

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 473 号	学位申請者	生駒 葉子
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	浅川 明敏	副査 奥野 浩行
	副査	田川 義晃	副査 栗原 崇

主査および副査の5名は、平成30年7月19日、学位申請者 生駒 葉子 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) ストレスを与えた時に、縫線核での活性や光で抑制がかかったことの検討を pERK で見ていたが、他にもマーカーがある中、これを選んだ理由は何でしょうか？

(回答) 他のマーカーの1つである、c-Fos での検討を試みたが、intruder ストレスによる延髄縫線核での発現があまり見られなかったこと、ストレス刺激自体が3分間と短いので、時間分解能が高い pERK を用いました。

質問2) 冒頭に、ストレスが縫線核に影響を与えてストレスを抑制するとの説明がありましたがどういうことでしょうか？

(回答) ストレス下で延髄縫線核に存在するセロトニン神経を含むすべての神経を薬理的に抑制すると、ストレスによって誘発された頻脈や体温増加反応の減弱がみられたということです。

質問3) 延髄縫線核にはセロトニン、グルタミン酸、GABA 作動性の神経細胞があり、今回はセロトニン神経細胞を特異的に抑制した効果のみとすることで、セロトニン細胞の抑制が延髄縫線核内の局所のつながりを介して他のグルタミン酸、GABA 作動性の神経細胞の活動に影響を与えた可能性はないですか？

(回答) セロトニン、グルタミン酸、GABA 作動性の神経細胞は独立の神経回路として働くと考え、今回はセロトニン細胞の特異的な機能を明らかにできたと考えていますが、他のグルタミン酸、GABA 作動性の神経細胞の活動に影響を与えた可能性も少なからず考えられます。

質問4) 縫線核のセロトニンは、ストレスを感知した時に呼吸や心拍へのスイッチであると考えているのか、単なる経路の途中であるのでしょうか？

(回答) 安静時に延髄縫線核のセロトニンを抑制しても変化がなかったことから、ストレスがある状態の時に働くものであると考えられます。

質問5) 野生型マウスをコントロールとして用いていましたが、tet 系のマウスで Dox を使って発現を落としたマウスを用いてもよかったですのではないかと思います。野生型マウスを使った理由は何でしょうか？

(回答) 実験時に、Tph-tTA マウスや tetO-ArchT マウスがいなかったため用いることが出来ませんでした。光照射による非特異的影響を検討するためには、光受容タンパク質を発現していない野生型マウスを用いることで十分であると考えたためです。

質問6) Intruder stress で、マウスをどのようにケージに入れましたか？また、コントロールはどのようにしましたか？

(回答) 実験マウスには光ファイバーやケーブルがつながっている状態で、直接侵入マウスをケージ内へ入れることが不可能なため、視覚的、嗅覚的なストレスを与えるために、透明な容器に穴をあけ、その中に侵入マウスを入れたものを、実験者が手でケージ内へ入れました。コントロールでは、空の容器をケージ内へ入れました。

質問7) リカバリーの時間は具体的にどのくらいとりましたか？

(回答) 基本的には、記録しているすべてのパラメーターが安静状態になるまで約1時間以上とりましたが、個体によって長時間待つこともありましたが。

質問8) 光照射が吻側延髄縫線核のセロトニン神経だけに当たっている確信はありますか？吻側以外のセロトニン神経に当たっている可能性はありますか？

(回答) 実験で用いたマウスはすべて光ファイバーの場所を確認していますが、例えば、吻側と尾側とを分けた場所(ブレンダマから-6.4mm) 付近にファイバーが留置されていた個体では、光ファイバーの直径が 200 μm あるために、吻側だけではなく、尾側のセロトニン神経の一部も一緒に光抑制されている可能性が考えられます。

質問9) Intruder stress test で光照射を4分間した理由は何でしょうか？

(回答) セロトニン神経を抑制した状態でストレスを与え、ストレス後も光照射によるセロトニン神経の抑制状態を保つために、ストレス前30秒間と、ストレスを与えた3分間、ストレス後の60秒間の合計270秒間の光照射を与えました。

質問10) Result で体温と行動量に影響しないとありますが、もし、n数を増やすと有意差が出る可能性はあると思いますか？

(回答) 今回の実験で19匹という多めのマウスを用いているので、体温と行動量に関しては、可能性はあまりないと思われます。

質問11) (質問10に関連して) 体温に関して、統計の時間幅を変えることで、有意差が出ることはあるのでしょうか？

(回答) 今回は、光照射中の影響をみるための0-4分と、反応が現れるのが他のパラメーターに比べ遅れて現れる体温の変化を検討するためと、光照射後の影響をみるためという2つ理由から4-20分という時間幅を設定し統計を行いました。もし、4-20分ではなく、もっと細かい時間幅を設定すると、有意差が出る可能性はあると思われます。

最終試験の結果の要旨

質問 1 2) 今回 2 つのストレスを用いていますが、何か理由はあるのでしょうか？拘束ストレスなどは用いなかったのでしょうか？

(回答) 今回用いた 2 種類のストレスですが、情動的なストレスとして intruder ストレスを、もう一つは、地震を模倣した振動ストレスとして cage drop ストレスを用いました。オプトジェネティクスの実験では、マウスに光ケーブルがつながっている状態であり、拘束ストレスを用いることはできませんでした。

質問 1 3) 尾側延髄縫線核でも pERK の活性はみられましたか？

(回答) 尾側延髄縫線核でもストレスによる pERK の発現はみられました。

質問 1 4) 吻側延髄縫線核をターゲットにしたと思われませんが、尾側延髄縫線核の方にどのくらいの漏れがあると思われませんか？吻側延髄縫線核と尾側延髄縫線核はどのくらい離れていますか？

