

## 学位論文題名

## Amylinergic modulation of area postrema neuronal excitability via presynaptic receptors in rat brain slices

(前シナプス部アミリン受容体を介した最後野ニューロンの活動制御)

## 学位論文内容の要旨

アミリンは 37 個のアミノ酸から成るペプチドホルモンであり、摂食後に膵 $\beta$ 細胞よりインスリンと共に内分泌され、摂食抑制、胃内容物排出遅延、消化液分泌の抑制、グルカゴン分泌抑制などを引き起こすことが知られている。近年、最後野の切除実験や免疫組織化学的実験、および電気生理学的実験により、アミリン誘発の摂食抑制や胃内容物排出遅延は延髄最後野を介して惹起されることが明らかになってきた。しかし、最後野ニューロンにおいて内因性アミリンがどのように受容されるのかについては未だ知られていなかった。そこで我々はスライスパッチクランプ法を用いてアミリン受容性ニューロンの活動を解析し、アミリン受容機構を明らかにすることを目的に実験を行った。

SD 系雄性ラット (1~3 週齢) を用いて、最後野を含む前頭断の脳幹スライス (厚さ 150~200  $\mu\text{m}$ ) を作製した。電極内液にアンホテリシン B を添加した穿孔パッチクランプ法を用いてアミリン感受性の最後野ニューロン活動を記録し、シナプス電流および膜電位の解析を行った。

記録した最後野ニューロンのうち 13.6% ( $n=9/66$ ) においてアミリン感受性が検出された。アミリン感受性を示した 9 ニューロンについて、テトロドトキシン (1  $\mu\text{M}$ ) を人工脳脊髄液として用いて膜電位固定法により膜電流を解析した。アミリンにより微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の発生頻度が濃度依存性に有意に増加し、また mEPSC の振幅の有意な増加も観察された。ガラスピペットを用いたアミリンの局所投与による mEPSC の発生頻度と振幅の増加について再現性が確認された。アミリン投与時に僅かに持続的な内向き電流と思われる反応が検出されたが、ニューロンの細胞内保持電位を -60 mV から -100 mV に過分極させてアミリンに反応させたところ持続的変化と思われる電流変化の振幅は変化しなかった。これらの結果から最後

野の前シナプス部にアミリン受容体が存在することが示唆された。さらに AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗薬を灌流液に添加したところ、アミリン誘発の mEPSC は消失したことから、アミリンにより増加する mEPSC に関与する伝達物質はグルタミン酸である可能性が示された。また灌流液にテトロドトキシンを加えない人工脳脊髄液を用いたところ、アミリン投与により最後野ニューロンの活動電位の発火頻度が増加し、アミリン誘発のシナプス電流は活動電位の発生頻度を増加させるために十分な駆動力を有することが明らかとなった。

最後野ニューロンのアミリン受容機構は従来、後シナプス部のアミリン受容体を介していると考えられていたが、本研究からアミリン受容体は前シナプス部に存在し、アミリン受容後にシナプス間隙へのグルタミン酸の放出を増加させ、AMPA 型グルタミン酸受容体を介して最後野ニューロンの興奮が惹起されることが示された。

過去の報告からアミリンの腹腔内投与によって最後野に神経活動のマーカーである c-Fos 蛋白が発現するが、CTA (Conditioned Taste Aversion, 条件付け味覚嫌悪) は獲得されないことが分かっており、アミリンに腹腔内投与によっては悪心が起きないと考えられる。さらに最後野が悪心嘔吐の Chemoreceptor trigger zone であることと本研究結果とを併せて考えると、悪心誘発に関わる神経系と摂食調節に関わる神経系は異なる可能性があり、アミリン受容体は摂食調節に関わる神経系の前シナプス部にのみ存在している可能性が示唆された。

横隔膜下で迷走神経切除を行った後にアミリンを腹腔内投与しても摂食抑制が起こるという報告があり、アミリンによる摂食抑制の機序は、アミリンが血流を介して直接最後野ニューロンに作用して生じる可能性が高いと考えられた。また、迷走神経求心路の神経線維にはセロトニンにより活性化して悪心・嘔吐を惹起する線維が含まれていることと、摂食抑制と悪心嘔吐の経路が異なることを考慮すると、アミリン受容体は迷走神経中枢端の終末部には存在していないか、もしくはセロトニン感受性がない神経線維だけに限局して存在している可能性が高いとも考えられた。さらに、視床下部へ上行性に投射している最後野ニューロンに対してシナプス接続している他のニューロンの終末部にのみアミリン受容体が存在する可能性も考えられた。

本研究の背景には、肥満症のメカニズム解明とアミリンを応用した肥満治療薬開発の可能性がある。後者については近年レプチンを併用した応用の可能性も示唆されたが、未だ実用には至っていない。本研究により得られた知見はむしろ前者に関連した、内因性アミリンの受容機構とその生理学的意義を解明するものとして意義があると考えている。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政  
副 査 教 授 船 橋 誠  
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

