

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 350 号	学位申請者	塚原 飛央
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位
	副査	宮脇 正一	副査
	副査	西村 正宏	副査
<p>主査および副査の5名は、平成 28 年 2 月 12 日、学位申請者 塚原 飛央 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) ストレスによって、Cl^- トランスポーターが変化することは既知の事実なのか。 (回答) 統合失調症などすでに疾患が発症した状態では、死後脳などで KCC2 の減少は報告されている。ストレスによって Cl^- トランスポーターが海馬で変化する報告は、雌性動物において初めてである。</p> <p>質問2) Cl^- トランスポーターはストレスによって最も大きく変化する、トランスポーターなのか。 (回答) 網羅的に調べられてはいないので、はっきりとしたことは言えないが、Cl^- の平衡電位が神経細胞の静止膜電位に近いので、一過性にも逆転しやすく、持続すると主たる抑制系である GABA が正常に働かないという意味で影響力も大きいと考えられる。</p> <p>質問3) 胃管チューブの挿入によるストレス負荷法は確立されたものか。どのように、ストレスを感じているか。 (回答) 現在、胃管チューブの挿入に関して論文を 2 報出しているが確立したというまでには、多くの課題が残されていると考えている。ストレスをどのように感じているかについても、挿入による不快感、内臓感覚による迷走神経を介した影響も可能性として十分にあると考えている。論文で使っている胃管チューブの型などを載せてから、学会などで再現できたという声は聞いているので、今後同様の方法を使用する人が増えることを期待している。</p> <p>質問4) Open Field Test の軌跡で自発運動量がストレス群の方が多くみえるが。 (回答) 性周期があるためどうしてもバラツキは出るが、統計的には、論文のグラフで示したようにコントロール群とストレス群の差はなかった。ハンドリングをしている感触では、ストレスを与えている方が活発に感じたので、実験のタイミングなどで有意差が出る可能性はある。別の実験系の双極性うつ病モデルの躁状態では、まず高架十字迷路試験において差が出て、躁状態が続くと Open Field Test でも自発運動量の差が出始める。</p> <p>質問5) 海馬神経細胞は脆弱と言われているがストレスによる細胞死はみられたか。 (回答) 細胞死が起こっている可能性が高いと考え、アポトーシスのマーカーとして活性化 Caspase 3 を使用して検討したが、コントロール群とストレス群で差がなかったため少なくともアポトーシスではないと考えられる。</p> <p>質問6) 実験のデザインの段階で雄性動物と比較するという構想はなかったのか。 (回答) もともと、卵巣摘出マウスで実験していたため、雌性マウスのみを使用した。しかし、近年の報告で元来同じと考えられていたメカニズムに性差があることがわかってきたので、将来的には行いたいと考えている。</p> <p>質問7) 胃管チューブを入れる際になぜ水も投与したのか。体重の 1/100 の量なので、影響はないと思う</p>			

がトランスポーターは、浸透圧などの影響を受けやすいので、わざわざ入れる必要はないと考えられるが。

(回答) 論文の査読者からも指摘されたが、水を入れた理由は、薬物投与を同量の溶液で行っていたので、水の投与自体による影響がないモデルであることを提示する意味合いがある。水を投与することによる体重変化、飲水量などの変化がないことも確認している。

質問 8) 8 週齢なので生殖器官は完成していると考えられるが、性周期のサイクルは考慮したのか。

(回答) 母集団を十分に大きくし、その平均をとっているので妥当な結果になっていると考えている。

質問 9) KCC2 と NKCC1 の抗体のエピトープの部位は、細胞の中か外か。また、Santa Cruz 社に Rabbit の抗 GABA_A 受容体 $\alpha 1$ サブユニット抗体はなかったと記憶しているが、新しく出たのか。

(回答) KCC2、NKCC1 とともにエピトープは細胞内にある。GABA 受容体の $\alpha 1$ サブユニットは確かに $\alpha 1-6$ と書いているところもあるが、多くの論文で $\alpha 1$ サブユニットとして使用されている。

質問 10) KCC2 と NKCC1 の Regulation 経路として考えはあるか。

(回答) 一つは、グリアを介した BDNF-TrkB-KCC2 の経路が考えられる。海馬の神経細胞では、CA3 の細胞のみが BDNF を産生するが、ストレスを加えると細胞体に BDNF が認められず、散在している所見を得ているので、これが、グリアによる放出ではないかと考えている。また、WNK3-SPAK/OSR1 を介した Regulation もある。実際、ストレス負荷状態では、リン酸化 SPAK/OSR1 が増加していることを確認している。SPAK/OSR1 の活性化により、NKCC1 が活性化し KCC2 が不活性化すると考えている。

質問 11) WNK3-SPAK/OSR1 は、KCC2 と NKCC1 相反的な作用を起こすのか。また、直接 KCC2 にも作用するのか。

(回答) WNK3-SPAK/OSR1 の経路は、確かに多くの論文で、NKCCs に作用することがわかっているが、KCC2 と SPAK が免疫沈降により結合することも報告されており、詳しいメカニズムはわかっていないが、NKCCs のリン酸化の後に KCC2 の脱リン酸化が起こっていることも数多く報告されているので、KCC2 に対してもなんらかの作用を起こしていると考えられる。

質問 12) Cl⁻が増えた場合に他の因子による緩衝作用はできないのか。

(回答) Cl⁻の電気化学勾配されない限り、Cl⁻チャネルを持つ GABA_A 受容体やグリシン受容体は興奮性に働き続けるため、発表内容のような状態が持続すると考えられる。

質問 13) GABA 神経の由来、投射についてどのように考えているか。

(回答) 嗅内野からの投射と海馬内のパルブアルブミン陽性介在 (PV) ニューロンによるものが大きいと考えている。実際、Fast spiking cell である PV ニューロンは NKCC1 を多く発現していて、その役割は大きいと考えられる。また、海馬内での領域同士の投射によっても影響し合っていると考えている。

質問 14) マウスをつかむこと自体がストレスになるのでは。また、胃管チューブも不慣れな人が使用するとマウスに必要な以上のストレスを加えてしまう恐れがあるが。

(回答) マウスのつかみ方や胃管チューブの入れ方が適切でないと、ストレスになるので再現性を持つには、一定以上の手技が必要と考えている。逆に、ストレス負荷が目的でないのに、意図せずストレスを負荷することで実験結果自体が変わる可能性もあるため、多くの人々が着目してくれた。申請者の実験上では、マウスをつかむことによる影響は無視できる程度のストレスであることは確認している。

質問 15) 明視野 DAB 染色での評価法はどのように行っているのか。

(回答) 比較する切片は、同時に染色までの行程を行ったこと、細胞の密度が同程度であり、白質および切片のない部位の露出が同じであることを条件とした。ネガティブコントロールにおいても上記条件を揃えたものから測定部位の発現強度を測定し、その平均値を閾値として二値化している。バックグラウンドが明らかな抗体の場合はそちらを使用している。さらに、測定した面積で割ることで単位面積あたりの、0 と 255 の平均値としてグラフ化している。この条件のもとでは、進行性の反応をする DAB 染色などにおいても相対比較が可能と考えられる。二値化をしない場合は、反応が飽和していない条件下で、比較することが前提になると考えている。

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(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。