



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Intracellular signaling for the effects of neuropeptides on the excitability of type II neurons in the bed nucleus of the stria terminalis
Author(s)	兼子, 朋之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14665号
Issue Date	2021-09-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14665
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83527
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoyuki_Kaneko.pdf



博士学位論文

Intracellular signaling for the effects of neuropeptides on the excitability
of type II neurons in the bed nucleus of the stria terminalis

分界条床核 II 型神経細胞の興奮性に対する神経ペプチドの効果と細胞内情報伝達

兼子 朋之

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬理学研究室

2021 年 9 月

目次

略語表	1
使用試薬	2
序章	3
第1章 分界条床核 II 型神経細胞に対する CRF の効果と細胞内情報伝達	
1.1. 実験方法	5
1.1.1. 使用動物	
1.1.2. 使用薬物	
1.1.3. 脳スライス作製	
1.1.4. Whole-cell patch clamp 法による電気生理学的解析	
1.1.5. 電気生理学的性質に基づく d1BNST 神経細胞の分類	
1.1.6. Holding current の測定	
1.1.7. 電流-電圧 (I-V) 曲線の測定と電流変化の解析	
1.1.8. 統計解析	
1.2. 実験結果	8
1.2.1. PKA 阻害薬は CRF による II 型 d1BNST 神経細胞の脱分極作用を抑制した	
1.2.2. Forskolin は II 型 d1BNST 神経細胞における CRF の興奮作用を模倣した	
1.2.3. PLC 阻害薬および CaMKII 阻害薬は CRF による II 型 d1BNST 神経細胞の脱分極作用を抑制しなかった	
1.3. 考察	15
第2章 分界条床核 II 型神経細胞に対する NTS の効果と細胞内情報伝達	
2.1. 実験方法	18
2.1.1. 使用動物	
2.1.2. 使用薬物	
2.1.3. 脳スライス作製	
2.1.4. Whole-cell patch clamp 法による電気生理学的解析	
2.1.5. 電気生理学的性質に基づく d1BNST 神経細胞の分類	
2.1.6. 膜電位と入力抵抗の測定	
2.1.7. Holding current の測定	
2.1.8. 電流-電圧 (I-V) 曲線の測定と電流変化の解析	
2.1.9. 統計解析	
2.2. 実験結果	20
2.2.1. NTS は II 型 d1BNST 神経細胞に対して脱分極作用を示した	
2.2.2. II 型 d1BNST 神経細胞に対する NTS の脱分極作用に関与するコンダクタンス変化	
2.2.3. II 型 d1BNST 神経細胞に対する NTS の脱分極作用における PLC と PKC の関与の検討	
2.2.4. CaMKII 阻害薬の存在下では、NTS に対して異なる反応を示す 2 つのグループの II 型 d1BNST 神経細胞が観察された	

2.2.5.	NTS は PKA 阻害薬の存在下で II 型 d1BNST 神経細胞に過分極作用を示した	
2.2.6.	PKA 阻害薬と CaMKII 阻害薬の両者存在下では, NTS は II 型 d1BNST 神経細胞に対して脱分極作用も過分極作用も示さなかった	
2.3.	考察	27
	結語	30
	参考文献	31
	謝辞	35

略語表

5-HT	5-hydroxytryptamine
AC	adenylate cyclase
BNST	bed nucleus of the stria terminalis
BSA	bovine serum albumin
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate
CeA	central amygdaloid nucleus
CRF	corticotropin releasing factor
dlBNST	dorsolateral subdivision of the BNST
DMSO	dimethyl sulfoxide
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
I _h	hyperpolarization-activated current
IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
I-V	current-voltage
LH	lateral hypothalamus
Na ₂ ATP	adenosine 5'-triphosphate disodium salt
Na ₂ GTP	guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate
NTS	neurotensin
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
TTX	tetrodotoxin
VTA	ventral tegmental area

使用試薬

BSA	Sigma, St Louis, MO, USA
CaCl ₂	和光純薬工業（株），大阪, 日本
calphostin C	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
CRF (Human, Rat)	ペプチド研究所（株），美濃, 日本
DMSO	和光純薬工業（株），大阪, 日本
EGTA	Sigma, St Louis, MO, USA
forskolin	Sigma, St Louis, MO, USA
gluconic acid	和光純薬工業（株），大阪, 日本
glucose	和光純薬工業（株），大阪, 日本
HEPES	同仁化学研究所（株），熊本
KCl	Sigma, St Louis, MO, USA
KH ₂ PO ₄	和光純薬工業（株），大阪, 日本
KN93	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
KOH	和光純薬工業（株），大阪, 日本
KT5720	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
kynurenic acid	Sigma, St Louis, MO, USA
MgCl ₂ ·6H ₂ O	和光純薬工業（株），大阪, 日本
Na ₂ ATP	Sigma, St Louis, MO, USA
Na ₂ GTP	Sigma, St Louis, MO, USA
NaCl	Sigma, St Louis, MO, USA
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	和光純薬工業（株），大阪, 日本
NaHCO ₃	Sigma, St Louis, MO, USA
Rp-cAMPS	Sigma, St Louis, MO, USA
spermine	Sigma, St Louis, MO, USA
SR142948	Sigma, St Louis, MO, USA
TTX	和光純薬工業（株），大阪, 日本

序章

種々のストレス因子により生起される負情動は、生体への警告系として不可欠な機能を果たしており、生体が危険な状況におかれた際に適切に対処するための適応的なメカニズムである。一方で、ストレス因子の長期暴露による持続的な負情動は、うつ病や不安障害などの精神疾患発症につながり有害な結果を招く可能性がある¹⁻³。しかしながら、負情動生起のメカニズムには未だ不明な点が多く、負情動生起のメカニズムの解明と、それに基づく治療法や予防的介入法の開発は喫緊の課題となっている。

分界条床核(BNST)と扁桃体中心核(CeA)は拡張扁桃体を形成しており⁴、恐怖、不安、嫌悪などの負情動の生成・制御に関与している^{5,6}。Hammack らは、ラット BNST の背外側部分 (dlBNST) において、ホールセルパッチクランプ記録を用いて、電気生理学的に性質の異なる3つの細胞タイプを報告している⁷。I型神経細胞は、過分極電流注入時に過分極活性化カチオン電流 (I_h) によると考えられる脱分極サグが観察され、脱分極電流注入時には規則的な発火パターンが見られる。II型神経細胞は、過分極電流注入時の脱分極サグと、脱分極電流注入時のバースト発火により特徴付けられる。III型神経細胞は、過分極電流注入時に脱分極サグを示さない。Hammack らは、5-HT 受容体の各サブタイプの発現がこの3つのタイプの dlBNST 神経細胞間で異なっていることも報告している⁸。これらの知見から、負情動生成・制御において dlBNST 神経細胞の各タイプがそれぞれ異なる役割を果たしていることが推測される。

負情動生成・制御における dlBNST 内の I-III 型神経細胞の役割に関し、コルチコトロピン放出因子 (CRF) が、ラットの II 型 dlBNST 神経細胞に特異的に作用し、その興奮性を調節することで、嫌悪行動を引き起こすことが報告されている⁹。具体的には、CRF を dlBNST 内に投与すると、条件付場所嫌悪性試験において嫌悪行動が誘発されることや、ホールセルパッチクランプ記録を用いた電気生理学的実験において、CRF を処置すると、I 型や III 型の dlBNST 神経細胞の膜電位には影響を与えず、II 型神経細胞を特異的に脱分極する。加えて、dlBNST 内のニューロペプチド Y (NPY) の受容体が活性化されると、II 型 dlBNST 神経細胞が選択的に過分極され、CRF による嫌悪行動が抑制される。これらの知見は、II 型神経細胞の興奮性調節が負情動生成・制御に重要であることを示唆している。しかしながら、CRF の興奮作用の基盤となる細胞内シグナル伝達経路は明らかになっていない。

ニューロテンシン(NTS)は13アミノ酸残基よりなる神経ペプチドで、BNSTを含むさまざまな脳領域に広く発現しており¹⁰、中枢神経系において多様な生理的・病態生理的役割を果たしている¹¹⁻¹³。NTS 受容体である NTS1 と NTS2 は、Gq タンパク質とカップリングすることが特徴とされている¹⁴。最近、Normandeau ら¹⁵は、CRF と NTS の両方が背側 BNST における抑制性シナプス伝達を調節すること、また、非選択的な NTS 受容体アンタゴニストを BNST 内に微量注入すると、慢性ストレスによって誘発される高架式十字迷路試験における不安様行動が抑制されることを報告した。しかし、NTS が II 型 dlBNST 神経

細胞にどのような作用を及ぼすかについては未だ明らかなではない。

以上より、本研究では、分界条床核 II 型神経細胞の興奮性に対する CRF および NTS の作用とそれら作用に関わる細胞内情報伝達の解明を目的とした。第 1 章では CRF の II 型 dlBNST 神経細胞に対する脱分極作用に関与する細胞内シグナル伝達経路を検討し、第 2 章では II 型 dlBNST 神経細胞の興奮性に及ぼす NTS の作用と、それに関わる細胞内シグナル伝達経路を検討した。

第1章 分界条床核 II 型神経細胞に対する CRF の効果と細胞内情報伝達

1.1. 実験方法

1.1.1. 使用動物

実験には全て雄性 Sprague-Dawley 系ラット (3–7 週齢) (日本 SLC, 浜松) を使用した。動物は、室温が $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間 (明期; 7:00-19:00, 暗期; 19:00-7:00), さらに摂食・飲水が自由に行える環境下で飼育した。なお、実験は全て「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定 (平成 19 年 4 月 1 日)」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守し、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を得て行った。

1.1.2. 使用薬物

CRF のストック溶液は、0.1% BSA 含有 H_2O を用いて、1 mM に調製した。TTX, Rp-cAMPS のストック溶液は、 H_2O を用いて、それぞれ 1 mM, 10 mM に調製した。Forskolin, KT5720, KN93, U73122 のストック溶液は、DMSO を用いて、それぞれ 1 mM, 10 mM, 10 mM, 10 mM に調製した。ストック溶液は、実験に使用するまで -30°C で保存した。

細胞外適用前に、CRF のストック溶液を 0.01% BSA 含有 normal ringer 液で最終濃度 1 μM に希釈し、forskolin は normal ringer 液で最終濃度 10 μM に希釈した。Normal ringer 液は以下の組成で調製した：125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 2.0 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 26 mM NaHCO_3 , 25 mM glucose。細胞内適用の際には、KT5720, U73122, KN93 および Rp-cAMPS のストック溶液は、ピペット内液で最終濃度がそれぞれ 1 μM , 10 μM , 10 μM , 100 μM になるように希釈した。ピペット内液は以下の組成で調製した：150 mM KOH, 2 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.2 mM EGTA, 2 mM Na_2ATP , 0.3 mM Na_2GTP , 10 mM HEPES, 0.1 mM spermine, gluconic acid により pH を 7.3–7.4 に調製。

