamp条件下で0x-Aあるいは0x-B(200 nM)を投与すると可逆性の脱分極変化を認めた。また、定常状態よりv-clamp条件下で0x-Aあるいは0x-Bを灌流投与すると内向き電流が観察された。脱分極変化は細胞外 Ca^{2+} 濃度を低下させた条件(0.5 mM)ではN-ACSF条件下(2.0 mM)と比較して縮小したのに対して、細胞外高 Ca^{2+} 濃度条件(3.5 mM)では増大する傾向を認めた。また、N-ACSFにTTX(1 μM)を加え0x-Aを投与すると、TTX非存在下と同程度の脱分極変化が観察された。さらに、N-ACSF中のNaClをCholine-Clに置換したところ、脱分極変化は有意に減少した。

2. 0x投与におけるMTN活動電位特性の変化

0xによるMTN活動電位特性変化を検討する目的で、c-clamp条件下で3 msの矩形波脱分極パルスを細胞内通電して活動電位を誘発し、0x投与前後で活動電位を構成する各計測項目について比較検討した。P2-4, P12-14の二群ともに、0x-Aあるいは0x-Bを投与するとcontrol条件下と比較して、AHP振幅値の軽度増大傾向と持続時間の有意な短縮を認めた。持続時間の減少率は0x-A, BともにP2-4群と比較してP12-14群において増大した。次に細胞外 Ca^{2+} 濃度を变化させた条件下で、AP特性変化を比較検討したところ、低 Ca^{2+} 条件でAHP成分は減少する傾向がみられAHPの振幅値、持続時間は減少し、0x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。一方、細胞外高 Ca^{2+} 条件ではAHP成分は増大する傾向がみられたが、AHPの振幅値、持続時間ともに、0x投与による明らかな変化を認めなかった。

3. 0x投与におけるMTN連続発火活動特性の変化

1 sの矩形波脱分極パルスを細胞内通電して誘発される持続的発火(ST)に対する0xの修飾作用を明らかにする目的で、ST特性を0x-Aあるいは0x-B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。

また周波数-電流曲線において0x-A投与後、ST初期のスパイク周波数(1st-ISI)は全ての電流刺激条件下で有意に増大したのに対して、0x-Bではほとんど変化を認めなかった。細胞外低 Ca^{2+} 条件下ではcontrol条件下と同様に1st-ISIは上昇したが、細胞外高 Ca^{2+} 条件下ではST持続時間は有意に短縮し、0x-A投与により1st-ISIは減少した。さらに、N-ACSF中に4-AP(40 μM)を投与するとAHPは抑制され、定常状態で連続発火が誘発された。4-AP条件下で0x-Aを投与するとAHPの振幅はさらに減少し、スパイク周波数は増大した。

一方、持続的な膜の脱分極により誘発される内因性バースト活動(BA)については、0x投与により、バースト発生頻度の上昇とバースト間インターバルの短縮傾向が観察された。さらにバースト内スパイク周波数は0x-A投与後有意に上昇することが明らかとなった。

【考察および結論】

MTNでは、0x投与により膜の脱分極変化と内向き電流が誘発されて、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。また内向き電流の形成には Na^+ 、 Ca^{2+} が荷電担体として作用していることが推察された。0xによる膜興奮性の増大は、活動電位におけるAHP振幅の軽度増大と持続時間の有意な短縮を引き起こし、連続発火活動においてはスパイク周波数が増大することが明らかとなった。スパイク周波数は細胞外高 Ca^{2+} 条件下では低下し、4-AP投与条件下においても0xによる周波数上昇が観察されたことから、スパイク周波数の上昇にはAHPコンダクタンスは直接関与しておらず、周波数の変化は細胞内に流入する Ca^{2+} によるAHPの振幅増大変化と内向き電流形成による効果が相互に作用した結果として起こっている可能性が示唆された。本研究で明らかとなった0xによるMTNの神経修飾効果は、脳内0xレベルが増大した際にTMNからの運動出力を興奮性に調節し、摂食促進作用に関わっていると推察された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、一次求心性神経である三叉神経中脳路核ニューロン(MTN)に対するオレキシシン(0x)の神経修飾作用について、パッチクランプ法を用いて電気生理学的に検討を行った。

MTNでは0x投与により、 Na^+ 及び Ca^{2+} が荷電担体となる膜の脱分極反応あるいは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を増大することが明らかとなった。0x投与により、活動電位のAHP(afterhyperpolarization)振幅の軽度増大と持続時間の有意な短縮が引き起こされ、膜興奮性が増大し連続発火活動においてはスパイク周波数が増大することが明らかとなった。

本研究で明らかとなった0xによるMTNの神経修飾効果は、TMNからの運動出力を調節し、脳内0xレベルが増大した際の摂食促進作用に関わっていると推察された。

以上の結果は、三叉神経系ネットワークに対する0xの生理的意義を解明する上で重要な知見を与えるものである。

よって、博士(歯学)の学位論文として価値のあるものと認める。