

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 615 号	学位申請者	山内 優
審査委員	主査	武田 泰生	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	奥野 浩行	副査 田川 義晃
	副査	桑木 共之	副査 浅川 明弘
<p>主査および副査の5名は、令和3年6月4日、学位申請者 山内 優 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。</p> <p>質問1) in vitro では PACAP はグリコーゲン分解を引き起こすという報告だったが、in vivo においては PACAP はグリコーゲン分解には関わっていないという結果だった。その差はどのように理解しているか。 (回答) in vivo において、PACAP (-/-) マウスでもグリコーゲン分解が起こる原因として、他の神経伝達物質が関わっている可能性を考えている。例えば、in vitro において、ノルアドレナリンの EC50 は高くても最大活性は高い事を確認しているため、ノルアドレナリンがそのひとつの候補である可能性を考えている。</p> <p>質問2) グリコーゲンが分解される量に対して、生成される乳酸の量が少ないように思えるが、そこはどのように理解しているか。 (回答) 乳酸の基礎生成量は高いので、乳酸の増加量が見かけ上僅かであるように見える可能性がある。</p> <p>質問3) PACAP (-/-) マウスや PACAP アンタゴニストを投与されたマウスは記憶に障害が出るというのは、乳酸の産生と分泌の障害で全てが説明できると考えているのか。 (回答) 上記の件において、記憶の障害が乳酸の産生と分泌の障害によって全てが説明ができるとは考えていない。今後、PACAP (-/-) マウスや PACAP アンタゴニストを投与したマウスに乳酸を投与し、記憶が回復するかを検討する必要があると考えている。</p> <p>質問4) アストロサイトで産出、分泌された乳酸が恐怖記憶に関わっていることを直接的に示す実験はどのようなものがあるか。 (回答) アストロサイト特異的 PAC1 (-/-) マウスにおける記憶障害を評価するとともに同マウスに乳酸を投与し、障害された記憶が回復するかを確認する実験。</p> <p>質問5) グリコーゲン量と乳酸量の絶対量はどれくらいか。 (回答) グリコーゲン量は約 700 ng/mg protein、乳酸含有量は約 2700 ng/mg protein である。</p> <p>質問6) PACAP は、恐怖記憶などのネガティブな記憶だけでなく、ニュートラルな記憶、またはポジティブな記憶に関与するか否か。 (回答) 作業記憶を評価する Y 字迷路試験において、PACAP (-/-) マウスは作業記憶が有意に減少したという報告がある。また情動行動を評価するオープンフィールド試験において、PACAP (-/-) マウスは、新規環境あるいは新規刺激に対する馴れや適応に異常があり、新規環境刺激に対してジャンプ行動という異常反応を示すこと、そして通常の不安レベルが低下していることが報告されていることから、恐怖記憶だけでなく他の記憶にも関与していると推測される。</p> <p>質問7) PACAP を産生している脳内の領域はどこか。 (回答) 特に背側海馬にはほとんど PACAP 発現細胞が存在しないので、海馬外から入力していると考えられる。最近、我々の研究室では PACAP-Cre マウスの海馬に逆行性に輸送され、Cre 依存的に mCherry を発現するアデノ随伴ウイルスを投与すると、嗅内野が標識されたが、内側前頭前皮質、扁桃核は標識されなかったことから、少なくとも嗅内野の PACAP が海馬に入力しているものと考えている。</p> <p>質問8) in vitro において、PACAP アンタゴニストはアストロサイトからの乳酸の分泌を阻害するか。 (回答) PACAP のアンタゴニストによる乳酸分泌抑制効果は確認していないが、少なくともグリコーゲン分解を阻害することは確認している。</p> <p>質問9) ニューロンはアストロサイトからの乳酸を、補助的なエネルギー源として受け取っているのか。 (回答) 我々はアストロサイトからの乳酸はニューロンの主なエネルギー源だと考えている。その理由は、ニューロン内でグルコースはグルコース 6リン酸からペントースリン酸回路 (PPP) に流れ、主に活性酸素を除去する抗酸化物質の生成に寄与する、あるいは、ショウジョウバエにおいて、アストロサイトの解糖系を阻害すると、広範囲なニューロンの細胞死が惹起されることが報告されているからである。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 1 0) アストロサイトニューロン乳酸シャトル (ANLS) は、恐怖記憶だけに関与しているのか。

(回答) 作業記憶、薬物記憶に関連する行動試験施行時に、グリコーゲン分解酵素阻害剤やモノカルボン酸トランスポーターの阻害剤を使用し ANLS を阻害すると、それぞれの記憶に障害が見られ、乳酸の投与によりこれらの記憶が回復したという報告があることから、恐怖記憶だけでなく作業記憶や薬物記憶にも関与するものと推定される。