1.1.3. 脳スライス作製

イソフルランを用いて麻酔したラットを断頭後、素早く脳を取り出して 95% O_2 / 5% CO_2 で通気した氷冷 modified ringer solution に浸した。Modified ringer solution は以下の組成で調製した：130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.1 mM KH_2PO_4 , 1.0 mM CaCl_2 , 6.0 mM MgCl_2 , 30 mM NaHCO_3 , 10 mM glucose, 2 mM kynurenic acid。ビブラトーム (VT1200S; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて BNST を含む冠状断スライス (250 μm) を作製し、95% O_2 / 5% CO_2 で通気した $33\text{--}35^{\circ}\text{C}$ の normal ringer 液内で 30 分間、室温の normal ringer 液内でさらに 30 分間以上インキュベーションした後に実験に使用した。

1.1.4. Whole-cell patch clamp 法による電気生理学的解析

研究用ステージ固定式顕微鏡 (BX-51WI, Olympus, 東京) 上に記録チャンバーを置き, 95% O₂/5% CO₂ で通気した normal ringer 液 (約 34°C に加温) を流速 1-1.5 mL/min で灌流させた。この記録チャンバーに脳スライスを置き, 赤外線 CCD カメラ (model IR-1000, Dage-MTI, Michigan City, IN) を使用して可視化した dlBNST 神経細胞から whole-cell 記録を行った。記録電極はガラスキャピラリー (GC150F-10, HARVARD APPARATUS Co., Natick, MA) からプラー (Model P-1000, Sutter Instrument, Novato, CA) を使用して作製し, ピペット内液で満たしたときに抵抗値が 4.0-9.0 MΩ になるものを実験に使用した。実験データの記録と解析には Multiclamp 700B amplifier および pClamp10 software (Molecular Devices, Foster City, CA) を使用した。直列抵抗は 70-80% 補正し, 値が 20% 以上変化した場合は解析から除外した。

1.1.5. 電気生理学的性質に基づく dlBNST 神経細胞の分類

dlBNST 神経細胞は, I-III 型の 3 種類に分類されることが報告されている⁷。本研究においても, 過分極性および脱分極性の電流を注入することによって誘導される膜電位応答に基づき, 神経細胞を分類した。カレントクランプモードで, 膜電位をおよそ -60 mV に調節し, -40 pA ずつ変化する矩形波電流 (400 ミリ秒) を 0 pA から最大 -360 pA まで注入することによる神経細胞の過分極応答を記録した。一方, 脱分極応答は, 神経細胞の膜電位をおよそ -80 mV に調節し, 40 pA ずつ増加する矩形波電流 (400 ミリ秒) を 0 pA から最大 160 pA まで注入することで記録した。過分極性電流を注入したときに脱分極サグが見られ, 脱分極性電流を注入したときに規則的な発火応答が見られる神経細胞を I 型として分類した。一方, 過分極性電流を注入したときに脱分極サグに加えてリバウンド発火が見られ, 脱分極性電流を注入するとバースト発火が見られる神経細胞を II 型として分類した。過分極性電流を注入しても脱分極サグが見られず, 脱分極性電流を注入したときに規則的な発火応答が見られる細胞は III 型として分類した。活動電位の振幅 (閾値とピークの差) が 30 mV 未満の神経細胞は解析から除外した。II 型神経細胞のみを後述する実験に使用した。

1.1.6. Holding current の測定

ボルテージクランプモードで細胞の膜電位を -70 mV に固定した。活動電位依存的なシナプス伝達を阻害するために, TTX (1 μM) 存在下で測定を実施した。Holding current の測定は, 20 秒ごとに 1 秒間の解析区間を設定し, 区間内の holding current の平均値を求めた。3 分以上の安定した holding current を確認した後, 各種阻害薬の存在下あるいは非存在下において 1 μM の CRF を 2 分間にわたって記録チャンバー内に灌流し, CRF 適用開始直前の 3 分間および適用開始後 12-15 分の期間の holding current を測定した。Forskolin 適用の実験では, 10 μM の forskolin を 5 分間にわたって記録チャンバー内に灌流し, forskolin 投与開始直前の 3 分間と投与開始後 7-10 分間の holding current を測定した。薬物の効果は, この 2 つの期間の holding current の平均値を比較することで評価した。

1.1.7. 電流-電圧(I-V)曲線の測定と電流変化の解析

ボルテージクランプモードで細胞の膜電位を-70 mV に固定し、TTX (1 μ M) 存在下で測定を実施した。電流-電圧 (I-V) 曲線を測定するために、以前の研究¹⁶に変更を加えた電圧ランププロトコルを採用した。20 秒ごとに、膜電位を 0mV に脱分極させた後、0.1mV/ms の速度で-120 mV に過分極させた。I-V 曲線の解析には、-30 mV から-120 mV への降下段階で観察された電流応答を用いた。

CRF または forskolin をそれぞれ 2 分または 5 分適用させたときに生じた正味の電流変化は、CRF または forskolin を適用してから 12-15 分後または 7-10 分後に生じた電流応答から、CRF または forskolin を適用する直前 3 分間に生じた電流応答を差し引くことによって求めた。電圧は、Clampex (Molecular Devices 社) の JPCalc を用いて計算された 15mV の液体ジャンクション電位による補正を実施した。

1.1.8. 統計解析

データは全て、mean $\pm$ SEM で表した。統計解析には、GraphPad Prism v.6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用い、paired *t*-test もしくは one-way repeated measured ANOVA followed by Sidack's post hoc multiple comparisons test により行った。有意差は $P < 0.05$ のレベルで評価した。

1.2. 実験結果

1.2.1. PKA 阻害薬は CRF による II 型 dIBNST 神経細胞の脱分極作用を抑制した

II 型 dIBNST 神経細胞に対する CRF の興奮作用への PKA の関与を調べるために、ホールセルパッチクランプ法を用いて検討した。ボルテージクランプモードで測定を行い、PKA 阻害薬である KT5720 および Rp-cAMPS の holding current への影響を調べた。まず、CRF 単独適用の効果を調べたところ、既報⁹のように、CRF を処置したことにより、holding current は -38.7 ± 5.2 pA から -46.7 ± 5.0 pA へと有意に変化した ($n = 14$ cells from 11 rats, $t = 4.677$, $P = 0.0004$, paired t -test; Fig.1B)。CRF の作用に関与するコンダクタンス変化を調べるために、電圧ランププロトコルを適用して、I-V 曲線に対する CRF の効果を検討した。Fig. 1C に、 -30 mV から -120 mV までの電圧ランプパルスに対する CRF 適用前 (Pre) と適用後 (Post) の代表的な電流応答を示した。CRF 処置による正味の電流変化についても既報と同様に、コンダクタンスを減少させる細胞群とコンダクタンスを増加させる細胞群が存在することが認められ、それらを IIa 型および IIb 型として分類して解析した (Fig.1E)。IIa 型細胞は 14 細胞中 4 細胞で、IIb 型細胞は 14 細胞中 10 細胞で観察された。IIa 型細胞の平均トレースから算出される逆転電位は -105.9 ± 5.0 mV であり (Fig.1E, left), ネルンスト式から算出されたカリウム平衡電位 (-109.3 mV) に類似した値であった。IIb 型細胞の平均トレースから算出される逆転電位は -57.0 ± 4.7 mV であり (Fig.1E, right), 非選択的カチオンチャネルの寄与が示唆された。

PKA 阻害薬の存在下では、CRF 処置前後の holding current に有意な差はなく、CRF の興奮作用が抑制された (Fig.2,3)。具体的には、ピペット内液に KT5720 を添加した場合、CRF 処置前後の holding current は、それぞれ -41.6 ± 10.0 および -46.1 ± 8.8 pA であった ($n = 7$ cells from 7 rats, $t = 1.674$, $P = 0.1451$, paired t -test; Fig. 2A)。CRF によって誘発される正味の電流変化は、KT5720 の存在下ではほぼ認められなかった (Fig. 2B)。ピペット内液に Rp-cAMPS を添加した場合、CRF 処置前後の holding current はそれぞれ -34.7 ± 3.7 および -35.3 ± 3.4 pA であった ($n = 6$ cells from 6 rats, $t = 0.342$, $P = 0.7443$, paired t -test; Fig.3A)。CRF によって誘発される正味の電流は、Rp-cAMPS の存在下ではほぼ認められなかった (Fig.3B)。

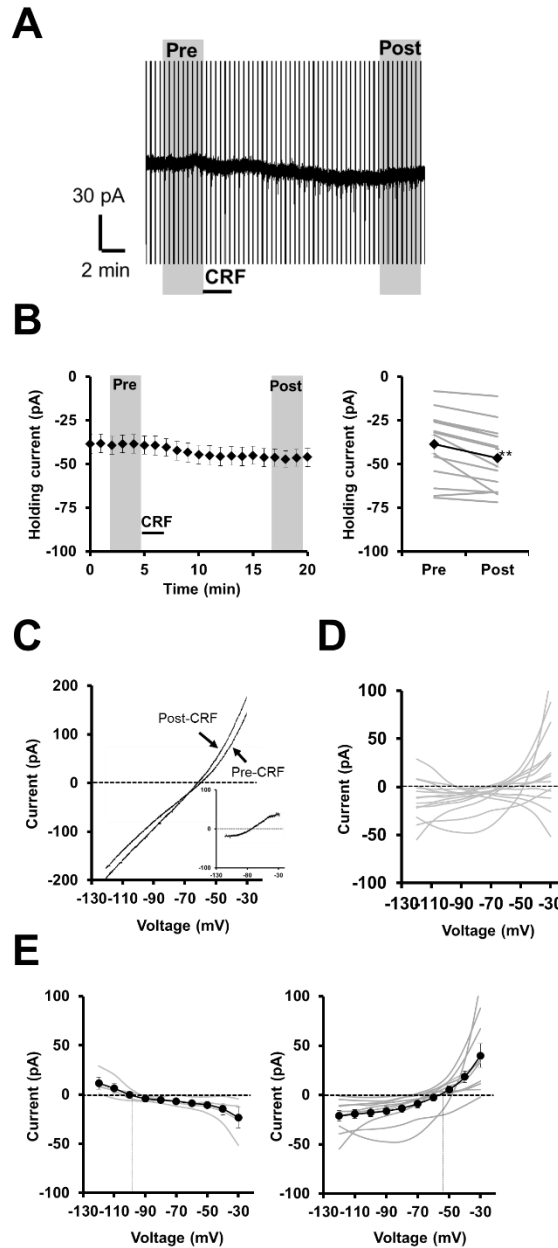
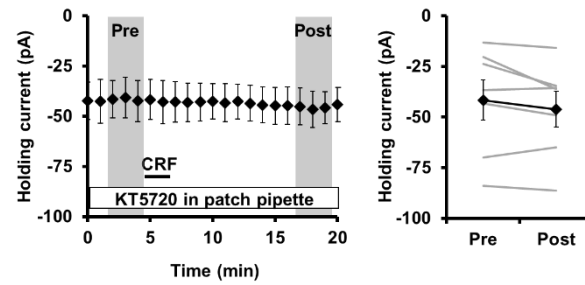