(回答) 吻側延髄縫線核はブレグマから -5.5 ~ -6.4mm、尾側延髄縫線核はブレグマから -6.5 ~ -7.5mm に設定しましたので、例えば、直径 200 μ m の光ファイバーの中心がブレグマから -6.4mm に留置されると、ブレグマから -6.3 ~ -6.5mm の領域を照射するので、この場合は吻側延髄縫線核のセロトニン神経のみを照射したとは言い難く、一緒に尾側延髄縫線核のセロトニン神経も照射されている可能性があります。

質問 1 5) Cage drop ストレスでも縫線核での pERK の発現はみえましたか？

(回答) 今回は、intruder ストレスのみでの検討を行いました。ご指摘のとおり、ストレスの種類を問わない一般化をするためには必要だったと思います。しかし、生理パラメーターの測定結果は 2 種のストレスで同様だったので、一般化可能ではないかと考えています。

質問 1 6) 吻側延髄縫線核 Tph-positive neuron 中の 50% くらいが intruder ストレスで pERK-positive になったと思いますが、なぜ 50% になるのでしょうか？

(回答) 延髄縫線核のセロトニン神経は様々な役割を分担していて、全てのセロトニン神経が intruder ストレスに反応するわけではないと思われそうです。しかしながら、ストレスの強度や種類を変えればもっと活性化する可能性も否定はできません。

質問 1 7) 延髄縫線核セロトニン神経細胞を basal でチャンネルロドプシンを用いて特異的に活性化すると脈が上がったり、呼吸数が増加したりするのでしょうか。もしくは、ストレスと組み合わせさせた時のみ調節するので、basal では効かないのでしょうか？

(回答) 予備の実験において、セロトニン神経特異的にチャンネルロドプシンを発現したマウスを用いて、心拍数、体温、活動量が basal 状態になった時に、パルス照射によりセロトニンを活性化すると、心拍数の増加がみられ、体温と活動量には変化が見られませんでしたので、少なくとも心拍数に関しては直接的にコントロールしている可能性が高いと考えられます。

質問 1 8) ストレス誘発性の生理反応(心拍数増加や体温上昇など)に関与している 5-HT 受容体はこれまでの先行研究でどういふことが言われていますか？

(回答) これまでの研究で、5-HT_{1A} 受容体を作動薬で活性化させると、セロトニン神経は抑制され、それに伴ってストレス下での心拍数増加や体温上昇の減弱がみられるとの報告があります。

質問 1 9) ストレス誘発性の心拍数、および呼吸数の増加に、延髄縫線核セロトニン作動性神経はどのように関与すると推測されていますか？

(回答) 心機能調節は、延髄縫線核セロトニン神経が脊髄へ投射し、そこから心臓交感神経への経路が考えられ、また、呼吸機能調節は、延髄縫線核セロトニン神経から下部脳幹にある呼吸中枢の preBötzinger complex への経路が考えられます。それぞれの経路の活性化が抑制されることで、心機能の抑制や呼吸数の抑制が起こると考えられます。

質問 2 0) セロトニン作動性神経に含まれることが知られるセロトニン以外の神経伝達物質が重要である可能性はありますか？

(回答) セロトニンと共存する神経伝達物質には、グルタミン酸、サブスタンス P、サイロトロピン放出ホルモン、エンケファリン、ATP などがありますが、これらもセロトニン神経活動を調節している可能性も少なからず考えられます。

質問 2 1) ArchT の発現量のコントロールはしましたか？

(回答) 交配によって自然に ArchT が発現された動物を使っていますので、特にコントロールは行っていません。

質問 2 2) ArchT を発現させたマウスが正常であるかどうかのコントロール実験は行いましたか？論文では WT マウスと Tph2:ArchT マウスの baseline において有意な違いがみられないということですが、ストレスによる反応性をみると、心拍数や体温に違いがあるように見られますが、どのように考察しますか？

(回答) 検定では差がみられないものの、僅かながら Tph2:ArchT マウスの方がストレスによる反応性が低い印象はみられました。

質問 2 3) 今回は pERK を用いていますが、電気的活動やセロトニン放出などを検討することで照射によるセロトニン作動性神経抑制の確認を行いましたか？

(回答) 電気的活動などの検討は自身では行っていませんが、マウス提供元にて、照射によるセロトニン神経活動抑制をスライスパッチクランプ法で確認してあります。

質問 2 4) 照射をどのくらいすれば十分であるかの予備実験は行いましたか、また 2 つのストレス刺激での照射の時間が異なる理由は何でしょうか？

(回答) 予備実験は行っていません。2 つのストレス刺激への照射は、刺激前 30 秒間、刺激後 60 秒間と、共通した時間を設けました。cage drop ストレスに比べて intruder ストレスでは、3 分間の侵入時間があるために、その時間分の照射時間が加わり、長くなりました。

質問 2 5) co-transmitter の中でもセロトニンの効果のみをみているという根拠として、セロトニン神経細胞でのサブスタンス P など他の神経伝達物質の発現を比べたりしましたか？

(回答) 今回は検討を行っていませんので、セロトニンだけの効果であり、他の共存伝達物質が全く関わっていないとは必ずしも言い切れません。

質問 2 6) 実際のどのくらいセロトニンの分泌量が減ったかはわかりますか？

(回答) 今回は、検討を行っていませんのでわかりませんが、マイクロダイアリススなどを用いて、照射によりセロトニン神経を抑制した時の、セロトニンの放出を測定することで、分泌量が検討できると考えます。

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(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。