

博士学位論文審査要旨

2017年7月26日

論文題目： Substance P affects exclusively on prototypic neurons in mouse globus pallidus (淡蒼球外節におけるニューロンタイプに依存したサブスタンス P 応答)

学位申請者： 水谷 和子

審査委員：

主査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 坂場 武史

副査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

要 旨：

大脳基底核神経回路においては、線条体から淡蒼球内節および黒質網様部へと投射する直接路と、淡蒼球外節や視床下核を経て淡蒼球内節および黒質網様部に至る間接路の2つがあり、両者が拮抗するというのが古典的なモデルである。このうち、淡蒼球外節は間接路に位置し、線条体間接路細胞からの投射を主に受けるものと考えられてきた。一方で申請者の所属する研究室等により線条体直接路細胞が間接路にある淡蒼球外節に側枝を投射することが形態学的に明らかにされているが、機能的な意義は未解明なままであった。本研究はこの点に関して形態学的な手法と生理学的な手法を組み合わせで検討したものである。

線条体直接路神経細胞はサブスタンス P を含有しており、細胞から放出されたサブスタンス P が他の神経細胞に作用することで遅いシグナル伝達をおこなっている可能性がある。この点に注目し、申請者はどの神経細胞群がサブスタンス P 受容体を発現するかを免疫染色法で検討したところ、いわゆる Prototypic タイプに分類される細胞群に特異的に発現していることが明らかになった。また、サブスタンス P 受容体を発現する細胞は主に視床下核へ投射していることが逆行性トレーサー染色法から明らかになった。加えて、電気生理学的な実験からは Prototypic タイプに分類される神経細胞においてサブスタンス P が興奮性作用を及ぼし、活動電位発火を促進することが明らかになった。これらの研究の一部は神経科学専門誌である *Brain structure and function* 誌に2017年に受理され、online で掲載された。

本研究は、形態学と生理学の諸技術を駆使して、着実な解析をおこなっている。また、機能生物学の観点からは、これまで比較的並列であると考えられてきた大脳基底核直接路と間接路経路が相互作用をすること、特にペプチド伝達物質の拡散によって間接路経路の特定の神経細胞群を広域に調節する可能性を示唆するという点で十分な新規性があると判断され、今後の着実な研究の積み重ねによって大脳基底核回路の新たな捉え方につながる学術的に意義のあるものである。よって、本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2017年7月26日

論文題目： Substance P affects exclusively on prototypic neurons in mouse globus pallidus (淡蒼球外節におけるニューロンタイプに依存したサブスタンス P 応答)

学位申請者： 水谷 和子

審査委員：

主査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 坂場 武史

副査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 同志社大学大学院脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

要 旨：

博士論文提出者は2012年4月に本学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻一貫制博士課程に入学し、現在在籍中である。この間、藤山文乃教授のもとで形態学、生理学的な技法などに習熟し、神経科学特に大脳基底核の機能解剖学的研究に従事してきた。本博士論文の内容の一部は2017年に Brain structure and function 誌に筆頭著者として論文掲載された。

2017年7月26日午後1時半より1時間にわたり提出論文に関して審査会をおこない、提出者による英語によるプレゼンテーションと質疑応答をおこなった。プレゼンテーションでは研究の目的、方法、結果、考察が適切に述べられており、質疑応答からも提出者が研究内容への理解を有していると判断した。

その後、審査委員による論文内容および神経科学に関する非公開の口頭試問をおこなったが、本論文提出者は本学大学院博士課程修了に足りる学力と、博士課程修了者として十分な語学力(英語)を有していると判断した。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目 : Substance P affects exclusively on prototypic neurons in mouse globus pallidus

淡蒼球外節におけるニューロンタイプに依存したサブスタンス P 応答

氏 名 : 水谷 和子

要 旨 :

淡蒼球外節は脳基底核における間接路の中継核である。近年、淡蒼球外節の神経細胞が、投射パターンと分子発現によって二つのグループに分類された。Prototypicタイプの細胞はparvalbumin (PV)とLim-homeobox 6 (Lhx6)の両方または一方を発現し、視床下核と線条体へ投射する。もう一つのArky pallidalタイプは、Forkhead box protein P2 (FoxP2)を発現し線条体のみに投射するという特徴がある (Bevan et al. 1998; Smith et al. 1998; Bevan et al. 2002; Kita 2007; Stephenson-Jones et al. 2011; Mallet et al. 2012; Abdi et al. 2015; Fujiyama et al. 2015; Hernandez et al. 2015)。

線条体から淡蒼球外節への抑制性入力、古典的な脳基底核モデルでは間接路細胞が行うとされていたが (Alexander and Crutcher 1990; DeLong 1990)、その後先行研究によって、ほぼ全ての線条体直接路細胞も淡蒼球外節に軸索側枝を投射することが明らかにされていた (Kawaguchi et al. 1990; Lévesque and Parent 2005; Fujiyama et al. 2011)。