Fig.1 II型 dBNST 神経細胞に対する CRF の効果と関連するコンダクタンス

A, ボルテージクランプ法による記録の代表的なトレース。B, CRF (1 μ M, 2 分) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と CRF 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。** $P < 0.01$ (Pre vs. Post; paired t -test)。C, Pre, Post の期間における, -30 mV から -120 mV の電圧ランプパルスに対する代表的な電流応答図。挿入図は, 電流の差し引き (CRF 誘導電流) を示す。D, II 型 dBNST 神経細胞における CRF 誘導電流の全トレース。E, IIa(左), IIb(右)に分類したときの平均トレース。灰色の線は, 個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。

A



B

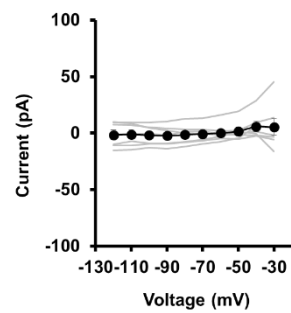


Fig.2 KT5720 存在下におけるⅡ型 dIBNST 神経細胞に対する CRF の効果

A, KT5720 (PKA 阻害薬, ピペット内液中 1 μ M) の存在下における CRF (1 μ M) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と CRF 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。B, KT5720 存在下における CRF 誘導電流の平均トレース。灰色の線は個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。

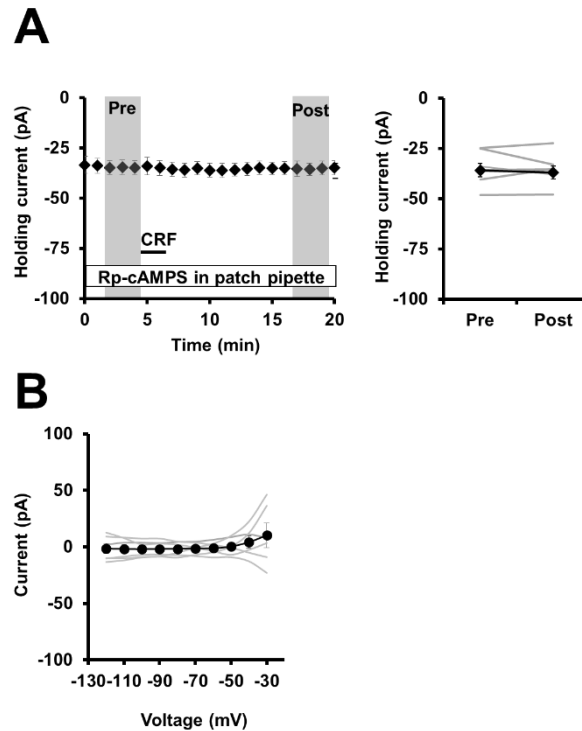


Fig.3 Rp-cAMPS 存在下における II 型 dIBNST 神経細胞に対する CRF の効果

A, Rp-cAMPS (PKA 阻害薬, ピペット内液中 100 μM) の存在下における CRF (1 μM) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と CRF 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値±SEM で表した。B, Rp-cAMPS 存在下における CRF 誘導電流の平均トレース。灰色の線は個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値±SEM で表した。

1.2.2. Forskolin は II 型 dIBNST 神経細胞における CRF の興奮作用を模倣した

AC 活性化薬である forskolin が II 型 dIBNST 神経細胞の holding current に及ぼす影響を調べた。CRF の場合と同様に, forskolin を処置すると, holding current は -36.8 ± 3.5 から -49.8 ± 4.3 pA へと有意に変化した ($n = 14$ cells from 11 rats, $t = 5.209$, $P = 0.0001$, paired t test; Fig. 4B)。forskolin の作用に関与するコンダクタンス変化を調べるために, 電圧ランププロトコルを適用して, I-V 曲線に対する forskolin の効果を検討した(Fig. 4C)。CRF の場合と同様に, forskolin による正味の電流変化から, コンダクタンスを減少させる細胞群とコンダクタンスを増加させる細胞群が存在することが示された(Fig. 4D)。コンダクタンス減少を示す細胞群は 14 細胞中 3 細胞で, コンダクタンス増加を示す細胞群は 14 細胞中 11 細胞で観察された。コンダクタンス減少を示す細胞群の平均トレースから算出される逆転電位は -103.1 ± 7.8 mV であり(Fig. 4E, left), コンダクタンス増加を示す細胞群の

平均トレースから算出される逆転電位は -57.1 ± 7.1 mV であった(Fig. 4E, right)。

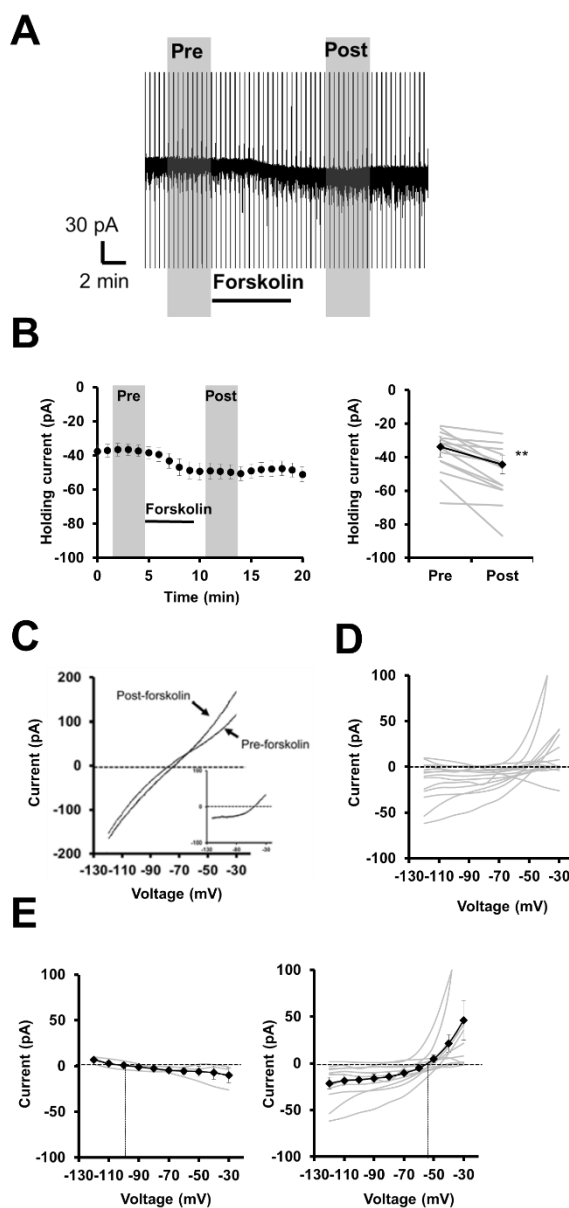


Fig.4 II型 dBNST 神経細胞に対する forskolin の効果と関連するコンダクタンス

A, ボルテージクランプ法による記録の代表的なトレース。B, Forskolin (10 μ M, 5 分) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と forskolin 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 7-10 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。** $P < 0.01$ (Pre vs. Post; paired t -test)。C, Pre, Post の期間における, -30 mV から -120 mV の電圧ランプパルスに対する代表的な電流応答図。挿入図は, 電流の差し引き (forskolin 誘導電流) を示す。D, II 型 dBNST 神経細胞における forskolin 誘導電流の全トレース。E, Forskolin 誘導電流を, コンダクタンス減少を示した細胞群(左)と, コンダクタンス増加を示した細胞群(右)に分類したときの平均トレース。灰色の線は, 個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値 $\pm$

SEM で表した。

Forskolin を処置した後に CRF 適用した場合の作用を検討した。Forskolin を処置することで, holding current は -33.8 ± 6.2 から -44.4 ± 5.6 pA に有意に変化した ($n = 7$ cells from 5 rats, $F_{1,355, 9.486} = 6.654$, $P = 0.0223$, one-way repeated measures ANOVA; Pre vs. Post1: $t = 3.471$, $P = 0.0394$, Sidack's *post hoc* test)。Forskolin 処置後に, CRF を適用しても更なる holding current の変化は観察されなかった (-42.1 ± 4.3 pA; Post1 vs. Post2: $t = 1.002$, $P = 0.7317$, Sidack's *post hoc* test, Fig.5C)。

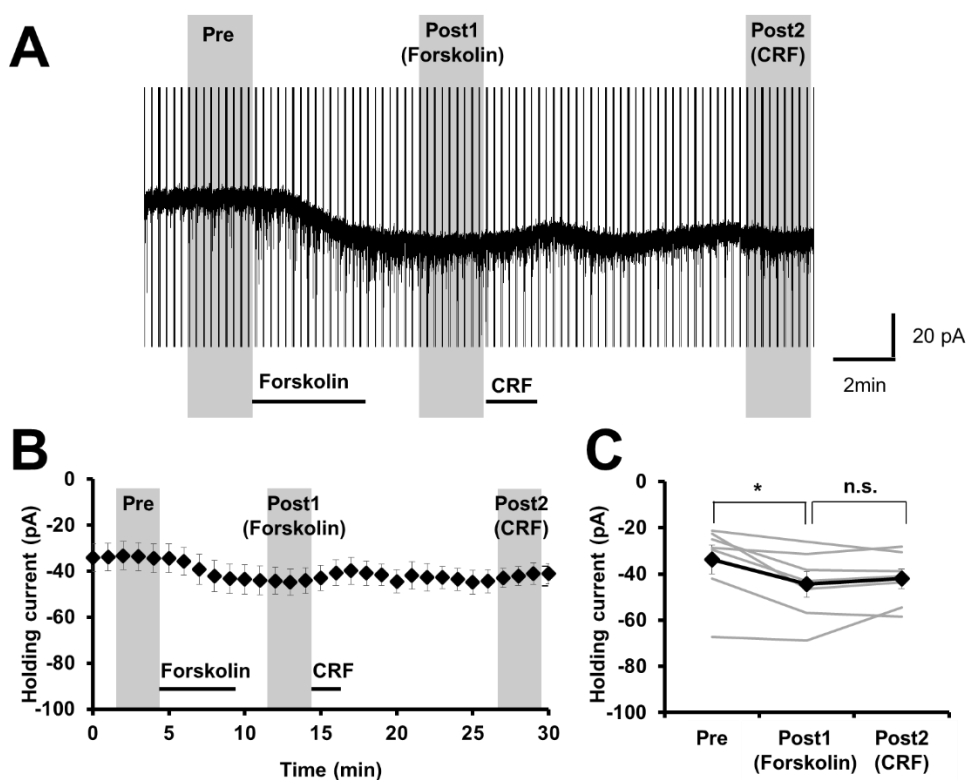


Fig.5 Forskolin 前処置後における II 型 dBNST 神経細胞に対する CRF の効果

A: ボルテージクランプ法による記録の代表的なトレース。B: Holding current のタイムコース。Forskolin (10 μ M, 5 分) および CRF (1 μ M, 2 分) の効果は, 網掛けで示した期間 (フォールスコリン処置開始の 0~3 分前[Pre], CRF 処置開始の 0~3 分前[Post1]および 12~15 分後[Post2]の期間) で評価した。C, Pre, Post1, Post2 の各期間における平均 holding current。灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。*P < 0.05 compared to Pre (Sidack's *post hoc* test)。

