

# マウス下丘神経細胞における 選択的セロトニン再取り込み阻害薬の効果

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

耳鳴りは外部の音が無いにも関わらず音知覚を生じる現象であるが、音が体内に存在する場合と、体内に原因となる音が無くても音知覚を感じる場合がある。体内に存在する音としては頭頸部に存在する血管を流れる血流音、耳小骨筋攣縮などに伴う筋性耳鳴、耳管開放症や耳管機能不全症に伴う耳管性耳鳴が原因として挙げられる。体内に原因となる音が無い場合、その発生は内耳またはそこから聴皮質へ至る末梢神経や中枢神経に何らかの発生機序が存在すると考えられる。

臨床的に耳鳴りは多様な原因から生じていると考えられ、病態も様々であるとされているが、そのほとんどが耳鳴りの自覚症状以外の所見に乏しく、その病態については明らかではない。また、明確に耳鳴りの発生している場所を末梢性と中枢性に分けることは困難である。

以上に述べたように、耳鳴りの発生機序については諸説があるが、本研究では聴神経より中枢に原因をもつ中枢性耳鳴について検討を行った。中脳下丘における神経伝達はシナプスからの興奮性入力と抑制性入力によるものであり、蝸牛からの音入力は興奮性のシナプス伝達として直接、または上オリーブ核群や外側毛帯核を経由して下丘に達する。その一方で、外側上オリーブ核や外側毛帯核から抑制性のシナプス入力も存在しており、下丘において音情報の統合や調節がなされていると考えられている。

セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)は抗うつ薬の一種であり、シナプスにおいてセロトニントランスポーターに作用し、神経伝達物質であるセロトニンの再取り込みを阻害することによって、シナプス間隙のセロトニンの濃度を増加させる。SSRIは耳鳴りの治療薬として処方されることもあり、一定の効果があると報告されている。SSRIの耳鳴りに対する作用機序としては、その抗うつ作用によって耳鳴りの自覚症状が軽減されることによるとされてきたが、未だ詳細については解明されていない。本研究ではSSRIの下丘に対する作用について検討することを目的として、下丘神経細胞からパッチクランプ法を用いて抑制性シナプス後電流(sIPSC)の記録を行った。

### 【実験方法】

C57BL/6J マウスより下丘を含む急性中脳スライス標本を作成して実験に用いた。すべての実験は北海道大学動物実験に関する規定に従って行った。8 - 35 日齢の C57BL/6J マウスよりエーテル麻酔下に全脳を摘出した。氷冷した高スクロースの人工脳脊髄液(artificial cerebral spinal

fluid 以下 ACSF と略す)においてリニアスライサーを用いて厚さ 400  $\mu\text{m}$  の急性スライスを作成した。作成したスライスは 95 %の酸素と 5 %の二酸化炭素混合ガスで飽和した標準 ACSF で満たしたインターフェース型保存箱内で室温にて 1 時間以上放置した後に測定に用いた。

### 【結果】

セロトニン(10  $\mu\text{M}$ )の投与により記録開始 5 分後(control)の GABA 作動性 sIPSC の頻度は投与前と比較しては有意に増加した (2099 $\pm$ 99%, n=6, p<0.05)。また、マレイン酸フルボキサミン(SSRI)10  $\mu\text{M}$  の投与開始から 5 分経過後の GABA 作動性 sIPSC の頻度は投与前と比較して統計学的に有意に増加した (149 $\pm$ 24%, n=7, p<0.05)。次に、グリシン作動性 sIPSC の振幅および頻度はセロトニン(10  $\mu\text{M}$ )の投与により有意に増加した(197 $\pm$ 81%, n=6, P<0.05)が、GABA 作動性 sIPSC の頻度の変化と比較すると小さな効果であった。

### 【考察】

以上より、下丘中心核神経細胞においては、セロトニンは GABA 作動性とグリシン作動性両者の sIPSC の頻度を増加させ、神経細胞の活動電位の発生に対して抑制的に作用することが示唆された。SSRI の薬理作用はシナプス間隙のセロトニン濃度を増加させることであるから、この結果は SSRI によりセロトニン濃度が増加することによるものであると推測される。しかし、SSRI の薬理作用はセロトニントランスポーターの遮断のみではなく、volume-regulated anion channels を遮断することや、グリシン受容体の遮断といった作用も報告されている。また、SSRI の一種であるフルオキシチン(fluoxetine)をラットの海馬培養細胞に投与すると sIPSC の頻度と振幅が増加することが報告されており、セロトニンが存在しない実験系においても sIPSC に対する薬理作用が認められている。そのため、本研究で得られた結果に対する薬理的な作用機序については更なる検討を要すると思われる。

また、興奮性シナプス後電流 (EPSC) に対する作用が不明であり、実際にセロトニンが神経伝達に抑制的に働くか否かについては明らかではない。マレイン酸フルボキサミン(SSRI)が GABA 作動性 sIPSC の頻度を有意に増加させるという結果については、中枢性の耳鳴りが中枢聴覚路における神経細胞の過興奮に起因するという仮説が提唱されているため、耳鳴を抑制させるという臨床効果が下丘に対する薬理作用によるものである可能性があると考えられる。

