

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 444 号	学位申請者	古川 みなみ
審査委員	主査	後藤 哲哉	学位
	副査	山崎 要一	副査
	副査	齋藤 充	副査
			博士 (歯学)
			杉村 光隆
			八木 孝和

主査および副査の5名は、平成29年11月13日、学位申請者 古川 みなみ 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) なぜ雄性動物を使用したのか。

(回答) ヒトでは一般的に女性よりも男性で発達障害の頻度が高いことから、雄性動物を用いた。

質問2) なぜ海馬をターゲットにしたのか。

(回答) ヒトでは、育児放棄された子供や精神疾患患者の脳で海馬の萎縮がみられており、また、ストレスがヒトと動物実験の両方で学習と記憶のパフォーマンスを低下させることが実証されており、海馬がストレスに脆弱であることから、解析対象を海馬に絞った。

質問3) なぜ母子分離を1日3時間、21日間にしたのか。

(回答) マウスを用いた幼少期ストレスの脳に関する研究論文では1日3時間、14日間というプロトコールが多く用いられているが、正常のマウスの海馬では生後14日にGABAスイッチが起こると報告されていること、母子分離によるGABAスイッチの遅延が想定されたことから分離期間を21日へ延長した。

質問4) 21日間と長期間の母子分離を行っているが、母子分離時期を前後半に分けて実験をするとどのような結果が得られると考えられるか。

(回答) 生後14日間や生後4~6日間の母子分離で樹状突起の減少や行動異常などのストレスの影響を受ける報告があることから、前半の方がストレスの影響を受けやすい可能性があり、母子分離時期を前後半に分けて実験を行うと前半の方が後半に比べてストレスの影響が大きく出る可能性があると考えられる。

質問5) 攻撃行動試験において、Cu群の動物は刺激に対しほとんど反応していないが、この結果は妥当か。

(回答) 過去の報告でも正常の動物はほとんど反応を示しておらず、妥当な結果であると考えている。

質問6) MS群の5匹とも実際に細胞膜でのKCC2の発現が下がっているのか。

(回答) KCC2膜発現量の平均値間に有意差が認められた全ての時期及び海馬の領域について、MS群の5匹すべてがCu群の最低値と比較してKCC2の膜発現は低かった。

質問7) なぜ生下時にGABAは興奮性に作用するのか。

(回答) 発達期における神経回路の構築には、興奮性の神経細胞が重要な役割を担っていることが知られているが、興奮性のAMPA型グルタミン酸受容体は幼若な時期に発達していないため、GABAが代償的に興奮性に作用していると考えられている。

質問8) 今回の実験で海馬を3領域に分けて調べたのはなぜか。

(回答) 3領域に分けて調べた研究は少ない。しかし、DGは顆粒細胞、CA1およびCA3は錐体細胞によって主に構成されていること、嗅内野皮質等との間の入出力や海馬内の線維連絡の様式が異なること等、領域間で構造および機能に明確な差異があることから、区別して解析する必要があると考えた。

最終試験の結果の要旨

質問 9) KCC2 の膜発現について海馬体の 3 領域で違いが生じたのはなぜか。

(回答) 生後 7 日及び 35 日の DG では Cbl 群と MS 群の KCC2 の発現に有意差がなく、他の領域においては有意差を認め、このような違いが生じた理由として、成体マウスにゾンデストレスを負荷した研究で CA1 や CA3 で KCC2 の減少を認め、DG では変化がなかった報告から、DG は 3 領域の中でストレスの影響を受けにくく、DG は神経細胞の新生がよく起こる部分であり、Cbl 群でも新しい神経細胞が生じて KCC2 が少なくなり、MS 群と差が出にくかったことが考えられる。

質問 10) 急性単離 CA3 細胞における Ca^{2+} イメージング実験でピククリンを使用したのはなぜか。

(回答) $GABA_A$ 受容体チャネルに選択的な拮抗薬であるピククリン存在下ではムシモールに対する細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が消失したことから、この反応が $GABA_A$ 受容体チャネルを介したものであることを確認した。

質問 11) 19 時 30 分から 22 時 30 分の暗期に母子分離を行っているが、授乳に影響していないのか。また、体重や脳の大きさの評価はしているのか。

(回答) 生後 21 日において Cbl 群と MS 群の体重の間に有意差はなく、摘出脳の大きさにも明らかな差はみられなかったことから、授乳には有意な影響がなく栄養状態に問題はないと考えられる。

質問 12) KCC2 の細胞膜での発現率はどのように評価したのか。

(回答) 画像を二値化し、神経の細胞体・樹状突起を染色できる抗 MAP2 抗体のシグナルを参考にし、細胞膜上の陽性領域を測定した。

質問 13) 母子分離終了後 2 週経過した生後 35 日でも KCC2 膜発現について MS 群と Cbl 群間に有意差がある一方で、急性単離 CA3 細胞における Ca^{2+} イメージング実験の結果は、MS 群でも生後 15 日には GABA スイッチを完了していることを示している。どのように解釈しているか。

(回答) 生後 15 日には MS 群の細胞でも Cl^- の平衡電位が静止膜電位より過分極側へシフトしたが、生後 35 日でも KCC2 の膜発現が Cbl 群に比して低いことから、MS 群の細胞における Cl^- の平衡電位は Cbl 群よりも脱分極側にあると考えている。

質問 14) 研究背景の中で育児放棄を受けた幼児の海馬萎縮に言及している。萎縮というと細胞数の減少が考えられるが、本研究では海馬の細胞数について解析したか。

(回答) 精神疾患でみられるような海馬の萎縮は、細胞数の減少よりもむしろ軸索の発達不全に因ると言われているが、本研究ではその点を検証していない。今後の課題としたい。

質問 15) GABA スイッチをもたらしているものは何か。

(回答) $GABA_A$ 受容体チャネルを介する Cl^- 電流が外向きから内向きへと変化することが GABA スイッチである。これは細胞内 Cl^- 濃度に依存しており、それを決めているのが主に、 Cl^- を細胞へ汲み入れる NKCC1 と間質へ汲み出す KCC2 の活性のバランスである。

質問 16) 母子分離の際に新生仔を 1 匹ずつ分けているが、分けずに実験するとどうなるのか。

(回答) 本研究の母子分離は、純粋な母子間の分離ではなく、1 匹ずつにされた孤独感、環境変化など様々な要因を含めた複合的なストレスであると考えている。新生仔を 1 匹ずつ分けずに実験すると、本研究でみられた両群間の差が縮小することが想定される。

質問 17) GABA スイッチの遅れということはその後、正常に戻るように思えるが、母子分離終了後 2 週経過した時点でも KCC2 の膜発現は有意に低値である。どう考えるか。

(回答) Cbl 群に比して数日遅れているものの、MS 群でも GABA スイッチは起きている。母子分離終了後、KCC2 膜発現の低値や行動異常が認められることから、GABA スイッチの遅れは単なる成熟の遅れではなく、脳機能に不可逆的な変化も起きていると考えられる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。