1.2.3. PLC 阻害薬および CaMKII 阻害薬は CRF による II 型 dIBNST 神経細胞の脱分極作用を抑制しなかった

CRF の脱分極作用に PLC の活性化が関与しているかどうかを調べるために、PLC 阻害薬である U73122 をピペット内液に加えた。U73122 は、CRF の脱分極作用に影響を与えなかった。CRF は U73122 存在下でも holding current を -34.2 ± 9.6 pA から -43.2 ± 10.9 pA に有意に変化させた ($n = 9$ from 9 rats, $t = 4.45$, $P = 0.0022$, paired t -test ; Fig. 6A)。CRF による正味の電流変化から、コンダクタンスを減少させる細胞群とコンダクタンスを増加させる細胞群が存在することが示され、それぞれの平均トレースから算出される逆転電位は -82.2 ± 7.7 mV, -47.4 ± 5.3 mV であった (Fig. 6B)。

CRF の脱分極作用に CaMKII の活性化が関与しているかどうかを調べるために、CaMKII 阻害薬である KN93 をピペット内液に加えた。KN93 は、CRF の脱分極作用に影響を与えなかった。CRF は KN93 存在下でも holding current を -48.1 ± 6.8 pA から -54.5 ± 6.7 pA に有意に変化させた ($n = 10$ from 10 rats, $t = 4.48$, $P = 0.0015$, paired t -test ; Fig. 7A)。CRF による正味の電流変化から、コンダクタンスを減少させる細胞群とコンダクタンスを増加させる細胞群が存在することが示され、それぞれの平均トレースから算出される逆転電位は -83.7 ± 9.0 mV, -60.3 ± 7.6 mV であった (Fig. 7B)。

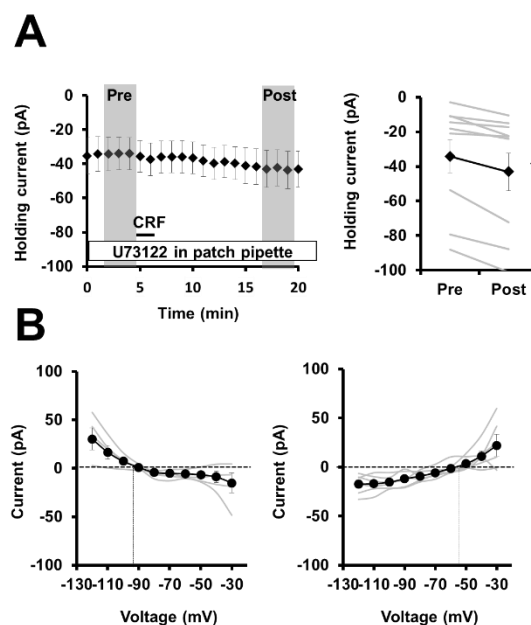


Fig.6 U73122 存在下における II 型 dIBNST 神経細胞に対する CRF の効果

A, U73122 (PLC 阻害薬, ピペット内液中 10 μ M) の存在下における CRF (1 μ M) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と CRF 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。* $P < 0.05$ (Pre vs. Post; paired t -test)。B, U73122 存在下における CRF 誘導電流を, コンダクタンス減少を示した細胞群(左)と, コンダクタン

ス増加を示した細胞群(右)に分類したときの平均トレース。灰色の線は個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値±SEM で表した。

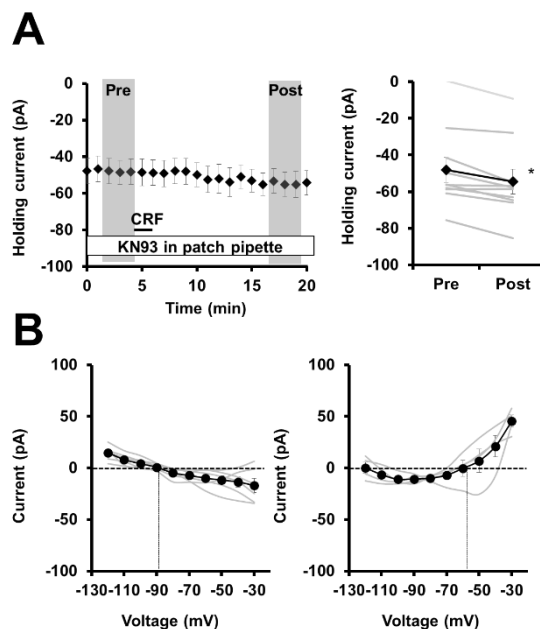


Fig.7 KN93 存在下における II 型 dBNST 神経細胞に対する CRF の効果

A, KN93 (CamKII 阻害薬, ピペット内液中 10 μ M) の存在下における CRF (1 μ M) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と CRF 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値±SEM で表した。* $P < 0.05$ (Pre vs. Post; paired t -test)。B, KN93 存在下における CRF 誘導電流を, コンダクタンス減少を示した細胞群(左)と, コンダクタンス増加を示した細胞群(右)に分類したときの平均トレース。灰色の線は個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値±SEM で表した。

1.3. 考察

CRF 受容体が Gs タンパク質とカップリングして AC を活性化することは, 多くの文献で報告されている^{17,18}。そこで, AC-cAMP-PKA 経路が CRF の II 型 dBNST 神経細胞に対する脱分極作用に関与しているか否かを, 2 種類の PKA 阻害薬, Rp-cAMPS と KT5720 を用いて検討した。KT5720 は PKA の触媒サブユニットに結合して PKA の活性を阻害し, Rp-cAMPS は PKA の制御サブユニットにおいて cAMP と競合することで PKA の活性化を阻害する¹⁹。抑制機構の異なる 2 種類の PKA 阻害剤が CRF の脱分極作用を抑制したことから, II 型 dBNST 神経細胞の脱分極作用には PKA の活性化が重要であると考えられる。

II 型 dBNST 神経細胞は, forskolin に対する反応の違いによっても 2 つのグループに

分類できることが明らかとなった。Forskolin による正味の電流の逆転電位は、以前の報告⁹および本研究において CRF による正味の電流の結果にもとづき分けられた IIa, IIb の逆転電位と近似していた。さらに, forskolin を前処理すると, CRF の脱分極作用が観察されなかった。これらの結果は, forskolin と CRF の作用には共通した細胞内情報伝達が関与していることを示唆している。CRF が, カリウムコンダクタンスの減少とカチオンコンダクタンスの増加という 2 つの異なるイオンメカニズムによって神経細胞を脱分極させること, それら脱分極作用は PKA 阻害薬で抑制されること, さらに, forskolin で模倣されることは, 青斑核のニューロペプチド S 発現神経細胞においても報告されている²⁰。

CRF 受容体は, PLC-PKC 経路²¹や CaMKII 経路²²など, AC-cAMP-PKA 経路以外のシグナル伝達経路にも共役していることが報告されている。II 型 dlBNST 神経細胞における CRF の作用にこれらの経路が関与しているか否かを調べるために, PLC 阻害薬である U73122 と CaMKII 阻害薬である KN93 を用いて CRF の脱分極作用への影響を検討した。いずれの阻害薬も, CRF の脱分極作用を抑制せず, CRF 単独適用の場合と同様にコンダクタンス増加と減少の両方の関与が示された。したがって, PLC-PKC 経路および CaMKII 経路は CRF の脱分極作用に関与していないと考えられた(Fig. 8)。

Hammack らは, II 型 dlBNST 神経細胞の多くが局所回路型の GABA 作動性介在神経細胞であり, 他のタイプの dlBNST 神経細胞と BNST 内でシナプス結合して BNST の出力を制御している可能性を提案している⁷。したがって, CRF によって II 型 dlBNST 神経細胞が興奮すると, II 型 dlBNST 神経細胞からの GABA 遊離が増加し, それにより制御されている出力神経細胞が抑制される可能性が考えられる。この考えを支持する知見として, CRF が III 型 dlBNST 神経細胞の IPSC 頻度を増加させること²³, VTA や LH に投射している dlBNST 神経細胞は 80%以上が III 型神経細胞であること²⁴が報告されている。これらの知見は, II 型 BNST 神経細胞の興奮が, VTA を含む他の脳領域に投射している III 型 BNST 神経細胞を抑制していることを示唆している。VTA に投射する BNST 神経細胞のほとんどが GABA 作動性神経細胞であり, マウス脳において VTA 内の GABA 作動性神経細胞と優先的にシナプス結合することが報告されている²⁵。これまでの報告に本研究結果をあわせて考えると, dlBNST 内の CRF の細胞外レベルが上昇すると, II 型 dlBNST 神経細胞において AC-cAMP-PKA 経路が活性化され, II 型 dlBNST 神経細胞の活動が亢進し, VTA に投射する III 型 dlBNST 神経細胞を抑制することで, VTA GABA 神経細胞への抑制性入力が増加し, VTA ドパミン作動性神経細胞への抑制性入力が増大するという仮説が考えられる。このメカニズムによる VTA ドパミン作動性神経細胞の活動抑制が嫌悪反応を惹起することが考えられる。この仮説を裏付けるように, VTA GABA 神経細胞を光遺伝学的に活性化すると, VTA ドパミン神経細胞の活動が抑制され, 嫌悪反応が惹起されること²⁶。また, VTA に投射する BNST 出力神経細胞を光遺伝学的に活性化すると, 嫌悪反応とは逆の嗜好反応が誘導されることが報告されている²⁷。さらに, 我々は, 行動薬理学実験により, Rp-cAMPS を共投与することで, CRF の dlBNST 内投与により惹起される嫌悪反応が抑制さ

れることを報告している²⁸。

CRFR1 および CRFR2 受容体 mRNA が dlBNST で発現していることが報告されている²⁹。CRFR1 受容体が不安や恐怖などの CRF 誘発性の負情動に重要な役割を果たしていることを示唆する複数の報告があるが、CRFR2 受容体がこれら負情動の生成・制御に果たす役割については議論のあるところである^{30, 31}。Sahuque らは、BNST への CRF 投与によって誘発される不安様行動は、CRFR2 ではなく CRFR1 受容体拮抗薬を共投与することで阻止され、BNST への CRF 投与によって誘発される嫌悪反応は、CRFR1 と CRFR2 の受容体拮抗薬の両方によって阻止されることを報告している。また、痛みによって誘発される場所嫌悪性は、CRFR1 受容体拮抗薬と CRFR2 受容体拮抗薬のいずれによっても抑制されることが報告されている⁹。これらの知見は、不安や嫌悪といった、異なる負情動の生成・制御に異なる神経回路が関与の可能性を示唆している。

以上、第1章の研究により、CRF による AC-cAMP-PKA 経路の活性化が II 型 dlBNST 神経細胞の活動を亢進させ、それが負情動を引き起こす可能性が示された。

