

氏名（本籍）	LOKESH AGRAWAL（インド）		
学位の種類	博士（神経科学）		
学位記番号	博甲第	9655	号
学位授与年月	令和 2 年 8 月 31 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	Role of serotonin 4 receptor in the growth of axon and dendrites of hippocampal neurons during the embryonic development in mice (マウス海馬ニューロンの軸索と樹状突起形成におけるセロトニン 4 型受容体の役割)		
主査	筑波大学教授(連携大学院) 博士(理学)	高島 一郎	
副査	筑波大学教授	博士(医学)	武井 陽介
副査	筑波大学助教	博士(神経科学)	小金澤 禎史
副査	東洋大学教授	医学博士	金子(大谷) 律子

## 論文の内容の要旨

Lokesh Agrawal 氏の博士学位論文では、マウス胎仔海馬の培養系を用いてセロトニン 4 型受容体 (5-HT4R) が海馬ニューロンの軸索と樹状突起の発達に果たす役割とその作用機序について検討している。その要旨は以下のとおりである。

### (目的)

最初に著者は、モノアミンの 1 種であるセロトニンが、成体脳において神経伝達物質として機能する一方で、発達期では神経発生を調節し、脳と行動の発達に様々な影響を及ぼすことを示した先行研究について説明している。次いで著者は、セロトニンによる神経発生の調節機構に注目し、セロトニンの受容体が 14 種類存在するのに対し、神経発生における個々の受容体の機能は未だ十分に解明されていないこと、その中でも 5-HT4R は発達期の海馬を含む辺縁系に豊富に発現するにもかかわらず、神経突起（軸索と樹状突起）の発達における役割とその分子機構はほとんど解明されていないことを説明している。これらの状況を受けて、筆者は本研究においてマウス胎仔海馬の培養系を用い、まず最初に海馬ニューロンの軸索と樹状突起の形成における 5-HT4R の役割を解明することを目的としている。そして 5-HT4R の神経突起の形成における作用を明らかにした上で、5-HT4R の作用を担う分子機構を解明する

ために、collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) に着目している。CRMP2 は軸索と樹状突起の発達を調節し、その活性が CRMP2 のリン酸化状態によって異なることが報告されているが、5-HT4R と CRMP2 の関係は全く不明であったため、5-HT4R の作用における CRMP2 の役割を明らかにすることを目的として様々な解析を行っている。

### (対象と方法)

本研究で著者は、胎生 18 日のマウス (C57BL/6) を用い、海馬を取り出してニューロンの分散培養を行っている。軸索と樹状突起の発達における 5-HT4R の作用の特徴を明らかにするために、著者はまずこれらの神経突起における 5-HT4R の発現について特異抗体を用いた免疫染色法によって解析している。そして 5-HT4R が神経突起に発現することを確認した上で、神経突起の形成における機能を明らかにするために、5-HT4R に対する選択的作動薬を単独添加、または拮抗薬と組み合わせた状態で 4 日間培養している。培養後に微小管関連タンパク 2 に対する抗体と SMI31 抗体を用いて樹状突起と軸索を標識し画像解析ソフトを用いて定量解析することによって、5-HT4R が神経突起の伸長と分岐形成に及ぼす影響について調べている。次いで著者は、5-HT4R の作用機序を明らかにするために、5-HT4R が神経栄養因子 (BDNF、NGF、NT3) とその受容体 (TrkA、TrkB、TrkC) の mRNA の発現に及ぼす影響について定量 PCR 法によって解析している。さらに CRMP2 の役割を明らかにするために、著者は免疫染色法を用いた 5-HT4R と CRMP2 の軸索と樹状突起における発現解析、定量 PCR 法による 5-HT4R の CRMP2 mRNA の発現調節の解析、western blot 法による 5-HT4R の CRMP2 リン酸化に及ぼす影響の解析、CRMP2 の Knockdown による軸索と樹状突起形成における CRMP2 の機能解析を行っている。

### (結果と考察)

免疫染色法を用いた解析により、著者は 5-HT4R が海馬ニューロンの軸索と樹状突起に広く発現することを明らかにしている。このような神経突起に発現する 5-HT4R が軸索と樹状突起の形成において果たす役割を解明するために、著者は 5-HT4R 作動薬と拮抗薬を用いた培養実験を行い、5-HT4R 作動薬が軸索の長さ、太さ、および分岐を増加させ、その作用は拮抗薬の同時添加によって打ち消されることを明らかにしている。この結果を受けて著者は 5-HT4R は軸索の伸長と分岐形成を選択的に促進する作用を持つと結論づけている。さらに著者は同様の解析を樹状突起についてもを行い、5-HT4R 作動薬は樹状突起の分岐形成と一次樹状突起の形成を促進するが、伸長には影響を及ぼさないことを明らかにしている。次に著者は、樹状突起と軸索の形成に対する 5-HT4R による促進作用を担う分子として神経栄養因子とその受容体に着目し、5-HT4R 作動薬が神経栄養因子である BDNF、NT3、NGF とその受容体である TrkA の mRNA の発現量を増加させることを明らかにしている。最後に 5-HT4R と CRMP2 の相互作用を明らかにするために種々の機能解析を行い、5-HT4R と CRMP2 は軸索と樹状突起において共発現し、5-HT4R 作動薬が CRMP2 mRNA の発現量を増加させる一方でリン酸化 CRMP2 を減少させ、さらに CRMP2 発現を knock down すると 5-HT4R 作動薬の作用が見られないことを明らかにし、これらの結果は 5-HT4R の作用が CRMP2 を介する可能性を示すと考察している。以上の一連の実験結果をもとに著者は、5-HT4R は海馬ニューロンの軸索と樹状突起の発達を促進し、その作用には神経栄養因子と CRMP2 が関与する可能性を明らかにし

ている。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本研究ではマウス胎仔の海馬ニューロンの分散培養系を用い、5-HT4R が軸索と樹状突起の発達に及ぼす影響を各パラメーター（長さ、直径、分岐）に分けて詳細に解析し、その作用に CRMP2 が関与することを明らかにしている。5-HT4R が CRMP2 mRNA の発現を増加させる一方で、CRMP2 のリン酸化を抑制することと、5-HT4R による軸索と樹状突起の形成促進に CRMP2 が必要であることを初めて明らかにした点で高く評価できる論文である。5-HT4R は記憶学習やうつなどの神経精神機能への関与が示されているが詳細な作用機序は明らかにされていない。本研究はこれらの分子機構を解明するモデル系として期待されるものである。

令和 2 年 6 月 11 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（神経科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。