## 学位論文題名

### Amylinergic modulation of area postrema neuronal excitability via presynaptic receptors in rat brain slices (前シナプス部アミリン受容体を介した最後野ニューロンの活動制御)

審査は、上記担当者による申請者に対する提出論文と関連事項についての口頭試問により執り行われた。審査を行った論文の概要は以下の通りである。

アミリンは 37 個のアミノ酸から成るペプチドホルモンであり、摂食後に膵β細胞より内分泌され、摂食抑制、胃内容物排出遅延、消化液分泌の抑制、グルカゴン分泌抑制などを引き起こすことが知られている。近年、アミリン誘発の摂食抑制や胃内容物排出遅延は延髄最後野を介して惹起されることが知られてきた。しかし、最後野ニューロンにおいて内因性アミリンがどのように受容されるのかについては不明であった。

本研究はスライスパッチクランプ法を用いてアミリン受容性ニューロンの活動を解析し、アミリン受容機構を明らかにすることを目的とした。

SD 系雄性ラットを用いて、最後野を含む前頭断の脳幹スライスを作製した。電極内液にアンホテリシン B を添加した穿孔パッチクランプ法を用いてアミリン感受性の最後野ニューロン活動を記録し、シナプス電流および膜電位の解析を行った。

記録した最後野ニューロンのうち 13.6% (n=9/66) においてアミリン感受性が検出された。アミリン感受性を示したニューロンについて、膜電位固定法により膜電流を解析したところ、アミリン灌流投与により微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の発生頻度と振幅が濃度依存性に有意に増加し、局所投与法によって反応の再現性が確認された。また、ニューロンの細胞内保持電位を過分極させてアミリンに反応させたところ持続的変化と思われる電流変化の振幅は変化しなかった。これらの結果から最後野の前シナプス部にアミリン受容体が存在することが示唆された。さらに AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗薬を灌流液に添加したところアミリン誘発の mEPSC は消失し、アミリンにより増加

する mEPSC に関与する伝達物質はグルタミン酸である可能性が示された。また電流固定法による実験では、アミリン誘発のシナプス電流は活動電位の発生頻度を増加させるために十分な駆動力を有することが明らかとなった。

本研究からアミリン受容体は前シナプス部に存在し、アミリン受容後にシナプス間隙へのグルタミン酸の放出を増加させ、AMPA 型グルタミン酸受容体を介して最後野ニューロンの興奮が惹起されることが示された。

過去の報告からアミリンの腹腔内投与によって最後野に神経活動のマーカーである c-Fos 蛋白が発現するが、条件付け味覚嫌悪は獲得されないことが分かっており、アミリンに腹腔内投与によっては悪心が起きないと考えられる。さらに最後野内においては、悪心誘発に関わる神経系と摂食調節に関わる神経系は異なる可能性があり、アミリン受容体は摂食調節に関わる神経系の前シナプス部にのみ存在している可能性が示唆された。迷走神経切除を行った後にアミリンを腹腔内投与しても摂食抑制が起こるという報告があり、アミリンによる摂食抑制の機序は血流を介し直接最後野ニューロンに作用して生じる可能性が高いと考えられた。また、迷走神経求心路の神経線維にはセロトニンにより活性化して悪心・嘔吐を惹起する線維が含まれていることから、アミリン受容体は迷走神経中枢端の終末部には存在していないか、もしくはセロトニン感受性がない神経線維だけに限局して存在している可能性もあり、さらに、視床下部へ上行性に投射する最後野ニューロンに対してシナプス接続しているニューロンの終末部にのみアミリン受容体が存在する可能性も考えられる。

論文審査にあたっては、申請者による学位論文要旨についての説明後、担当者により研究内容および関連事項についての質問を行った。主な質問事項は、1) アミリン受容体のタイプと全身における分布に関する最新の知見、2) 電位固定法ならびにパッチクランプ法の原理と技法、3) アミリン投与方法の詳細と濃度の妥当性、4) テトロドトキシンの使用目的と使用量の妥当性、5) 活動電位を観察した実験についての神経生理学的意義、6) 摂食調節と悪心嘔吐の相関に関する考察、7) 過分極作動性カチオン電流の機能的役割と摂食調節への関与の考察、8) 免疫学的手法を用いた発展的研究の可能性、9) 今後の課題と展望についてなどであった。これらの質問に対しては申請者から適切かつ明快な回答および説明が得られ、研究の立案と遂行ならびに結果の収集とその評価について、申請者が十分な能力を有していることが確認された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有し発展的研究にも意欲的であり、今後の研究についての将来性も期待される。本論文およびこれらの研究は、将来の肥満症メカニズム解明ならびにアミリンを応用した肥満治療薬開発の可能性につながる知見が得られた点で、神経生理学分野において高く評価されるものであり、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。