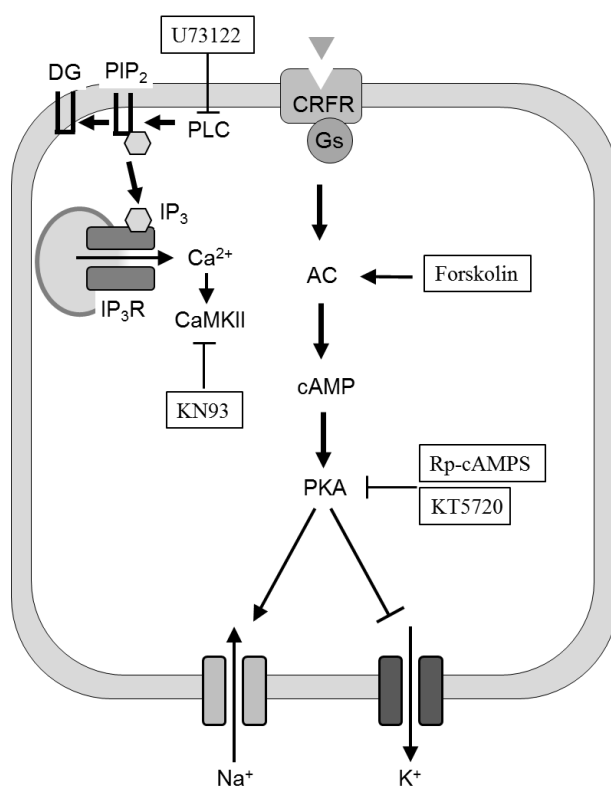


Fig.8 II型 dlBNST 神経細胞の興奮性に対する CRF の効果に関するシグナル伝達経路

第2章 分界条床核 II 型神経細胞に対する NTS の効果と細胞内情報伝達

2.1. 実験方法

2.1.1. 使用動物

実験には全て雄性 Sprague-Dawley 系ラット (8-10 週齢) (日本 SLC, 浜松) を使用した。動物は、室温が $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 明暗周期が 12 時間 (明期; 7:00-19:00, 暗期; 19:00-7:00), さらに摂食・飲水が自由に行える環境下で飼育した。なお, 実験は全て「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定 (平成 19 年 4 月 1 日)」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守し, 国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を得て行った。

2.1.2. 使用薬物

NTS のストック溶液は, 0.1%BSA を含む H_2O で $250 \mu\text{M}$ の濃度に調製した。SR142948, Rp-cAMPS および KN93 のストック溶液は, H_2O で 10 mM の濃度に調製した。Calphostin C および U73122 のストック溶液は, DMSO でそれぞれ 2 mM および 20 mM の濃度に調製した。細胞外適用の前に, NTS ストック液を 0.1%BSA を含む recording solution で最終濃度 250 nM に希釈した。SR142948 は最終濃度 $10 \mu\text{M}$ に希釈した。細胞内適用の際には, calphostin C, U73122, KN-93 および Rp-cAMPS のストック溶液を, ピペット内液でそれぞれ $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ の最終濃度に希釈した。ピペット内液の組成は 1.1.2 に従って調製した。

2.1.3. 脳スライス作製

ラットをペントバルビタールナトリウムで深麻酔し, $95\% \text{ O}_2/5\% \text{ CO}_2$ で通気した氷冷 cutting solution で経的に灌流した。Cutting solution は以下の組成で調製した: 92 mM N-methyl-D-glucamine, 2.5 mM KCl, 30 mM NaHCO_3 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 25 glucose , 5 ascorbic acid , 0.5 CaCl_2 , 20 HEPES , 10 MgSO_4 , 2 thiourea , $3 \text{ sodium pyruvate}$, and $12 \text{ N-acetyl-L-cysteine}$, 塩酸で $\text{pH} 7.3 \pm 0.1$ に調整。脳を速やかに取り出し, ビブラトーム (VT1200S; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて氷冷した cutting solution 中で BNST を含む冠状断スライス (厚さ $250 \mu\text{m}$) を作製した。脳スライスを $30-33^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした後, $95\% \text{ O}_2/5\% \text{ CO}_2$ で通気した recording solution の中で少なくとも 30 分間以上室温で保管した。Recording solution は以下の組成で調製した: 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 24 mM NaHCO_3 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 12.5 mM glucose, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgSO_4 。

2.1.4. Whole-cell patch clamp 法による電気生理学的解析

1.1.4 に従って実施した。灌流液は recording solution を使用した。

2.1.5. 電気生理学的性質に基づく dlBNST 神経細胞の分類

1.1.5 に従って分類した。

2.1.6. 膜電位と入力抵抗の測定

膜電位は負または正の電流を注入して約 -70mV に設定した。活動電位によるシナプス伝達を抑制するために、 $1\text{ }\mu\text{M}$ の TTX を記録液に加えた。入力抵抗は、負の電流 (-80 pA , 200 ms) を 5 秒ごとに注入して膜電位の変化を測定し、膜電位と入力抵抗の 1 分間毎の平均を求めた。少なくとも 5 分間、膜電位と入力抵抗が安定していることを確認した後、 250 nM NTS を 5 分間灌流した。NTS による膜電位の変化に対する SR142948 の効果を評価する実験では、NTS 適用の 10 分前に SR142948 の灌流を開始し、実験の終了まで続けた。NTS の効果を、NTS 処置開始直前の 3 分間と NTS 処置開始 12-15 分後の 3 分間の平均値を比較することで検討した。

2.1.7. Holding current の測定

1.1.6 に従って測定した。3 分以上安定した holding current を確認した後、 250 nM NTS を酵素阻害薬の非存在下または存在下で 5 分間灌流した。Holding current は、NTS 処置開始直前の 3 分間と処置開始 12-15 分後の 3 分間の平均値を比較した。

2.1.8. 電流-電圧(I-V)曲線の測定と電流変化の解析

1.1.7 に従って測定した。NTS を 5 分適用させたときに生じた正味の電流変化は、NTS を適用してから 12-15 分後に生じた電圧ランププロトコルに対する電流応答から、NTS を適用する直前の 3 分間に生じた電流応答を差し引くことによって決定した。電圧は、Clampex (Molecular Devices 社) の JPCalc を用いて計算された 15mV の液体ジャンクション電位による補正を実施した。

2.1.9. 統計解析

データは平均値±平均標準誤差 (SEM) で表した。データは、paired t test を用いて解析し、有意差は $P < 0.05$ のレベルで評価した。

2.2 実験結果

2.2.1 NTS は II 型 dlBNST 神経細胞に対して脱分極作用を示した

NTS を 250nM で 5 分間処置した際に、II 型 dlBNST 神経細胞の膜電位と入力抵抗にどのような影響があるのかを、ホールセルパッチクランプ法を用いカレントクランプモードで検討した。NTS は、膜電位を -69.1 ± 0.5 mV から -66.9 ± 0.8 mV に、入力抵抗を 302.1 ± 31.1 M Ω から 317.6 ± 30.3 M Ω に、それぞれ有意に変化させた ($n = 6$ cells from 5 rats, 膜電位: $t_0 = 3.61$, $P = 0.015$, paired t -test, 入力抵抗: $t_0 = 2.72$, $P = 0.042$, paired t -test, Fig. 9B)。

非選択的な NTS 受容体アンタゴニストである SR142948 の存在下では、NTS 処置の前後で、膜電位および入力抵抗に有意な変化は認められなかった ($n = 6$ cells from 3 rats, 膜電位: -70.6 ± 1.1 mV [NTS 処置前] vs. -71.2 ± 1.6 mV [NTS 処置後], $t = 0.79$, $P = 0.464$, paired t -test; 入力抵抗: 278.4 ± 36.1 M Ω [NTS 処置前] vs. 293.1 ± 42.2 M Ω [NTS 処置後], $t = 1.92$, $P = 0.112$, paired t -test, Fig. 9C)。

2.2.2. II 型 dlBNST 神経細胞に対する NTS の脱分極作用に關与するコンダクタンス変化

II 型 dlBNST 神経細胞に対する NTS の脱分極作用に關与するコンダクタンスを調べるために、ボルテージクランプモードで、holding current と、電圧ランププロトコルを適用することで得られる I-V 曲線に対する NTS の効果を検討した。カレントクランプモードによる電気生理学的解析で觀察されたように、250nM の NTS は holding current を -64.6 ± 7.3 pA から -71.9 ± 7.3 pA に変化させ ($n = 8$ cells from 5 rats, $t = 2.77$, $P = 0.028$, paired t -test, Fig. 10B), 脱分極作用を示した。Fig. 10C は、 -30 mV から -120 mV までの電圧ランプパルスに対する代表的な電流応答を、NTS 適用前 (Pre) と適用後 (Post) に分けて示している。NTS によって誘発された正味の電流変化を平均化したトレースから算出される逆転電位は -89.2 ± 4.5 mV であった (Fig. 10D)。

2.2.3. II 型 dlBNST 神経細胞に対する NTS の脱分極作用における PLC と PKC の關与の検討

NTS の脱分極作用に PLC 活性化が關与しているかどうかを調べるために、PLC 阻害薬である U73122 をピペット内液に加えた。U73122 存在下では、NTS 適用前後の holding current に有意な差は認められなかった ($n = 8$ cells from 5 rats, holding current: -46.0 ± 3.5 pA [NTS 処置前] vs. -51.2 ± 3.5 pA [NTS 処置後], $t = 1.70$, $P = 0.13$, paired t -test, Fig. 11A)。NTS によって誘発される正味の電流変化は、U73122 の存在下では觀察されなかった (Fig. 11B)。

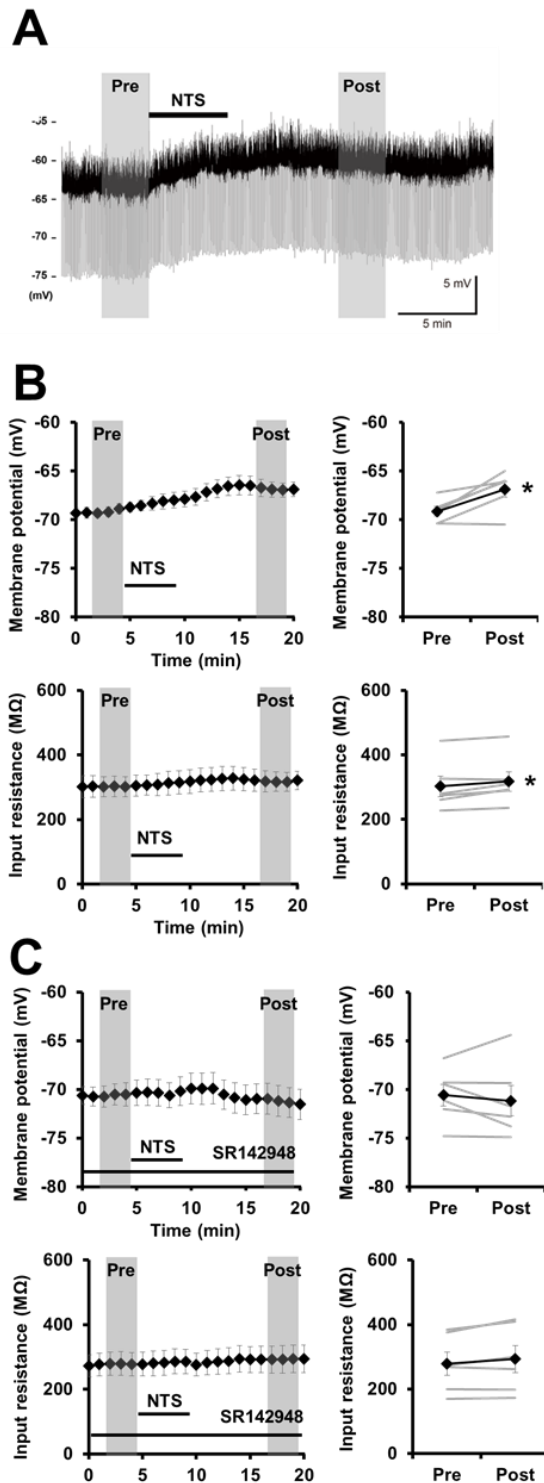


Fig.9 II型 dBNST 神経細胞の膜電位と入力抵抗に対する NTS の効果

A, カレントクランプ法による記録の代表的なトレース。B, C, SR142948(10 μ M)の非存在下(B)または存在下(C)における NTS(250nM, 5 分)の膜電位および入力抵抗に対する効果。上段のパネルは、膜電位のタイムコース(左)と NTS 投与