質問 1 1) PACAP は発生学的に何を起源とするのか。

(回答) PACAP は少なくとも原索動物であるホヤにもすでに存在し、PACAP/グルカゴンスーパーファミリーの中で最も古くから保存されているのが PACAP とグルカゴンである。これまでの証拠から、このスーパーファミリーは、PACAP 祖先遺伝子の重複から始まり、その後、脊椎動物におけるいくつかの遺伝子重複とともに分岐を続けたことが示唆されている。

質問 1 2) PAC1 (-/-) マウスと PACAP (-/-) マウスでは、記憶学習についての違いはあるか。

(回答) 恐怖条件付け試験において PAC1 (-/-) マウスも記憶に障害が見られたという報告があることから、記憶に関して両者に大きな違いはないと考えている。

質問 1 3) *in vitro* において培養アストロサイトに PACAP を曝露し乳酸量を測定した際、PACAP の使用量が多いように見えるが、その理由は何なのか。

(回答) 乳酸の基礎生成量は高いので、変化を観察するにはある程度の PACAP の量が必要となる。よって、10nM または 100nM の PACAP を使用した。

質問 1 4) 海馬と扁桃体のアストロサイトにおいて、*in situ* hybridization (ISH) と免疫組織化学染色 (ICH) を行い PAC1 の発現を確認したということだが、そのときのアストロサイトの数の検討を行ったか。

(回答) 正常マウスにおいて上記の発現を確認した際のアストロサイトの数は確認していない。

質問 1 5) 海馬において PAC1 はどのような役割を担っているのか。

(回答) 海馬において、PAC1 はアストロサイトとニューロンどちらにも発現が確認されているが、我々の最近の解析で、アストロサイトにはニューロンの約 8 倍の PAC1 が発現していることが確認された。よって、PACAP-PAC1 シグナルは主に乳酸分泌を含むアストロサイト機能制御に関与すると推察される。ニューロンに直接作用する PAC1 の作用は現在明らかになっていない。

質問 1 6) PACAP (-/-) マウスや、PACAP アンタゴニストを投与したマウスなどに記憶に障害が見られた後、乳酸を直接投与して記憶が回復するという報告はあるか。

(回答) ラットにおいて ANLS を阻害することによって障害が見られた作業記憶、長期記憶、薬物依存は、乳酸の追加投与によりすべて記憶が回復したという報告がある。

質問 1 7) PACAP が関与してアストロサイトで乳酸が産生、分泌することが、恐怖記憶に関与すること以外の報告はあるか。

(回答) 我々はこれまでにアストロサイトの PACAP/PAC1 シグナルの下流において、PKC を介して乳酸の産生、分泌を経た ANLS の活性化を惹起し、脊髄痛覚伝達に関与することを報告していることから、種々の神経可塑性を伴うイベントへの PACAP/PAC1 シグナルの関与が推測される。

質問 1 8) PACAP が ANLS を通じて記憶を制御するという直接的な実験方法は何か。

(回答) PACAP (-/-) マウス、または PACAP アンタゴニストを投与したマウスに乳酸を投与し、障害された記憶が回復するかどうかを確認するという実験方法。

質問 1 9) *in vivo* の実験でグリコーゲン量を測定しているが、それはどこのグリコーゲン量か。

(回答) グリコーゲンはアストロサイトのみが存在することが報告されており、アストロサイト内のグリコーゲン量を測定している。

質問 2 0) 受動回避学習試験の結果において、PACAP (+/+) と vehicle を投与したマウスの恐怖記憶の結果を比較すると、結果にばらつきがあるのはなぜか。

(回答) 両者の結果にばらつきがあるのは、vehicle を投与したマウスは脳室内投与の手術、処置、カテーテル措置の影響があると考えられる。

質問 2 1) グリコーゲン分解の際、グリコーゲン量だけでなく、グルコースの量は測定していないのか。

(回答) 組織中のグルコース含量も測定しており、グリコーゲンと同様に記憶の獲得に伴って、内側前頭前皮質、扁桃体、海馬での減少が観察された。

質問 2 2) 受動回避学習試験において、記憶の獲得時と想起時におけるコントロール群はどのような実験を行っているのか。また、コントロール群から脳部位を回収するタイミングはどうなっているか。

(回答) コントロール群には何の実験も起こっていない。また、コントロール群から脳部位を回収するタイミングは、脳のグリコーゲン含有量に日内変動があることが知られているため、記憶の獲得・想起群と同じ時間帯である。

質問 2 3) PACAP が LTP 形成をするのに乳酸が関わるのか。

(回答) PACAP (-/-) マウスでは LTP 形成に異常が見られるという報告があることから、PACAP は LTP 形成に関与していると考えられているが、その過程で乳酸が関わるかどうかはこれから検討する必要があると考えている。

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(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。