

最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第 26 号	学位申請者	吉武 志真子
審査委員	主査	乾 明夫 教授	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	桑木 共之 教授	副査 堀内 正久 教授
	副査	佐藤 友昭 教授	副査 池田 龍二 准教授

主査および副査の5名は、平成28年2月17日、学位申請者 吉武志真子君に面接し、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) ガラニンレセプター3 (GalR3)は限局された部位に発現しているが、機能的に特異性があるのか？
(回答) GalR3の機能は、GalR1と酷似している。

質問2) それぞれの測定法について、個体差、サーカディアンリズムなどのバラツキについてはどうか？
(回答) 個体差などの実験動物に関する安定性、HPLCの機器に関する再現性共に保たれている。万が一、変動した場合も条件を変えて行う十分な蓄積データがある。

質問3) ストレスによって、ガラニンは増加するのか？
(回答) 実際にガラニンを測定していないが、文献から増加するだろうと予測される。

質問4) 腹側海馬でのアセチルコリンの減少についての考察で、3通りの仮説からどれが一番可能性が高いか？

(回答) GalRの選択的なアンタゴニストやアゴニストは現在のところ存在せず、検証が困難である。今後トランスジェニックマウス等を用いて、検証していきたい。

質問5) ガラニン発見の経緯は？

(回答) C末端がアミド化されたペプチドを化学的スクリーニングにより探索していくなかで、発見された。

質問6) ノルアドレナリンのピークの直前にあるピークは何か？ガラニンの投与によって何か変化があるか？

(回答) ピークの同定は行っていない。ガラニン投与によって変化はない。

質問7) cAMP測定感度の感度について。

(回答) 従来、微小透析試料の測定にはRIAがよく用いられている。今回の測定法の感度はRIAと同等程度に高感度である。

質問8) ヘテロ受容体とは？

(回答) アセチルコリン神経終末に存在するGalR1のように、ムスカリン受容体やニコチン受容体ではない異種のシナプス前受容体を言う。

質問9) ストレスをかけるとガラニンが特異的な部位で変化するか？

(回答) 実際に測定していないが、扁桃体において増加したことの報告がある。

質問10) ガラニンのグリシンへの影響について。

(回答) 微小透析法での報告はない。今後、検討していきたい。

質問11) 脳内の細胞外液中のガラニンの濃度は？ガラニンの投与量はどのように決めたか？測定した神経伝達物質の濃度は数nMであるのに対して、ガラニンは1.5nmoleを投与していることについて。

(回答) 過去の論文から微小透析法による腹側海馬におけるガラニン濃度は2pM。過去の蓄積された行動学実験と同じ投与量とした。微小透析法によって得られた物質の濃度は、実際の濃度の相対値であり、実際の濃度ではない。(微小透析法による神経伝達物質の回収率は実際濃度の10%程、ガラニンの回収率は1%以下である。またシナプス外で回収していることから神経伝達物質、ガラニンは拡散している。)

最終試験の結果の要旨

また細胞内に神経伝達物質、ガラニンが貯蔵され細胞外よりかなり多い。さらに細胞内ではこれらの生合成も行なわれている。これらの理由からガラニンが生理的な神経活動によりかなり高濃度で放出されることが推察され、投与量は妥当と考える。

質問 12) ガラニンによるノルアドレナリンの増加は、GalR アンタゴニストによって阻害されるか？

(回答) 強制水泳によるストレス実験においてノルアドレナリンの増加は GalR アンタゴニストの M35 によって阻害された。

質問 13) ヒスタミンについて、ガラニン投与後にラットの行動の変化(睡眠など)は観察されたか？

(回答) 睡眠に変化はなかったが、摂食行動は亢進した。

質問 14) 海馬について、腹側と背側で機能的な違いはあるか？

(回答) 腹側海馬は情動機能、背側海馬は認知機能に関与している。

質問 15) 微小透析法の実験でのストレスに関して。

(回答) ケージに移した直後は探索行動などがみられるが、ストレスの影響は微小透析法により観察される投与前のノルアドレナリンの変動が小さいので、ほとんどないと思われる。

質問 16) ガラニンは 29 のアミノ酸のまま受容体に結合するか？代謝については？

(回答) 受容体との結合性は 1-29 が最も高親和性である。1-15 では 1-29 に比べて約 20%の親和性となる。ガラニンはシナプス膜において分解され作用が終結すると考えられる。

質問 17) GalR を標的にした薬剤について。

(回答) 現在、いくつかの小分子の GalR を標的にした薬剤が開発中である。

質問 18) 扁桃体からのバソプレシン神経を制御しているのは、ガラニンだけか？

(回答) ガラニンのみではない。

質問 19) GalR2 の調節因子としての役割について。

(回答) Gi/o を介した阻害的作用と Gq/11 を介した促進的作用を合わせもつため、機能は複雑である。

質問 20) 微小透析法ではどのくらいの数の物質を一度に測定できるか？

(回答) 仮に還流液の流速を $2\mu\text{l}/\text{min}$ とし、1 時間毎に測定すると $120\mu\text{l}$ のサンプル量が得られる。HPLC 測定では約 $10\mu\text{l}$ ずつを使用するとして、少なくとも 12 の物質を測定できる。

質問 21) 脳内微小透析法で何本プローブを手術できるか？末梢の awake 微小透析法は行われているか？

(回答) プローブ 2 本までは経験している。プローブが多いほど、動物に負荷がかかる。末梢では脊髄、皮膚、肝臓などで可能である。

質問 22) 細胞内の cAMP をなぜ微小透析法で測定できるのか？

(回答) 細胞内の cAMP は細胞外に流出していて、その流出率は細胞内の濃度に比例していることがわかっている。

質問 23) 投与後 40 分かけて神経伝達物質が変動するのはどうしてか？

(回答) 実際には微小透析法はシナプス間隙外の濃度を観察するため、薬剤投与後の放出による変動を観察するのに時間を要する。

質問 24) 海馬—中隔 GABA ソマトスタチンニューロンは存在しているか？

(回答) CA1 から中隔へのニューロンのほとんどは、GABA ソマトスタチン神経であることが解剖学的研究により報告されている。

質問 25) Galanin transgenic mice での結果はあるか？

(回答) Galanin-overexpressing mice において、不安に対して感受性が高くなったことが報告されている。

質問 26) ガラニンの投与の仕方について。

(回答) $0.5\mu\text{l}$ を 1 分かけて低流量ポンプで注入する。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。