開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均膜電位(右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。下段のパネルは、入力抵抗のタイムコース(左)と NTS 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均入力抵抗(右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。 $*P < 0.05$ (Pre vs. Post ; paired t test)。

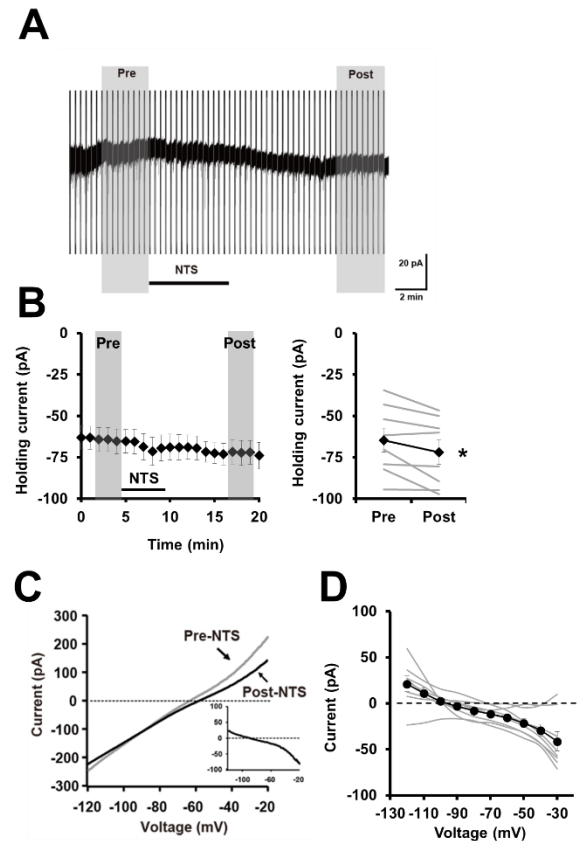


Fig.10 II 型 dIBNST 神経細胞に対する NTS の効果と関連するコンダクタンス

A, ボルテージクランプ法による記録の代表的なトレース。B, NTS (250 nM) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と NTS 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。 $*P < 0.05$ (Pre vs. Post; paired t test)。C, Pre, Post の期間における, -30 mV から-120 mV の電圧ランブパルスに対する代表的な電流応答図。挿入図は, 電流の差し引き (NTS 誘導電流) を示す。D, II 型 dIBNST 神経細胞における NTS 誘導電流の平均トレース。灰色の線は, 個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。

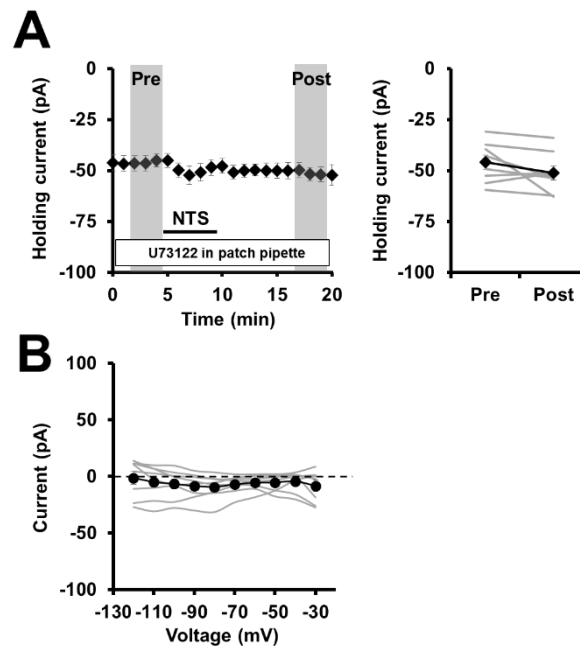


Fig.11 U73122 存在下における II 型 dIBNST 神経細胞に対する NTS の効果

A, U73122 (ピペット内液中 10 μ M) の存在下における NTS (250nM) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と NTS 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。B, U73122 存在下における NTS 誘導電流の平均トレース。灰色の線は個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。

NTS の脱分極作用に PKC 活性化が関与しているかどうかを調べるために, PKC 阻害薬である calphostin C をピペット内液に加えた。NTS は calphostin C 存在下でも II 型 dIBNST 神経細胞を脱分極させた。Holding current は, -39.5 ± 6.2 pA から -43.3 ± 6.2 pA に有意に変化した ($n = 10$ cells from 9 rats, $t = 2.41$, $P = 0.039$, paired t -test, Fig. 12A)。NTS によって誘発された正味の電流変化を平均化したトレースから算出される逆転電位は -81.7 ± 4.0 mV であった (Fig. 12B)。

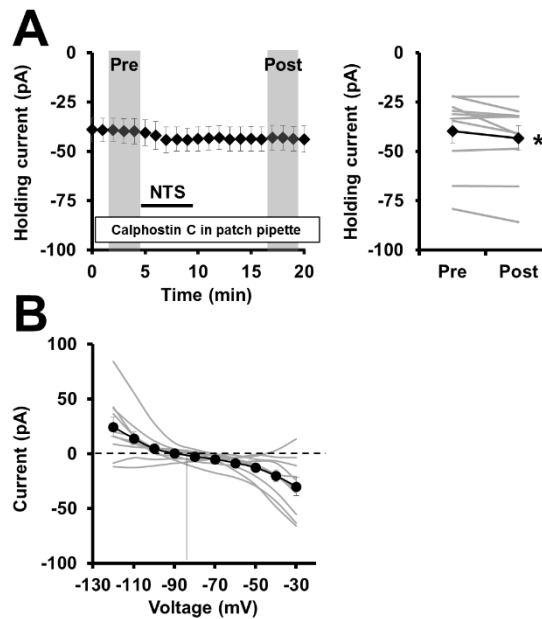


Fig.12 Calphostin C 存在下における II 型 dlBNST 神経細胞に対する NTS の効果

A, Calphostin C (PKC 阻害薬, ピペット内液中 1 μ M) 存在下における NTS (250nM) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と NTS 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。* $P < 0.05$ (Pre vs. Post; paired t test)。B, Calphostin C 存在下における NTS 誘導電流の平均トレース。灰色の線は個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。

2.2.4. CaMKII 阻害薬の存在下では, NTS に対して異なる反応を示す 2 つのグループの II 型 dlBNST 神経細胞が観察された

NTS の効果に対する CaMKII の関与を調べるために, CaMKII 阻害薬である KN93 をピペット内液に加えた。KN93 の存在下で, NTS は II 型 dlBNST 神経細胞を脱分極させ, holding current は -40.6 ± 7.0 pA から -48.6 ± 7.9 pA に有意に変化した ($n = 12$ cells from 8 rats, $t = 3.45$, $P = 0.0055$, paired t test, Fig. 13A)。I-V 曲線に対する NTS の効果を解析したところ, KN93 の存在下では, NTS により正味の電流変化が増加する細胞群と減少する細胞群が観察された(Fig. 13B)。NTS による正味の電流の減少は 12 細胞中 7 細胞で, 正味の電流の増加は 12 細胞中 5 細胞で観察された。正味の電流を減少させた細胞群では, 電流変化を平均化したトレースから算出される逆転電位は -80.6 ± 6.2 mV であった (Fig. 13C, left)。一方, 正味の電流を増加させた細胞群では, 電流変化を平均化したトレースから算出される逆転電位は -47.8 ± 8.0 mV であった (Fig. 13C, right)。

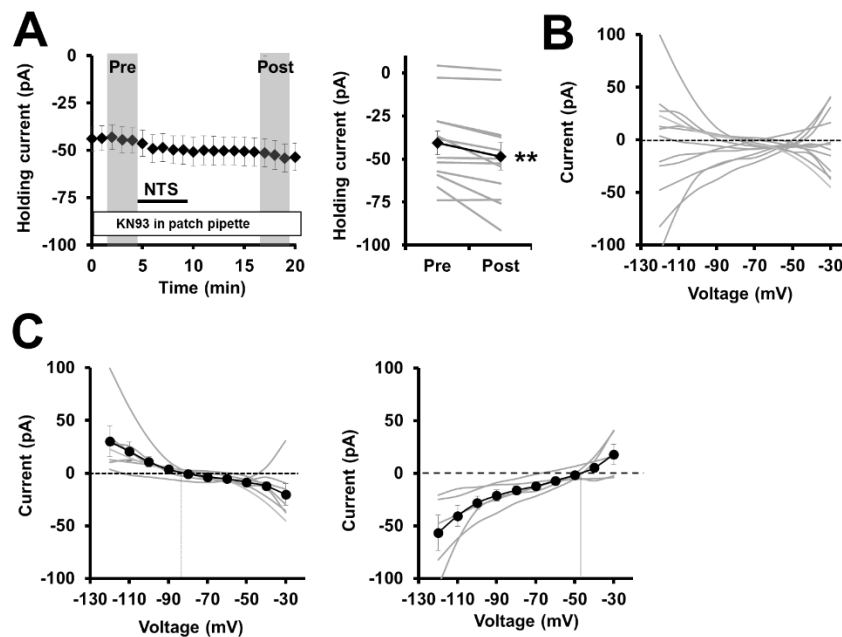


Fig.13 KN93 存在下における II 型 dIBNST 神経細胞に対する NTS の効果

A, KN93 (ピペット内液中 10 μ M) 存在下における NTS (250nM) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と NTS 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。** $P < 0.01$ (Pre vs. Post; paired t -test)。B, KN93 存在下における NTS 誘導電流の全トレース。C, KN93 存在下における NTS 誘導電流を, コンダクタンス減少を示した細胞群(左)とコンダクタンス増加を示した細胞群(右)に分類したときの平均トレース。灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。

2.2.5. NTS は PKA 阻害薬の存在下で II 型 dIBNST 神経細胞に過分極作用を示した

NTS の作用に PKA 活性化が関与しているかどうかを調べるために, PKA 阻害薬である Rp-cAMPS をピペット内液に加えた。NTS は, Rp-cAMPS の存在下で II 型 dIBNST 神経細胞に過分極作用を示し, holding current は -54.0 ± 8.9 pA から -45.9 ± 8.0 pA に有意に変化した ($n = 7$ cells from 6 rats, holding current : $t = 2.46$, $P = 0.049$, paired t -test, 入力抵抗 : $t = 5.63$, $P = 0.0013$, paired t -test, Fig. 14A)。NTS による正味の電流変化の平均トレースから算出される逆転電位は -51.9 ± 8.3 mV であった (Fig. 14B)。