本研究により、マレイン酸フルボキサミン(SSRI)は GABA 作動性 sIPSC の頻度を増加させることから、その抗うつ作用に加えて中枢聴覚路の神経伝達に対して直接作用することにより臨床的な耳鳴りの改善効果に関与している可能性があることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	渡邊	雅彦
副査	教授	吉岡	充弘
副査	教授	本間	さと
副査	教授	神谷	温之
副査	教授	福田	諭

学位論文題名

## マウス下丘神経細胞における 選択的セロトニン再取り込み阻害薬の効果

学位論文の内容は以下の通りである。

臨床的に耳鳴りは多様な原因から生じていると考えられ、病態も様々であるとされているが、そのほとんどが耳鳴りの自覚症状以外の所見に乏しく、その病態については明らかではない。また、明確に耳鳴りの発生している場所を末梢性と中枢性に分けることは困難である。

耳鳴りの発生機序については諸説があるが、本研究では聴神経より中枢に原因をもつ中枢性耳鳴りについて検討を行った。中脳下丘における神経伝達はシナプスからの興奮性入力と抑制性入力によるものであり、蝸牛からの音入力は興奮性のシナプス伝達として直接、または上オリブ核群や外側毛帯核を經由して下丘に達する。その一方で、外側上オリブ核や外側毛帯核から抑制性のシナプス入力も存在しており、下丘において音情報の統合や調節がなされていると考えられている。

セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)は抗うつ薬の一種であり、シナプスにおいてセロトニントランスポーターに作用し、神経伝達物質であるセロトニンの再取り込みを阻害することによって、シナプス間隙のセロトニンの濃度を増加させる。SSRIは耳鳴りの治療薬として処方されることもあり、一定の効果があると報告されている。SSRIの耳鳴りに対する作用機序としては、その抗うつ作用によって耳鳴りの自覚症状が軽減されることによるとされてきたが、未だ詳細については解明されていない。本研究ではSSRIの下丘に対する作用について検討することを目的として、下丘神経細胞からパッチクランプ法を用いて抑制性シナプス後電流(sIPSC)の記録を行った。

セロトニン(10 $\mu$ M)の投与により記録開始5分後(control)のGABA作動性sIPSCの頻度は投与前と比較して有意に増加した(2099 $\pm$ 99%, n=6, p<0.05)。また、マレイン酸フルボキサミン(SSRI)10 $\mu$ Mの投与開始から5分経過後のGABA作動性sIPSCの頻度は投与前と比較して統計学的に有意に増加した(149 $\pm$ 24%, n=7, p<0.05)。次に、グリシン作動性sIPSCの振幅および頻度はセロトニン(10 $\mu$ M)の投与により有意に増加した(197 $\pm$ 81%, n=6, P<0.05)が、GABA作動性sIPSCの頻度の変化と比較すると小さな効果であっ

た。

以上より、下丘中心核神経細胞においては、セロトニンは GABA 作動性とグリシン作動性両者の sIPSC の頻度を増加させ、神経細胞の活動電位の発生に対して抑制的に作用することが示唆された。SSRI の薬理作用はシナプス間隙のセロトニン濃度を増加させることであるから、この結果は SSRI によりセロトニン濃度が増加することによるものであると推測される。しかし、SSRI の薬理作用はセロトニントランスポーターの遮断のみではなく、volume-regulated anion channels を遮断することや、グリシン受容体の遮断といった作用も報告されている。また、SSRI の一種であるフルオキセチン(fluoxetine)をラットの海馬培養細胞に投与すると sIPSC の頻度および振幅が増加することが報告されており、セロトニンが存在しない実験系においても sIPSC に対する薬理作用が認められている。そのため、本研究で得られた結果に対する薬理的な作用機序については更なる検討を要すると思われる。

また、興奮性シナプス後電流(EPSC)に対する作用が不明であり、実際にセロトニンが神経伝達に抑制的に働くか否かについては明らかではない。マレイン酸フルボキサミン(SSRI)が GABA 作動性 sIPSC の頻度を有意に増加させるという結果については、中枢性の耳鳴りが中枢聴覚路における神経細胞の過興奮に起因するという仮説が提唱されているため、耳鳴を抑制させるという臨床効果が下丘に対する薬理作用によるものである可能性があると考えられる。

本研究により、マレイン酸フルボキサミン(SSRI)は GABA 作動性 sIPSC の頻度を増加させることから、その抗うつ作用に加えて中枢聴覚路の神経伝達に対して直接作用することにより臨床的な耳鳴りの改善効果に関与している可能性があることが示唆された。

この発表に対し、次のような質疑応答がおこなわれた。

副査の吉岡教授からこの実験にマレイン酸フルボキサミンを用いた理由および動物の情動との関連性について、副査の本間教授からデータ毎に薬剤投与による作用に差が大きくなった原因について、副査の福田教授から中枢性難聴との関連性について、副査の神谷教授からこの SSRI の効果が急性効果であるか否かについて、主査の渡邊教授から興奮性シナプス入力への SSRI の効果についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して一部不十分な点もあったが、文献的知識や自らの研究結果に基づいて概ね妥当な回答をなした。

審査委員からは、本論文が下丘における SSRI の作用をシナプス入力のレベルで詳細に研究した内容であり、今後の脳神経研究や耳鳴に対する今後の治療への一助になる報告であるとの評価がなされた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。