



Title	シナプス前コレシストキニン受容体を介した最後野ニューロンの興奮性調節 [全文の要約]
Author(s)	菅田, 真吾
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第11256号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/56185">http://hdl.handle.net/2115/56185</a>
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。
Note(URL)	<a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
File Information	Shingo_Sugeta_summary.pdf



[Instructions for use](#)

## 学位論文内容の要約

### 学位論文題目

シナプス前コレシストキニン受容体を介した  
最後野ニューロンにおける興奮性調節

博士の専攻分野名称 博士（歯学）氏名 菅田 真吾

## 学位論文題名

### シナプス前コレシストキニン受容体を介した 最後野ニューロンにおける興奮性調節

#### 【目的】

コレシストキニン (CCK) は摂食抑制作用を示すペプチドホルモンとしてよく知られている。同ホルモンに対して最後野ニューロンが感受性を有すること、および、細胞外記録法により実際の神経応答が観察されることなどが以前の研究により報告されていた。しかし、最後野ニューロンにおける詳しい CCK 受容機構および CCK 応答性ニューロンの膜特性については全く不明であった。さらに、最後野における CCK 受容体の発現部位および CCK 受容体サブタイプについても詳細を明らかにすることが必要であった。そこで我々はこれらの不明点を解明するために、スライスパッチクランプ法を用いた電気生理学的実験を行い、データ解析を行った。

#### 【方法】

本研究は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定を遵守して行った。

生後 4~18 日齢の *Sprague-Dawley* 系ラットを用いて、脳スライスの作製を行った。ハロセン麻酔下にて実験動物を断頭し迅速に脳を取り出したのち、氷温のスクロース置換人工脳脊髄液 (sucrose-ACSF, sucrose artificial cerebrospinal fluid (in mM) 234 sucrose, 2.5 KCl, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 95 % O<sub>2</sub> - 5 % CO<sub>2</sub> 混合ガスにより pH 7.4 に調整された溶液) に 1 分間浸漬後、マイクロスライサー (堂坂 EM, 京都) を用いて最後野を含む厚さ 150~180 μm の前頭断脳スライスを作成した。脳スライスは人工脳脊髄液 (normal-ACSF, normal artificial cerebrospinal fluid: (in mM) 124 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.6 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 混合ガスにより pH 7.4 に維持された溶液) にて室温 (24~27°C) で一時間培養した。

作製した脳スライスを近赤外微分干渉正立顕微鏡 (BX50-WI, オリンパス, 東京) 下にセットした記録チャンバーに固定した。記録チャンバーには常に新鮮な normal-ACSF が満たされるよう、ペリスタポンプ (Minipuls 2, Gilson, Villiers, France) を用いて 2~3 ml/分の速度で normal-ACSF を灌流した。顕微鏡下にて最後野ニューロンを同定し、ホールセル記録を行った。記録用パッチ電極には電極内液 (K-gluconate: (in mM) 135 K-gluconate, 10 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2 Na<sub>2</sub>ATP, and 0.1 spermine adjusted to pH 7.3 with KOH) を充填し、電極抵抗が 4~8 MΩ になるものを用いた。微小興奮性シ

ナプス後電流 (mEPSC: miniature excitatory postsynaptic current) を記録する際には灌流溶液中にテトロドトキシン (TTX, 1 $\mu$ M, Sigma) を添加した。

使用した CCK は中枢神経系および末梢で最も生理活性の高い CCK-8 (CCK-8 硫酸塩, Sigma) を用いた。CCK-8 は, 灌流溶液中に添加する灌流投与と, ガラス管と圧噴射装置 (picospritzer II, General valve Co., USA) を用いて記録しているニューロンの近傍に直接投与する局所投与の, 2 種類の方法を用いて投与した。最後野に存在する CCK 受容体のサブタイプを同定する実験では, ロルグルミド (CCK-A 受容体アンタゴニスト, Sigma) を灌流投与にて, CCK-8 非硫酸塩 (CCK-B 受容体アゴニスト, Sigma) を局所投与にて用いた。AMPA 型グルタミン酸受容体遮断薬である

6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, Sigma) は灌流投与にて用いた。

統計学的解析は Minianalysis software (Synaptosoft, Decatur, GA) を用いて行った。mEPSC の発生間隔時間および振幅の累積確率分布の解析には, Kolmogorov-Smirnov (KS) test を用いた。また, mEPSC の平均振幅および mEPSC の平均間隔時間については, Student's two tailed *t* test を用いて解析を行った。