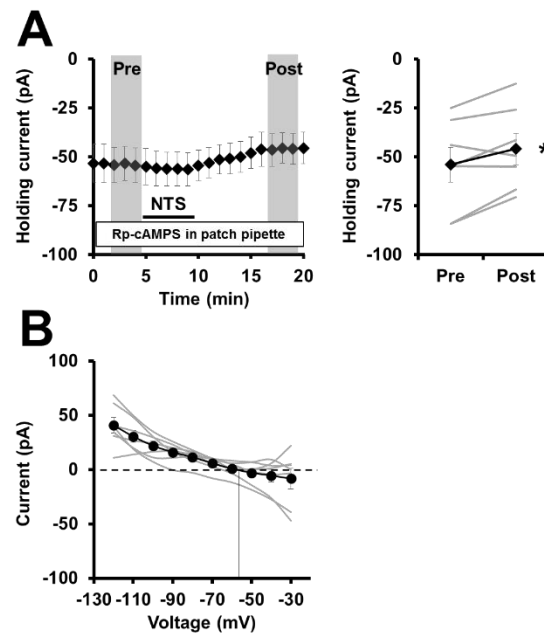


Fig.14 Rp-cAMPS 存在下における II 型 dIBNST 神経細胞に対する NTS の効果

A, Rp-cAMPS (ピペット内液中 100 μ M) 存在下における NTS (250nM) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と NTS 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。* $P < 0.05$ (Pre vs. Post; paired t -test)。B, Rp-cAMPS 存在下における NTS 誘導電流の平均トレース。灰色の線は, 個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。

2.2.6. PKA 阻害薬と CaMKII 阻害薬の両者存在下では, NTS は II 型 dIBNST 神経細胞に対して脱分極作用も過分極作用も示さなかった

Rp-cAMPS と KN93 の両方の存在下では, NTS の適用前 (Pre) と適用後 (Post) で holding current に有意な差が観察されなかった ($n = 9$ cells from 6 rats, holding current : -66.6 ± 9.5 pA [NTS 処置前] vs. -67.5 ± 10.5 pA [NTS 処置後], $t = 0.48$, $P = 0.64$, paired t -test, Fig. 15A). NTS によって誘発される正味の電流変化は, Rp-cAMPS と KN93 の両方の存在下では観察されなかった (Fig. 15B)。

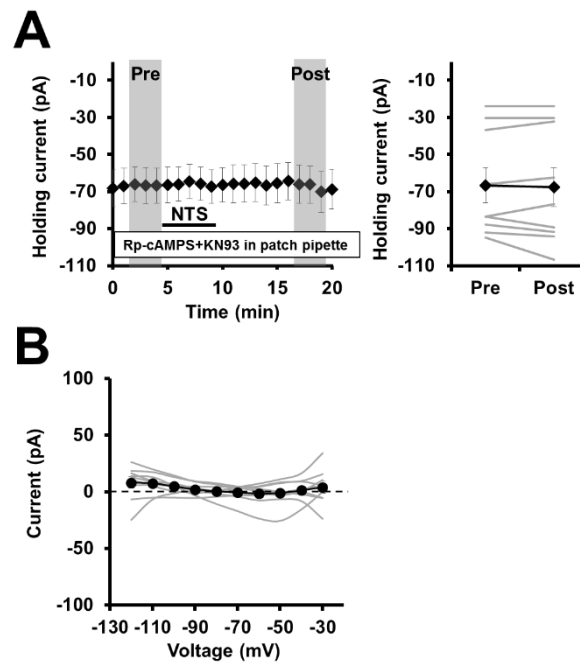


Fig.15 Rp-cAMPS および KN93 存在下における II 型 dIBNST 神経細胞に対する NTS の効果

A, Rp-cAMPS (ピペット内液中 100 μ M) + KN93 (ピペット内液中 10 μ M) の存在下における NTS (250nM) の holding current に対する効果。Holding current のタイムコース(左)と NTS 投与開始前 0-3 分[Pre]および投与開始後 12-15 分[Post]における平均 holding current (右)を示す(左パネルでは該当箇所を網掛けで示している)。右パネルの灰色の線は個々のニューロンから得られたデータ, 黒い線とシンボルは平均データを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。B, Rp-AMPS + KN93 の存在下における NTS 誘導電流の平均トレース。灰色の線は, 個々のニューロンから得られたデータを示す。データは平均値 $\pm$ SEM で表した。

2-3 考察

第2章では, II 型 dIBNST 神経細胞の興奮性に対する NTS の作用と, 関与するシグナル伝達経路について調べた。NTS は II 型 dIBNST 神経細胞を脱分極させ, この脱分極作用は非選択的 NTS 受容体アンタゴニスト SR142948 で阻害された。また, ボルテージクランプモードによる検討でも, II 型 dIBNST 神経細胞における NTS の脱分極作用が示された。NTS 処置前後の I-V 曲線を解析したところ, NTS による正味の電流変化は減少し, -90 mV 付近で極性が反転したことから, カリウムチャネルコンダクタンスが関与していると考えられた。NTS のカリウムチャネル遮断による脱分極作用は, 孤束核神経細胞³²や淡蒼球神経細胞³³でも報告されている。

NTS 受容体は Gq タンパク質と共役しており, Gq タンパク質が活性化されると, PLC が活性化され, 続いてイノシトールリン脂質のシグナルカスケードがリクルートされ, 細胞内の Ca^{2+} レベルが上昇する。そこで, NTS による脱分極作用に対する PLC の関与を調べた。

PLC 阻害薬である U73122 の細胞内処置により、II 型 dIBNST 神経細胞における NTS の脱分極作用が抑制されたことから PLC の関与が示された。次に、 Ca^{2+} によって活性化されるリン酸化酵素である PKC と CaMKII の関与を調べた。PKC 阻害薬である calphostin C は NTS の脱分極作用を阻害しなかったことから、PKC は NTS の脱分極作用に関与していないと考えられた。また、CaMKII 阻害薬である KN93 も NTS の脱分極作用を阻害しなかったことから、CaMKII は NTS の脱分極作用を仲介していないと考えられた。しかしながら、KN93 処置により、NTS による脱分極に関与するチャネルコンダクタンスの種類が変化した。すなわち、KN93 存在下での NTS 誘発性誘導電流では、12 細胞のうち 7 細胞で逆転電位 -80.6 ± 6.2 mV のチャネルコンダクタンスの減少が観察されたことに加えて、12 細胞のうち 5 細胞で逆転電位 -47.8 ± 8.0 mV のチャネルコンダクタンスの増加が観察された。第 1 章において、CRF や forskolin による II 型 dIBNST 神経細胞の脱分極では、逆転電位が -95 mV 付近でチャネルコンダクタンスが減少する細胞群 (IIa 型) と、逆転電位が -50 mV 付近でチャネルコンダクタンスが増加する細胞群 (IIb 型) が観察されていたことから、NTS 単独処置の際にはマスクされていた IIb 型が、KN93 存在下の NTS 処置では観察された可能性が考えられる。KN93 の存在下で、チャネルコンダクタンスが増加する細胞群 (IIb 型) が観察されたことから、2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、チャネルコンダクタンスの増加による NTS の脱分極作用を仲介するシグナル伝達経路が CaMKII を介したシグナル伝達によって抑制されている可能性である。2 つ目は、チャネルコンダクタンスの増加による NTS の脱分極作用に関わるチャネルが CaMKII を介したシグナル伝達により阻害される可能性である。

第 1 章で、CRF による II 型 dIBNST 神経細胞の脱分極が AC-cAMP-PKA 経路を介することを示したが、 Ca^{2+} シグナルによって活性化される AC のサブタイプが報告されていることから³⁴、NTS による dIBNST 神経細胞の脱分極は、 Ca^{2+} シグナルによって活性化された AC-cAMP-PKA 経路によって仲介されている可能性が考えられる。この可能性を検討するために、PKA 阻害薬である Rp-cAMPS の存在下で NTS の効果を調べた。Rp-cAMPS 存在下において、NTS は II 型 dIBNST 神経細胞を過分極させた。NTS はチャネルコンダクタンスを減少させ、その逆転電位は約 -50 mV であり、非選択的カチオンチャネルの関与が示唆された。この結果は、上述した 2 つの可能性、すなわち、1) チャネルコンダクタンスの増加による NTS の脱分極作用を仲介するシグナル伝達経路が CaMKII を介したシグナル伝達によって抑制される可能性と、2) チャネルコンダクタンスの増加による NTS の脱分極作用に関わるチャネルが CaMKII を介したシグナル伝達により阻害される可能性のうち、後者の可能性を支持するものである。

以上より、NTS は Gq タンパク質を介して PLC を活性化し、細胞内の Ca^{2+} レベルを上昇させることで、 Ca^{2+} 依存性の AC-cAMP-PKA 経路と CaMKII 経路を活性化し、AC-cAMP-PKA 経路活性化はカリウムコンダクタンス減少と非選択的カチオンコンダクタンス増加により II 型 dIBNST 神経細胞に脱分極を引き起こし、一方、CaMKII 経路活性化は非

選択的カチオンコンダクタンス減少により II 型 dIBNST 神経細胞に過分極を引き起こすことが考えられた (Fig. 16)。この細胞内情報伝達機構により観察されたすべての結果を説明することができる。すなわち、AC-cAMP-PKA 経路と CaMKII 経路を介した NTS の非選択的カチオンコンダクタンスへの作用が相殺されるため、NTS 単独の脱分極作用ではカリウムコンダクタンスの減少のみが観察されると考えられる。また、PKA 阻害薬存在下では CaMKII 経路活性化による作用のみとなるため過分極作用が観察され、CaMKII 阻害薬と PKA 阻害薬の両方の存在下では AC-cAMP-PKA 経路と CaMKII 経路の両方が阻害されるため脱分極作用も過分極作用も観察されないものと考えられる。

第 2 章の研究により、AC-cAMP-PKA 経路と CaMKII 経路が相反的に、II 型 dIBNST 神経細胞の興奮性に対する NTS の効果を仲介していることが明らかになった。PKA や CaMKII などのリン酸化酵素の発現レベルは、病態時には変化することが報告されていることから^{35,36}、細胞内情報伝達系の変化が II 型 dIBNST 神経細胞の興奮性に対する NTS の作用を変化させることで神経精神機能に障害をもたらす可能性が考えられる。

