

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 711 号	学位申請者	川島 茂隆
審査委員	主査	中村 雅之	学位
	副査	浅川 明弘	副査
	副査	奥野 浩行	副査
<p>主査および副査の5名は、令和 5年 7月 5日、学位申請者 川島 茂隆 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) 実験は絶食しているのか、チョコレートは与えているのか。 (回答) 実験中マウスはチョコレートを摂食できる状態である。</p> <p>質問2) チョコレートをどれくらいの量食べるとカタプレキシーが起こるのか。 (回答) カタプレキシーを起こすために必要なチョコレートの摂取量は不明であるが、Hung et al., eLife. 2020 で実験開始直前 15 分間だけチョコレート与えてもカタプレキシーの増加が報告されている。</p> <p>質問3) 光照射によってチョコレート摂食量は変わるか。光照射によってチョコレートの摂取量が増加したことによるカタプレキシーの増加を観察しているのではないか。 (回答) 今回の実験では光を当てたからといってチョコレートに近づきやすくなるという行動は観察されなかった。光の影響を観察するためにコントロール群への光照射の有無でチョコレート摂食量を測定すべきであった。また、チョコレートを食べる3分以内にカタプレキシーの発生確率は12%だったが、光照射群では発作発生確率が35%だったので発生が増加していると考えている。</p> <p>質問4) ウイルスが側坐核以外に漏れている可能性は。 (回答) 漏れている可能性はあるが、側坐核 D1 受容体発現型中型有棘神経特異的な CaMK II プロモータを用いているので、側坐核に限局していると考え。また ChR2 と Arch は照射光の到達範囲で神経に作用するため、光ファイバーは側坐核に位置するため側坐核特異的に神経操作ができていると考え。</p> <p>質問5) カタプレキシー発生にばらつきがあるのはなぜか。ウイルスの漏れや摂食と関係しているか。 (回答) ウイルスの発現量や光ファイバーの側坐核内における微妙な位置の差などで光照射による側坐核の活性化にばらつきが出たことが考えられる。</p> <p>質問6) 光強度を変えると持続時間に影響するのではないか。 (回答) 予備実験では4種類の光強度を試した。そのうち最も弱い強度を使用している。熱による影響を考慮してこれ以上の強度は試さなかった。</p> <p>質問7) ORX-AB マウスがカタプレキシーから回復・覚醒するメカニズムはどうか。 (回答) 現在、発作からの回復・覚醒メカニズムは不明である。カタプレキシーはREM 睡眠調節異常と考えられているので、脳幹部のREM 睡眠抑制神経の活性化によって発作から回復・覚醒状態へ移行する可能性が考えられる。</p> <p>質問8) チョコレートはカタプレキシーを facilitate (頻度上昇、促進)するが trigger (誘発) はしないとあったが、この違いは何か。今回の実験ではどうか。 (回答) Trigger と言うには刺激と反応が1:1の関係である必要がある。今回は促進である。</p> <p>質問9) 先行研究の DREADD (人工受容体と人工受容体特異的作動薬による神経活動操作法) の実験の結果に関連して、今回頻度は減少しなかったのはなぜか。DREADD と光で、薬が効く範囲 (抑制する細胞の数) が異なるのかそれとも時間だけが異なるのか。 (回答) DREADD を使用した先行研究では Gi (抑制) で発作が減少した。DREADD に作用する薬は Gi 発現細胞の全てに作用すると考えられるが、今回の実験では Arch を発現していても光ファイバーから遠い位置の細胞には作用しない可能性がある。細胞数と操作時間の長さの両方が重要と考える。</p> <p>質問10) カタプレキシーを誘発する側坐核から先のメカニズムについてはどうか。 (回答) 側坐核を含む報酬系回路を構成する前頭前皮質、腹側被蓋野などが関連していると考え。</p> <p>質問11) チョコレートを食べさせず光だけ当てた場合もカタプレキシーは起こるのか。 (回答) チョコレートがなくてもカタプレキシーは起こるので、光だけでも起こると考える。</p> <p>質問12) (緑色光と比較して発生率が違うので) 側坐核に青色光を当てると心地よく感じてしまうのではないか。光の違いでカタプレキシー発生率が変わるのか。 (回答) YFP 群では光の色の違いで発生確率に違いは見られないので、違いはないと考えられる。しかし青色の方が短波長のため、熱発生が多い可能性がある。</p> <p>質問13) DREADD では減少、増加どちらも見られたが、今回の研究で光遺伝学は一過性だから効かなか</p>			

最終試験の結果の要旨

(711)

ったのか。それでは照射回数を増やせばカタプレキシ-減少が見られるのではないか。

(回答) 照射時間増加でカタプレキシ-減少が見られると考える。そのためには長時間光照射でのカタプレキシ-抑制を観察することが必要であるが、今回の研究では施行できていない。

質問 1 4) 先行研究 (Su et al., Sci. Rep. 2020) は c-fos を見ているが、なぜ今回は pERK を見ているのか。

(回答) リン酸化は数秒から数分で起こる一過性のイベントのため、神経活性化マーカーとして pERK は c-fos より時間分解能が高い。光照射以外の影響を少なくするため pERK を観察した。

