

学 位 論 文 題 名

Regional pacemakers composed of multiple oscillator
neurons in the rat suprachiasmatic nucleus

(ラット視交叉上核における多振動神経細胞から構成される
サーカディアンリズム発振機構の局在)

学位論文内容の要旨

サーカディアンリズムは単細胞生物から哺乳類にいたるまで、地球上のあらゆる生物にみられる約 24 時間周期のリズムであり、ヒトでは睡眠覚醒、体温、ホルモン分泌など様々な生命活動にサーカディアンリズムが見られる。視床下部視交叉上核 (SCN) は哺乳類体内時計の中核であり、サーカディアンリズムを発振している。SCN は解剖学的に二つの領域、腹側部と背側部に分けられる。網膜等外部からの入力が投射している腹側部には Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 細胞が分布しており、VIP は明暗環境下で夜に高く昼に低いサーカディアンリズムを示し、恒常暗環境下ではリズムを示さない。一方、外部からの入力がほとんど知られていない背側部には Arginine vasopressin (AVP) 細胞が分布しており、AVP は光の影響によらない内因性のサーカディアンリズムを示す。また、SCN の個々の細胞は各々が独自の周期を刻む自律振動体であることが示唆されている。ここで SCN を構成する多様な神経細胞が、SCN 総体として調和のとれたサーカディアン周期を発現する機構は不明である。本研究では、SCN がその組織構造を維持している器官培養系を用い、振動機能の部位特異性を検討し、多振動体が集合体としてサーカディアン周期を発現する機構を明らかにすることを目的とした。

実験には明暗サイクル 12h-12h で飼育された生後 4-8 日 Wistar 系ラットを用いた。新生児ラット視床下部より 350 μ m 厚さの SCN スライスを切り出した。作成した SCN スライスを多孔質培養膜上に静置して器官培養を行った。培養開始 5 日後より、培養液のサンプリングを 4 時間毎に 15 回、計 60 時間行い、得られたサンプル中の AVP、VIP を酵素イムノアッセイ法で定量して SCN 組織のペプチド分泌リズムを測定した。培養開始 10 日後に SCN 組織片を固定し、AVP、VIP の免疫染色を行い器官培養における各ペプチド含有細胞の局在を確認した。また、底面に微小電極を埋め込んだ多電極ディッシュ (MED) 上に SCN スライスを器官培養した。MED 上に培養した SCN の神経細胞群より異なる 8 点から、同

時に細胞外電位の測定を行い、個々の神経発火頻度を連続的に記録し5日間のサーカディアンリズムを解析した。

培養 SCN スライスについて AVP、VIP の免疫染色を行い共焦点顕微鏡にて観察した結果、培養前の SCN スライスと比較し約 1.5 倍に伸展し厚さは約 $50\mu\text{m}$ となったが、AVP 細胞は背側部に、VIP 細胞は腹側部に存在しそれぞれ局在性を維持していた。ペプチド含有神経細胞の局在性は培養後一ヶ月においても維持されていた。20 スライスについて器官培養 5 日から 7 日における AVP、VIP 分泌量の時間変動について検討した結果、20 スライス中 19 スライスで AVP 分泌にサーカディアンリズムが認められた。AVP リズムは、スライス間で周期はほぼ一致しており、peak 位相はいずれも培養開始前の明暗周期における明期に位置していた。一方、VIP 分泌リズムを示すスライスは 20 スライス中 50% の 10 スライスにとどまった。VIP は、スライス間で周期、ピーク位相が異なっていた。サーカディアンリズムを示した 10 スライスについて AVP リズムと VIP リズムとを比較すると、AVP のサーカディアン周期が $22.2\sim 25.3\text{h}$ に分布し平均 $24.3\pm 0.9\text{h}$ であったのに対し、VIP は $23.4\sim 32.1\text{h}$ と広い範囲に分布し平均で $26.3\pm 2.7\text{h}$ と有意な周期の延長を認めた。5 日目のピーク位相を比較すると、VIP リズムは AVP リズムに対して約 6.7h の有意な位相後退を認めた。MED により個々の SCN 細胞の神経発火頻度を測定した結果、67 細胞のうち 76% の 51 細胞で有意なサーカディアンリズムを認めた。腹側部と背側部に区分すると、リズムを発振する細胞は背側部により高頻度に局在していた。それぞれの部位におけるサーカディアン振動細胞の平均周期はどちらも 24.3h で差は認められなかった。サーカディアンリズムを発振する細胞は同一 SCN スライス内ではほぼ同じ周期で振動していたが、その発火頻度が上昇する活動のピークは 63% の細胞が同位相を示し、27% が約 12 時間の時間差をもつ逆転位相を示した。逆転位相を示す細胞には SCN における特定の局在は認められなかった。

これまでの研究から個々の SCN 細胞は各々が独自の周期を発振する自律振動体であることが示唆されている。今回 SCN 組織では個々の細胞が同位相または逆転位相で同じ周期のサーカディアンリズムを発振していたことから、細胞構築が維持された状態において SCN 細胞間にリズム同調機構が存在することが示唆された。AVP および VIP の分泌リズムはそれぞれ背側部、腹側部に局在する細胞集団のリズム出力を反映すると考えられる。理論的に、より多くの振動細胞が同調することによりその振動は安定し振幅は大きくなることが証明されている。安定したペプチド分泌リズムを示した AVP の分泌細胞が局在する背側部には多くの振動細胞が存在し、サーカディアン周期のばらつきが大きかった VIP の分泌細胞が局在する腹側部には振動細胞が少なかった今回の結果と良く対応する。SCN におけるサーカディアン振動細胞のうち逆転位相を示すものについてはペプチド分泌との関連は不明であり、それらの機能的意義は今後の検討課題である。