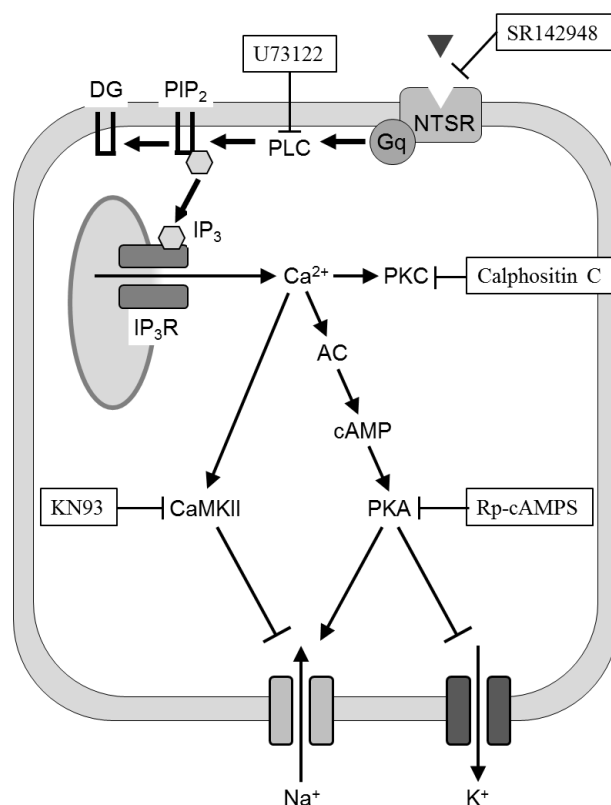


Fig.16 II 型 dIBNST 神経細胞の興奮性に対する NTS の効果に関与するシグナル伝達経路

結語

本研究より、筆者は、1) dlBNST 内 II 型神経細胞において、CRF が AC-cAMP-PKA 経路を活性化させることで脱分極作用を示すこと、2) dlBNST 内 II 型神経細胞において、NTS が PLC-AC-cAMP-PKA 経路活性化により脱分極を、PLC-CaMKII 経路活性化により過分極を引き起こし、正味の効果として脱分極作用を示すこと、を明らかにした(Fig. 17)。CRF と NTS がともに II 型神経細胞に対する脱分極作用を有すること、これらの神経ペプチドが不安や嫌悪などの負情動を惹起することが報告されていることから、II 型神経細胞の活性化が負情動生成に関与することが考えられる。また、NTS 受容体の下流には脱分極を引き起こす情報伝達と過分極を引き起こす情報伝達が存在することから、PLC-AC-cAMP-PKA 系と PLC-CaMKII 系のバランスの変化が負情動生成・制御に関与する可能性が考えられる。不安、嫌悪、抑うつ、恐怖などの負情動生成に関与すると考えられる dlBNST 内 II 型神経細胞に対する神経ペプチド CRF と NTS の作用と関与する細胞内情報伝達を明らかにした本研究成果は、不安障害やうつ病などの精神疾患の神経機構解明や治療薬創製に貢献することが期待できる。

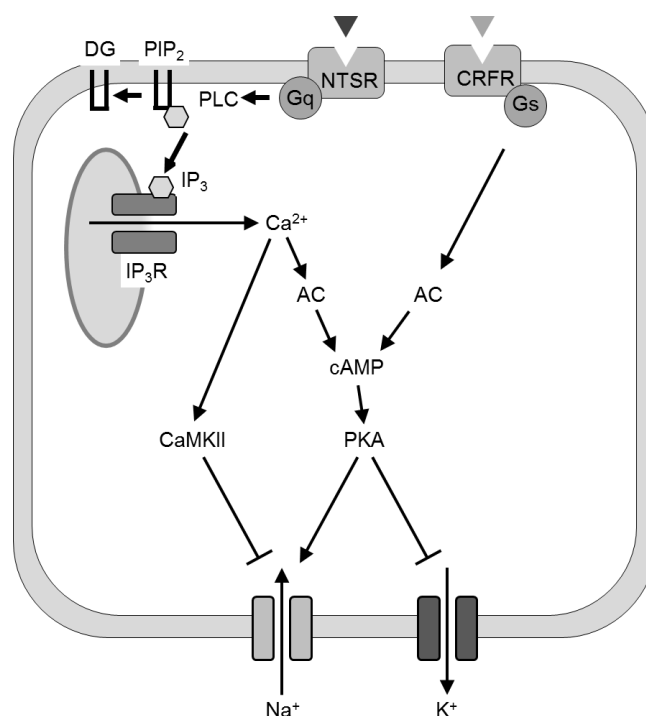


Fig.17 II 型 dlBNST 神経細胞の興奮性に対する CRF と NTS の効果に関与するシグナル伝達経路

参考文献

1. Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological stress and disease. *JAMA*. 2007;298(14):1685-1687. doi:10.1001/jama.298.14.1685
2. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(7):374-381. doi:10.1038/nrendo.2009.106
3. Deppermann S, Storchak H, Fallgatter AJ, Ehls A-C. Stress-induced neuroplasticity: (Mal)adaptation to adverse life events in patients with PTSD – A critical overview. *Neuroscience*. 2014;283:166-177. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.037
4. Alheid GF, Heimer L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*. 1988;27(1):1-39. doi:10.1016/0306-4522(88)90217-5
5. Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):105-135. doi:10.1038/npp.2009.109
6. Minami M. The role of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced aversive motivation. *Curr Opin Behav Sci*. 2019;26:46-53. doi:https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.10.003
7. Hammack SE, Mania I, Rainnie DG. Differential expression of intrinsic membrane currents in defined cell types of the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurophysiol*. 2007;98(2):638-656. doi:10.1152/jn.00382.2007
8. Guo J-D, Hammack SE, Hazra R, Levita L, Rainnie DG. Bi-directional modulation of bed nucleus of stria terminalis neurons by 5-HT: molecular expression and functional properties of excitatory 5-HT receptor subtypes. *Neuroscience*. 2009;164(4):1776-1793. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.028
9. Ide S, Hara T, Naka T, et al. Opposing roles of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci*. 2013;33(14):5881-5894. doi:10.1523/jneurosci.4278-12.2013
10. Alexander MJ, Miller MA, Dorsa DM, et al. Distribution of neurotensin/neuromedin N mRNA in rat forebrain: unexpected abundance in hippocampus and subiculum. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86(13):5202 LP-5206. doi:10.1073/pnas.86.13.5202
11. St-Gelais F, Jomphe C, Trudeau L-E. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci*.

- 2006;31(4):229-245. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16862241>.
12. Boules M, Li Z, Smith K, Fredrickson P, Richelson E. Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system. *Front Endocrinol.* 2013;4:36. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00036>.
13. Tschumi CW, Sharma R, Lynch WB, Sharpe AL, Beckstead MJ. Depression of substantia nigra dopamine transmission is driven by retrograde neurotensin release and is enhanced by methamphetamine self-administration. *bioRxiv.* January 2019:717843. doi:10.1101/717843
14. Nimitvilai S, McElvain MA, Arora DS, Brodie MS. Reversal of quinpirole inhibition of ventral tegmental area neurons is linked to the phosphatidylinositol system and is induced by agonists linked to Gq. *J Neurophysiol.* 2012;108(1):263-274. doi:10.1152/jn.01137.2011
15. Normandeau CP, Ventura-silva AP, Hawken ER, et al. A key role for neurotensin in chronic-stress-induced anxiety-like behavior in rats. 2018:285-293. doi:10.1038/npp.2017.134
16. Hara Y, Nakaya H. Dual effects of extracellular ATP on the muscarinic acetylcholine receptor-operated K⁺ current in guinea-pig atrial cells. *Eur J Pharmacol.* 1997;324(2):295-303. doi:[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)00088-5)
17. Hauger R, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg F. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: New molecular targets. *CNS Neurol Disord - Drug Targets.* 2008;5(4):453-479. doi:10.2174/187152706777950684
18. Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: Implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev.* 2006;27(3):260-286. doi:10.1210/er.2005-0034
19. Murray AJ. Pharmacological PKA inhibition: All may not be what it seems. *Sci Signal.* 2008;1(22). doi:10.1126/scisignal.122re4
20. Jüngling K, Liu X, Lesting J, et al. Activation of neuropeptide S-expressing neurons in the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor. *J Physiol.* 2012;590(16):3701-3717. doi:10.1113/jphysiol.2011.226423
21. Blank T, Nijholt I, Grammatopoulos DK, Randeva HS, Hillhouse EW, Spiess J. Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse intracellular signaling pathways in mouse hippocampus: Role in neuronal excitability and associative learning. *J Neurosci.* 2003;23(2):700 LP-707. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-02-00700.2003
22. Yang LZ, Kockskämper J, Khan S, et al. CAMP- and Ca²⁺/calmodulin-dependent

- protein kinases mediate inotropic, lusitropic and arrhythmogenic effects of urocortin 2 in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*. 2011;162(2):544-556. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01067.x
23. Nagano Y, Kaneda K, Maruyama C, Ide S, Kato F, Minami M. Corticotropin-releasing factor enhances inhibitory synaptic transmission to type III neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neurosci Lett*. 2015;600:56-61. doi:https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.059
 24. Yamauchi N, Takahashi D, Sugimura YK, Kato F, Amano T, Minami M. Activation of the neural pathway from the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis to the central amygdala induces anxiety-like behaviors. *Eur J Neurosci*. 2018;48(9):3052-3061. doi:https://doi.org/10.1111/ejn.14165
 25. Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, et al. Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J Neurosci*. 2012;32(50):18035 LP-18046. doi:10.1523/JNEUROSCI.4057-12.2012
 26. Tan KR, Yvon C, Turiault M, et al. GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron*. 2012;73(6):1173-1183. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.015
 27. Jennings JH, Sparta DR, Stamatakis AM, et al. Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. *Nature*. 2013;496(7444):224-228. doi:10.1038/nature12041
 28. Kaneko T, Kaneda K, Ohno A, et al. Activation of adenylate cyclase-cyclic AMP-protein kinase A signaling by corticotropin-releasing factor within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis is involved in pain-induced aversion. 2016;44:2914-2924. doi:10.1111/ejn.13419
 29. Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol*. 2000;428(2):191-212. doi:https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001211)428:2<191::AID-CNE1>3.0.CO;2-U
 30. Takahashi LK. Role of CRF1 and CRF2 receptors in fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001;25(7):627-636. doi:https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00046-X
 31. Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: Role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44(1):525-557. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410
 32. Ogawa WN, Baptista V, Aguiar JF, Varanda WA. Neurotensin modulates synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Neuroscience*. 2005.

- doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.019
33. Chen L, Yung KKL, Yung WH. Neurotensin depolarizes globus pallidus neurons in rats via neurotensin type-1 receptor. *Neuroscience*. 2004;125(4):853-859.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.02.031>
34. Halls ML, Cooper DMF. Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):1-22.
doi:10.1101/cshperspect.a004143
35. Araujo APN, DeLucia R, Scavone C, Planeta CS. Repeated predictable or unpredictable stress: Effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. *Behav Brain Res*. 2003;139(1-2):75-81.
doi:10.1016/S0166-4328(02)00088-8
36. Sun H, Wu H, Liu J, Wen J, Zhu Z, Li H. Prenatal stress impairs spatial learning and memory associated with lower mRNA level of the CaMKII and CREB in the adult female rat hippocampus. *Neurochem Res*. 2017;42(5):1496-1503.
doi:10.1007/s11064-017-2206-z

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室 教授・南雅文 先生，同研究室 講師・天野大樹 先生，同研究室 講師・野村洋 先生，同研究室 助教・人羅菜津子 先生，ならびに，同研究室 前准教授で、現金沢大学医薬保健研究域薬学系薬理学研究室 教授・金田勝幸 先生に謹んで感謝の意を表します。

さらに，本論文を審査していただき，貴重な御助言を賜りました同大学大学院薬学研究院 RNA 生物學研究室 教授・中川真一 先生，同研究室 講師・米田宏 先生に深く感謝申し上げます。

最後に，折に触れ有益なご助言，御討論いただきました研究室の先輩方，同級生，後輩，そして研究生活を支えてくれた家族に心から感謝いたします。