Substance P (SP) は線条体直接路細胞が保有する神経ペプチドである (Mantyh et al. 1984; Aosaki and Kawaguchi 1996; Shughrue et al. 1996)。線条体内においてSPは、neurokinin-1 receptor (NK-1R) に好んで結合することが知られていた (Aosaki and Kawaguchi 1996; Lee et al. 1997)。SPは脳基底核の他の神経核へも、直接路細胞の投射を通じて影響を与える可能性が存在する。形態学を用いた先行研究では、いくつかの動物種で淡蒼球外節におけるNK-1Rの発現が示されていた (Mantyh et al. 1984; Elde et al. 1990; Gerfen 1991; Nakaya et al. 1994; Shughrue et al. 1996; Mileusnic et al. 1999; Mounir and Parent 2002; Furuta et al. 2004)。しかし、NK-1Rを発現する細胞の数については研究グループや動物種によって様々な見解があった。さらにSPが淡蒼球外節へ与える影響についてはその詳細は明らかにされていなかった。そこで、私たちはマウスを用いて淡蒼球外節のどのタイプの神経細胞がどのようにSPの影響を受けるのかを本研究の目的とした。

はじめに、免疫蛍光染色を用いて淡蒼球外節のNK-1R発現細胞の形態学的性質を調べた。その結果、淡蒼球外節で多くのNK-1R免疫陽性細胞が観察された。一つは大型の細胞でNK-1Rを強く発現しており、同時にcholine acetyltransferase (ChAT)に対して免疫反応を示すタイプであった。このChAT-NK-1R共発現細胞は淡蒼球外節細胞全体の内、0.17-1.97%という少ない細胞数に過ぎなかった。もう一つは弱いNK-1R免疫陽性を示すタイプで、比較的多い細胞数が観察された (38.9%)。本研究はこの二番目のタイプのNK-1R細胞に焦点を当てた。淡蒼球外節のNK-1R細胞がPrototypicとArky pallidalのどちらのタイプであるかを調べるために、まず二重あるいは三重免疫蛍光染色を行った。弱いNK-1R免疫陽性を示す細胞は高い確率でPV (67.0%)またはLhx6 (82.2%)を共発現したが、Arky pallidalタイプ細胞に発現するFoxP2をほとんど共発現しなかった(1.7%)。

二つ目に、NK-1R細胞の投射パターンを調べるために、蛍光色素標識した逆行性神経トレーサーを視床下核または線条体へ注入した。この結果、67.1%の淡蒼球外節から視床下核へ投射する細胞がNK-1Rを発現し、ほぼ全ての淡蒼球外節から視床下核へ投射する細胞がFoxP2を発現しない(0.34%)ことが示された。一方、線条体へ投射する淡蒼球外節細胞のNK-1R発現は少なく、25.9%

であった。NK-1Rを発現する淡蒼球外節から線条体へ投射する細胞は、高い確率でLhx6に対して免疫陽性を示した(75.3%)。また41.7%がFoxP2を発現したが、この細胞群はNK-1Rを共発現しなかった(0.6%)。

次に、SPが淡蒼球外節細胞のどのタイプにどのような影響を与えるかを調べるために、淡蒼球外節細胞からin vitroでwhole-cell記録を行った。その結果、SPの投与が48個の淡蒼球外節細胞の内、21個に内向きの電流を引き起こした。この反応は、NK-1Rの阻害剤をバスの細胞外溶液中へ投与すると阻害された。Current clampモードで記録をとると、SPは淡蒼球外節細胞に活動電位を誘発した。この結果を踏まえ、SPに反応する淡蒼球外節の細胞群が特徴的な電気生理学的性質を持つかどうかを検証するために、クラスター解析を行った。

細胞発火に関する4個の性質を定量化し、これらをパラメータにしてクラスター解析を行ったところ、記録を行った92個の淡蒼球外節細胞は3つの異なったタイプ(CL1, CL2, CL3)に分類された。興味深いことに、SPに反応を示した淡蒼球外節細胞はCL2とCL3に認められたが、CL1には全く存在しなかった。

さらに、これらのクラスターの膜の性質と、免疫組織化学的な同定により、CL1とCL2/3がそれぞれArky pallidalタイプとPrototypicタイプに相当することが示唆された。したがって、形態学的また電気生理学的な結果から、SPに反応する細胞群がPrototypicタイプの細胞に含まれることがわかった。

先行研究から、線条体投射細胞が淡蒼球外節細胞にSPを供給している可能性は高く、本研究の結果と合わせると、線条体直接路細胞が淡蒼球外節のPrototypic細胞に発現するNK-1Rを介して間接路に影響を及ぼしている可能性があると考えられる。