### 【結果と考察】

パッチクランプ記録を行った 133 例の最後野ニューロンのうち, 42 例のニューロンにおいて CCK-8 に対し mEPSC の発生頻度増加を示す興奮性応答が検出された。抑制性の応答は全く見られなかった。最後野ニューロンには基本的膜特性の異なるニューロンが存在しており, 膜電位の過分極に依存して活性化される H 電流を示すニューロンを Ih (+) ニューロンとして, 膜電位の過分極に H 電流を全く示さないニューロンを Ih (-) ニューロンとして電気生理学的に同定することができる。CCK-8 に興奮性応答を示した 42 例について, 各々の膜特性によって分類すると, 38 例が Ih (-) ニューロンであり, これらは CCK-8 に対する著明な応答を示した。一方, CCK-8 に興奮性応答を示した Ih (+) ニューロンは 4 例のみであり, しかも極めて微弱な応答しか検出されなかった。

CCK 誘発の mEPSC の発生頻度と, mEPSC の振幅の確率分布および平均振幅について統計学的に解析を行った結果, mEPSC の間隔時間に対する累積確立分布は左方へシフトし, mEPSC の発生頻度の有意な増加が示された ( $p < 0.01$ , KS test,  $n=42$  cells)。また, mEPSC の振幅に関する累積確立分布および mEPSC の平均振幅については有意な変化は認められなかった ( $n=21$  cells)。これらに加えて, CCK 投与によって持続性の内向き電流が誘発されなかったことを考慮すると, 投与した CCK-8 の作用点はシナプス前膜であることが強く示唆された。

CCK-8 (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM) の灌流投与を行い, mEPSC の発生頻度増加が濃度依存性に生じることを確認した ( $n=15$  cells)。また, 高濃度 CCK-8 投与による mEPSC の振幅増加が認められたが, シナプス後膜に存在する受容体の感受性が変化したことが考えられた。

CCK 受容体のサブタイプを同定する実験では、CCK-8 に興奮性応答を示したニューロンに対し、CCK-A 受容体アンタゴニストであるロルグルミド存在下において再度 CCK-8 を投与したところ、CCK-8 に対する応答が消失した (n=5cells)。また同じニューロンに対して、CCK-B 受容体アゴニストである CCK-8NS を同様に局所投与したが応答は観察されなかった (n=5cells)。このことから、最後野ニューロンのシナプス前膜に存在する CCK 受容体のサブタイプは CCK-A 受容体であることが強く示唆された。

CCK-8 に興奮性応答を示すニューロンに対し、AMPA 型グルタミン酸受容体遮断薬である CNQX 存在下において CCK-8 を投与したところ、CCK 誘発の mEPSC は完全に消失した。このことから CCK-8 はシナプス前膜の CCK-A 受容体を介して、グルタミン酸の放出確率を増加させることが示された。

CCK-8 によって誘発されるグルタミン酸放出量の増加が活動電位を発生させる駆動力になり得るかどうかを確認するために、電流固定法にて TTX 非存在下で CCK-8 を投与したところ、活動電位の発生頻度が著明に増加した。これは CCK-8 が最後野ニューロンの出力調節に機能的役割を果たしていることを示すものであった。

今回の実験では、CCK-8 応答性ニューロンの大部分が Ih (-) ニューロンであることが明らかとなった。これは、以前の我々の研究で、摂食抑制ホルモンであるアミリンが最後野において Ih (-) ニューロンにのみ興奮性応答を示したことから、Ih (-) ニューロンが摂食調節に関与している可能性が示唆された。一方、最後野における Ih (+) ニューロンが悪心嘔吐調節に関与しているとする先行研究を合わせて考えると、H チャネルの有無という膜特性の違いから大別される最後野ニューロンが、それぞれ異なった機能を有するように分化している可能性が推察され、今後解明すべき大きな研究課題を示すに至った。

## 【結論】

最後野ニューロンの CCK-8 応答性は、シナプス前膜に存在する CCK-A 受容体を介するグルタミン酸の放出増加により生じる。またシナプス前 CCK-A 受容体を介するグルタミン酸の放出増加は活動電位の発火を誘発して機能的意義を有する。さらに、CCK-8 は主として H チャネルを発現していない最後野ニューロン活動を修飾する。これは膜特性が異なる最後野ニューロンにおける機能分化の可能性を示唆するものであった。