

氏名(本籍)	おののこうさく 大野耕作(宮城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4835号		
学位授与年月日	平成20年7月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Functional differentiation of orexin producing neurons in the hypothalamus (視床下部におけるオレキシン産生ニューロンの機能分化)		
主査	筑波大学教授	理学博士	石井哲郎
副査	筑波大学教授	獣医学博士	八神健一
副査	筑波大学准教授	博士(獣医学)	杉山文博
副査	筑波大学講師	博士(医学)	山本純偉

論文の内容の要旨

(目的)

視床下部外側野に発現する神経ペプチド「オレキシン」は睡眠・覚醒、摂食、報酬などの広範な生理機能に対して非常に重要な役割を持っていることが報告されている。本研究では immunotoxin mediated conditional cell targeting (IMCT) という手法を用いてオレキシン産生神経を後天的に脱落させることにより、発生段階での影響や慢性的な変化を考慮せずにオレキシンの生理機能を解析し、部位別のオレキシン神経の生理機能を調べることを目的とした。

(対象と方法)

実験に用いた IMCT という手法はヒトのインターロイキン2受容体 α サブユニットを特異的に認識するモノクローナル抗体の Fv フラグメント (Anti-Tac(Fv)) に緑濃菌から分泌される外毒素 (PE: Pseudomonas exotoxin) をつなげた組み換え型のイムノトキシンを用いる。このイムノトキシンは抗体部で抗原と結合すると細胞内へ取り込まれ、毒素部がタンパク質の翻訳を阻害することで細胞毒性を示し細胞死を誘導すると考えられている。本研究ではプレプロオレキシンプロモータの下流に抗原となるヒトインターロイキン2受容体 α サブユニットと発現マーカーとなる EGFP が繋がった蛋白質 (orexin/hIL2R α ::EGFP) を発現するベクターを組込んだ遺伝子のトランスジェニックマウスを作製した。5つのラインが得られた中から異所性の発現がなく、最も高い発現率 (81%) のラインを選択し、実験に用いた。

(結果)

10 から 15 週齢のトランスジェニックマウスに対し、留置したカテーテルを用いてイムノトキシンを第三脳室または側脳室に投与した。脳室内投与後 10 ~ 14 日で脳を固定染色しオレキシン神経および EGFP 発現神経の数を測定した。その結果、イムノトキシンは濃度依存的にオレキシン神経を脱落させたが、第三脳室に投与した群はオレキシン神経存在領域の中でも尾側部位を多く、側脳室に投与した群は吻側部位を多く脱落させた。これはオレキシン産生神経がその発現領域の中でも尾側部位は内側の第三脳室周囲に、吻側部位は外側の視床下部外側野に存在していること等によると考えられた。

IMCT 未処置マウスとオレキシン神経脱落マウスの脳波と項筋の筋電位を測定し睡眠・覚醒状態の比較を行った。測定した脳波および筋電位をソフトウェア上で覚醒時、徐波睡眠時、REM 睡眠時に分けて解析した結果、イムノトキシンを側脳室に投与した群は PBS を投与した群との間に差がなかったが、第三脳室に投与した群は暗期における覚醒持続時間の減少、REM 睡眠時間の増加、REM 睡眠持続時間の増加が見られ、覚醒の分断化と REM 睡眠の増強が起きていた。従って、尾側部に存在しているオレキシン神経は覚醒の維持、REM 睡眠の中断に関わっている可能性が示唆された。

続いてメタンフェタミンによる薬物報酬作用について解析した結果、メタンフェタミンによって誘導される場所嗜好性は、イムノトキシンを第三脳室に投与した群では PBS を投与した群と変わらず形成された。それに対し側脳室に投与した群はメタンフェタミンによって条件付けされた個室への滞在時間が有意に少なく、メタンフェタミンによる場所嗜好性が形成されなかった。つまり報酬性薬物による報酬作用もしくは報酬記憶に障害があるものと考えられる。このことはオレキシン神経の中でも吻側に存在するものは報酬系の調節に重要な役割を果たしているということを示唆している。

(考察)

IMCT という高度な手法を用いることによって後天的、部位特異的にオレキシン神経を脱落させることに成功し機能解析を行った結果、オレキシン神経は発現部位によって関与している機能が異なる事を示した。脳内の神経伝達物質については同じ物質でも異なる神経核で発現している場合、果たす生理的役割が変化することは知られている。しかしオレキシン発現神経は神経核を形成せず、視床下部外側野の広い領域に散在していることから発現部位と機能の関係については近年ようやく解析が行われ出したばかりである。本研究の結果は、吻側部のオレキシン神経と尾側部のオレキシン神経の役割の違いを解剖学的視点から指摘した報告を支持する成果であり今後の発展が期待できる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、IMCT という手法を用いて後天的、部位特異的に中枢のオレキシン神経を特異的に脱落させることにより、覚醒の維持、REM 睡眠の中断におけるオレキシン神経の役割と薬物報酬作用におけるオレキシン神経の役割をそれぞれ丁寧に解析した研究であり、オレキシン神経のさらなる研究の発展につながる優れた研究成果である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。