

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 67 号	学位申請者	貞村 祐子
審査委員	主査	武田 泰生	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	桑木 共之	副査 田川 義晃
	副査	奥野 浩行	副査 中村 雅之

主査および副査の5名は、令和3年11月30日、学位申請者 貞村 祐子君に面接し、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) 遊離脂肪酸は線条体のどこでどのように合成されて、Free fatty acid receptor 1 (FFAR1) に作用しているのか？
 回答) 脳に多く含まれる脂肪酸として Docosahexaenoic Acid (DHA) があるが、動物の場合は食餌由来の α -リノレン酸から合成される。血中のDHAが脳のDHAの主要な供給源ではないかとの報告がある。
- 質問2) 脂質生成なので合成するための酵素が必要だと思うが、遊離脂肪酸の合成酵素は線条体に存在するのか？
 回答) 神経細胞にはDHAを合成する不飽和酵素は欠損していると考えられている。
- 質問3) マイクロダイアリシスにおいて、セロトニン(5-HT)・ドパミン(DA)の分解酵素に対するinhibitorのカクテルは入っていないのか？ 回答) 今回の実験ではinhibitorを入れた検討は行っていない。
- 質問4) コカイン誘発の運動量の解析は全てではなく、それぞれの10分のうち3分間で行っているがなぜか？
 回答) 今回の実験ではデータ量の問題で、3分間ずつの解析を行っている。
- 質問5) qPCRとWestern blotでは検体採取の場所が異なるのか？
 回答) いずれも成熟マウスのアトラスを参考に、背側線条体でのサンプル採取を行い、同部位での解析を行っている。
- 質問6) マイクロダイアリシスでの5-HTの反応のピークが伝達物質の変化にしては遅い印象を受けたがどうか？
 回答) 今回は5-HT・DAとさらに代謝産物の分析まで行っているためにマイクロダイアリシスの分析が25分ごとになっている影響はあるかもしれない。対象を絞り、分析時間を短くすればより正確な時間的变化を出せるかもしれない。
- 質問7) FFAR1 ligandで5-HTが、KOマウスでDAが変化している。Acuteで5-HT、ChronicでDA調節なのか？
 回答) もしかしたらその可能性もあるかもしれない。DAのacuteでの反応に関してもマイクロダイアリシスの時間分解能を変えてさらに分析を行っていきたいとも考えている。
- 質問8) Antagonistの持続的投与でKOマウスに近い状態が作れると思うが、その場合DAは上昇すると思うか？
 回答) 今回は反復投与や持続投与下での検討はしていないが、その場合はDA値が上昇している可能性はあると思う。
- 質問9) Basal locomotorの解析でKOマウスが中心区画に滞在する時間が長くなっているのはDA量が上昇していることと関係があるのか？そのような報告があるのか？
 回答) DA受容体のagonist投与により中心区画の滞在時間が減少するとの報告がある。このことから今回のKOマウスではDAのdesensitizationが起こっているかもしれないことが考えられる。
- 質問10) 遊離脂肪酸は神経系の発達にも影響を及ぼしそうだが、KOマウスは普通に発達するのか？
 回答) DHA等の摂取不足は脳の発達障害、うつ、アルツハイマー病などとの関連が言われている。KOマウスでも情動行動異常が見られることを我々のグループでも報告している。
- 質問11) 今回の実験ではモノアミンのHPLC計測ではFFAR1阻害薬の投与は線条体の局所注入だが、行動試験については全身投与(systemic)でみている。異なる脳部位での阻害実験の結果をどのように関連付けて解釈すればよいか？
 回答) 今回の実験では阻害薬の全身投与が線条体でのモノアミン遊離にどう影響するかまでは検討できていない。全

最終試験の結果の要旨

身投与によって同様の挙動がみられるか、また逆に局所投与でも行動に変化がでるのかは今後検討したい。

質問 12) 5-HT や DA を発現している神経細胞の細胞体は線条体には存在していないと考えられる。この場合、どのように線条体での FFAR1 が 5-HT や DA を制御していると考えているのか？

回答) 線条体に投射する 5-HT 神経終末(これが DA 神経終末にもシナプスするのかもしれない)に存在する FFAR1 に作用することでフィードバック等、何らかの影響が出ていると考えているが、詳細についてはまだ検討できていない。

質問 13) 5-HT が線条体で上昇したことが、どのように DA に影響を与えるのか？

回答) FFAR1 で活性化された 5-HT 神経が例えば中脳の DA 神経を調整しているかどうかは今後の検討課題である。

質問 14) 脂肪酸の血中濃度は食後に一番上がると考えられるが、今回の実験では食餌との関係などは検討しているか？

回答) 今回の実験では食餌と実験時間の調整までは行っていない。

質問 15) FFAR1 の研究では食餌との関係はいわれていないのか？

回答) 疼痛行動や情動に関する文献では食餌は自由にとれる環境下で行っているものが多い。

質問 16) 動画では動きが活発になっていたようだったが、解析したものでは低下しているのはなぜか？

回答) 動画は処置後、時間の経過した末梢神経障害性疼痛モデルマウスであることが影響しているのかもしれない。

質問 17) DA が増える疾患として統合失調症が浮かぶが、統合失調症を示唆するような行動は見られなかったか？

回答) 今回の実験では統合失調症症状に関する観察は行っていない。

質問 18) ノルアドレナリン (NA) に関してはどうか？ 先行研究が存在するのか？

回答) KO マウスにおける海馬や延髄、視床下部、中脳で、NA 濃度が高値であったとの報告がなされている。

質問 19) 他の部位についてはモノアミンレベルに違いがあるのか？

回答) 先述の実験(質問 17)では、KO マウスにおいて海馬で 5-HT 値、DA 値とも上昇していたことが示されている。

質問 20) FFAR1 はヒトでの変異や欠失などと疾患への関連性は報告されているのか？

回答) ヒト FFAR1 の遺伝子多型について複数報告がされているが、明確な疾患との関連は現状では示されていない。

質問 21) FFAR1 は膵臓に多いが、KO マウスでは体型等に変化はないのか？

回答) 今回の実験では明らかな体重の差などは見られなかった。

質問 22) インスリン分泌が低下している等の報告はあるのか？

回答) KO マウスにおいては高血糖や耐糖能異常、脂肪肝等は示さないとの報告がある。ヒト FFAR1 の遺伝子多型とインスリンの分泌量に関する現時点では関連がないとされている。

質問 23) FFAR はファミリーを形成しているが、例えば同じ中鎖鎖脂肪酸の受容体である FFAR4 も線条体に発現して作用しているといったことはないのか？

回答) FFAR4 は中枢神経系においてはタンパク質発現が見られなかったとの報告がある。

質問 24) Agonist のうち FFAR1 に選択的なものとして TAK-875 があるが、それを使つての検討は行っていないのか？

回答) 先行実験で使用した薬剤を用いたため、今回は TAK-875 での検討は行っていない。今後検討していきたい。

質問 25) KO マウスと野生型マウスに対して antagonist を投与したものは同じではないと思うが、KO マウスとして生きてきたことがドパミンのターンオーバーなどに影響している可能性はないか？

回答) その可能性もあると考えられる。反復投与によるドパミン量の変化等についても検討していきたい。

質問 26) 受容体の desensitization については D1、D2 agonist などを使用しながら、行動異常を見ていかれたらどうか？

回答) 今後、それらの agonist を用いての検討も行っていきたい。

質問 27) 遊離は上昇したとして、DA の含有量自体に変化はないのか？

回答) 線条体における含有量に関する検討までは行えていない。今後検討していきたい。

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。