今回の研究から、SCN には背側部と腹側部に各々 AVP 分泌と VIP 分泌とを制御する部位特異的な別個のサーカディアンペースメーカーが存在することが示唆された。多くの振動細胞により構成される背側部において強力なリズムを発振し、より少ない割合の振動細胞からなる腹側部で容易に脱同調を起こすことにより、SCN は総体として安定したサーカディアンリズムの発振と光による位相変位を行っていると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久
副 査 教 授 赤 池 忠
副 査 教 授 脇 田 稔
副 査 教 授 本 間 研 一

学 位 論 文 題 名

Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus

(ラット視交叉上核における多振動神経細胞から構成される
サーカディアンリズム発振機構の局在)

審査は赤池、脇田、本間および小口審査委員それぞれ個別に、学位申請者に対して提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

学位申請者は、明暗サイクル 12h-12h で飼育された生後 4 - 8 日 Wistar 系ラットを用い、視床下部より 350 μ m 厚さの視交叉上核 (SCN) スライスを作成し多孔質培養膜上に静置して器官培養を行った。培養開始 5 日後より、培養液のサンプリングを 4 時間毎に 15 回、計 60 時間行い、得られたサンプル中の AVP、VIP を酵素イムノアッセイ法で定量して SCN 組織のペプチド分泌リズムを測定した。培養開始 10 日後に AVP、VIP の免疫染色を行い器官培養における各ペプチド含有細胞の局在を確認した。また、底面に微小電極を埋め込んだ多電極ディッシュ (MED) 上に SCN スライスを器官培養し、SCN の神経細胞群より異なる 8 点から同時に細胞外電位の測定を行った。個々の神経発火頻度を連続的に記録し 5 日間のサーカディアンリズムを解析した。

以上の方法によって得られた結果は次の通りである。培養 SCN スライスについて AVP、VIP の免疫染色を行い共焦点顕微鏡にて観察した結果、AVP 細胞は背側部に、VIP 細胞は腹側部に存在しそれぞれ局在性を維持していた。20 スライスについて器官培養 5 日から 7 日における AVP、VIP 分泌量の時間変動について検討した結果、20 スライス中 19 スライスで AVP 分泌にサーカディアンリズムが認められた。AVP リズムは、スライス間で周期はほぼ一致しており、peak 位相はいずれも培養開始前の明暗周期における明期に位置していた。一方、VIP 分泌リズムを示すスライスは 20 スライス中 50% の 10 スライスにとどまった。VIP は、スライス間で周期、ピーク位相が異な

っていた。AVP リズムと VIP リズムとを比較すると、AVP のサーカディアン周期が 22.2 ~ 25.3h に分布し平均 24.3 ± 0.9 h であったのに対し、VIP は 23.4 ~ 32.1h と広い範囲に分布し平均で 26.3 ± 2.7 h と有意な周期の延長を認めた。5 日目のピーク位相を比較すると、VIP リズムは AVP リズムに対して約 6.7h の有意な位相後退を認めた。MED により個々の SCN 細胞の神経発火頻度を測定した結果、67 細胞のうち 76% の 51 細胞で有意なサーカディアンリズムを認めた。腹側部と背側部に区分すると、リズムを発振する細胞は背側部により高頻度に局在していた。それぞれの部位におけるサーカディアン振動細胞の平均周期はどちらも 24.3h で差は認められなかった。サーカディアンリズムを発振する細胞は同一 SCN スライス内ではほぼ同じ周期で振動していたが、その発火頻度が上昇する活動のピークは 63% の細胞が同位相を示し、27% が約 12 時間の時間差をもつ逆転位相を示した。逆転位相を示す細胞には SCN における特定の局在は認められなかった。

これまでの研究から個々の SCN 細胞は各々が独自の周期を発振する自律振動体であることが示唆されている。今回 SCN 組織では個々の細胞が同位相または逆転位相で同じ周期のサーカディアンリズムを発振していたことから、細胞構築が維持された状態において SCN 細胞間にリズム同調機構が存在することが示唆された。AVP および VIP の分泌リズムはそれぞれ背側部、腹側部に局在する細胞集団のリズム出力を反映すると考えられる。理論的に、より多くの振動細胞が同調することによりその振動は安定し振幅は大きくなることが証明されている。安定したペプチド分泌リズムを示した AVP の分泌細胞が局在する背側部には多くの振動細胞が存在し、サーカディアン周期のばらつきが大きかった VIP の分泌細胞が局在する腹側部には振動細胞が少なかった今回の結果と良く対応する。SCN におけるサーカディアン振動細胞のうち逆転位相を示すものについてはペプチド分泌との関連は不明であり、それらの機能的意義は今後の検討課題である。今回の研究から、SCN は多くの振動細胞により構成される背側部において強力なリズムを発振し、より少ない割合の振動細胞からなる腹側部で容易に脱同調を起こすことにより、総体として安定したサーカディアンリズムの発振と光による位相変位を行っていると考えられる。と結論づけている。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われたが、これらの質問に対しそれぞれ適切な回答が得られ、また、本研究は個々のニューロンの神経活動と神経回路網全体の機能を結びつける解析が行われたことが評価された。さらに、学位申請者は実験条件の設定変更により口腔領域の感覚情報処理機構について神経細胞レベルでの検討が可能となり、将来の展望についても評価された。

以上の審査結果より、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。