質問 1 5) DREADD の実験では pERK は見えていないのか。

(回答) 先行研究では神経操作後の側坐核の pERK は観察していない。DREADD の実験では活性化すると c-fos 発現は増加するが、抑制しても c-fos 発現に変化はない。

質問 1 6) オレキシンと側坐核の関係は。

(回答) 今回の研究ではオレキシン神経欠損マウスを用いているのでオレキシンと側坐核のカタプレキシ-における関係は分からない。正常なマウスでは側坐核 DI 受容体発現神経の活性化で視床下部のオレキシン神経が活性化している報告がある。

質問 1 7) ChR2 が pERK を増やすまでのメカニズムについて。カルシウムが細胞に流入してから pERK ができるまでの間に何ががあるか。

(回答) 光照射により ChR2 開口し細胞内にカルシウムイオンが流入する。成長因子情報伝達系の Ras とは異なり、神経細胞の Ras はカルシウム結合ドメインがある RasGRP を介してカルシウムイオンで活性化される可能性がある (Ebinu et al., SCIENCE, 1998)。その後活性化型の RasGTP に応答して MAPKKK の Raf が MEK1/2 をリン酸化する。そして MEK1/2 が ERK1/2 をリン酸化し活性化することが考えられる。

質問 1 8) 免染画像が全て赤く染まっているように見えるが。pERK が本当に出ているのか。緑のシグナルが映り込んでいないか。フィルターの特性はどうか。(バンドパスかロングパスか)

(回答) バックグラウンドが高いため全体が赤く染まっているように見える。pERK が染色されているのかどうか確かめるために、抗 pERK 一次抗体を添加せず染色し、pERK の存在の有無を確認することで検証は可能であり、今後の研究課題としたい。蛍光フィルターはキーエンス社製 OP-87763 (GFP)、OP-87764 (TRITC) を使用した。両方ともバンドパスフィルタである。GFP フィルターの励起波長の中心波長は 470nm で半値全幅が 40nm。吸収波長の中心波長は 525nm で半値全幅が 50nm。TRITC フィルターは励起波長の中心波長は 545nm で半値全幅は 25nm。吸収波長の中心波長は 605nm で半値全幅は 70nm である。

質問 1 9) チョコレートを与えると最初は反応が良くてもそのうち飽きる可能性はないか。チョコレートを与えたタイミングでカタプレキシ-に影響はないか。測定時は既に長時間チョコを与えた後なのか。もしかすると与えた直後はカタプレキシ-がもっと起こっているのではないか。

(回答) 慣れる可能性もある。前日の夕方から一晩チョコレートを与えている。チョコレートへの慣れとカタプレキシ-の回数については今後の検討課題にしたい。

質問 2 0) pERK 発現とカタプレキシ-回数に相関はあるか。

(回答) ChR2 群において pERK と ChR2 の二重陽性細胞率とカタプレキシ-の回数の相関は観察されなかった。

質問 2 1) カタプレキシ-観察はリアルタイムで行っているか。発作は目視で分かるのか。行動の集計はダブルブラインドで行動を観察しているか。

(回答) 行動実験はリアルタイムで観察している。カタプレキシ-症状の姿勢は特徴的なので目視で判別できる。カタプレキシ-の行動は行動実験を行なった本人が観察している。

質問 2 2) 光を当てるとたくさんチョコを食べるということはないか。

(回答) 観察する限りそういうことはない。チョコレートの重量測定などはしていないため今回の研究ではチョコレートの摂取量と光照射との関係は不明である。

質問 2 3) ウイルスインジェクションは難しいか。テクニカルなことが発作の発生確率の結果に反映されていないか。

(回答) 側坐核は深い位置にあるので脳表に近い領域に比べれば難しいかもしれない。個体差やウイルスの発現量などで側坐核の活性化にばらつきがあったことで発作のばらつきが生じたと考える。

質問 2 4) カタプレキシ-持続・抑制については他のどの脳領域が関わっていると思うか。臨床では三環形抗うつ薬や SNRI が効くが、カタプレキシ-との関わりについて考えられることはあるか。

(回答) カタプレキシ-持続は扁桃核、発生抑制は延髄縫線核が関連していると考えられる。クロミプラミンの REM 睡眠抑制作用がカタプレキシ-の発生抑制に寄与していると考えられる。

質問 2 5) 今回の研究の側坐核とカタプレキシ-の発生・抑制・持続時間での機能性について、今後の研究の展望についてのべよ。

(回答) 今回の実験では側坐核の活性化でカタプレキシ-の発生促進が観察されたが、持続時間の調節機能については観察されなかった。このことから側坐核ではカタプレキシ-発生と持続では独立したメカニズムであることが示唆された。側坐核は報酬系回路を構成する神経核の一つであるので、腹側被蓋野や前頭前皮質と側坐核の間で、カタプレキシ-発生・抑制・持続の調節メカニズムを明らかにしていきたい。

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。