

論文の内容の要旨

氏名：大谷 紗織

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Relationship between the quantity of orexin receptor expression and calcium responses in cerebrocortical neurons: An *in vivo* two-photon calcium imaging study with rhodamine-labeled orexin A

(大脳皮質神経細胞におけるオレキシン受容体発現量とカルシウム応答の関係：ローダミン標識オレキシン A を用いた 2 光子励起顕微鏡による *in vivo* カルシウムイメージング研究)

G 蛋白共役型受容体に対するアゴニストの効果を神経細胞間で比較すると、大きなばらつきが存在することが知られている。また神経細胞膜上に発現する G 蛋白共役型受容体の発現量は不定であり、神経活動に依存して変化する。したがって、神経細胞膜上の受容体発現量によって、アゴニストの効果が異なっている可能性があるが、受容体発現量と細胞応答性の相関関係を直接示した知見はこれまでない。

オレキシンは覚醒や食欲を制御するペプチドホルモンとして知られ、オレキシン受容体は Gq 蛋白共役型であり、アゴニストを受容することで細胞内カルシウム濃度が上昇する。近年、報酬や依存、痛みの情報処理調節にも関わるということが報告されている。これらの情報処理には島皮質が関与しており、さらに島皮質はオレキシン神経の投射を受けていることが報告されている。そこで、本研究では、神経細胞膜上のオレキシン受容体発現量と細胞内カルシウム応答の間に相関があるという仮説を立て、これを検証する目的で、オレキシン投与時の島皮質における 2 光子励起顕微鏡による *in vivo* カルシウムイメージングを行った。すなわちローダミンを標識したオレキシン A を島皮質に適用し、ローダミン標識オレキシン A が誘発する神経細胞のカルシウム応答の大きさと神経細胞周囲のローダミン蛍光強度の相関性を検討した。

実験には *Thyl-GCaMP6s* 遺伝子改変マウス (7 週齢, 体重 25.4 ± 1.4 g, $n = 14$) を使用した。ウレタンで全身麻酔をしたマウスの頭部を脳定位固定装置に固定し、島皮質の左背側部に開窓 (直径 = 0.5 mm) し、硬膜を除去した。頭蓋骨を薄くすることで中大脳動脈と嗅脳溝を可視化し、観察部位を決定した。

2 光子 *in vivo* カルシウムイメージングは FVMPE-RS レーザー走査顕微鏡システムを用いて行った。*Thyl-GCaMP6s* 遺伝子改変マウスの興奮性神経細胞には、細胞内カルシウム濃度上昇に伴い蛍光強度が増加する蛍光タンパク質 (GCaMP6s) が発現している。そこで、940 nm, 1040 nm の励起波長を交互に照射し、GCaMP6s の細胞内カルシウム濃度上昇に伴う蛍光輝度の変化および神経細胞周囲のローダミン標識オレキシン A の集積を同時に記録した。撮像間隔は 1.96 秒、観察領域は 512×512 ピクセルで構成される $255 \times 255 \mu\text{m}^2$ とした。

カルシウムイメージングは大脳皮質第 II/III 層に相当する $200 \mu\text{m}$ の深さで実施した。ローダミン標識オレキシン A を適用する前に、自然発火による GCaMP6s の輝度変化を抑制するため、皮質表面に $1 \mu\text{M}$ のテトロドトキシン (TTX) を適用した。その後、ローダミン標識オレキシン A を皮質表面に適用し、GCaMP6s およびローダミン蛍光の輝度変化を経時的に記録した。また、ローダミン標識オレキシン A によるカルシウム応答がオレキシン受容体を介しているかを検討するため、 OX_1 受容体アンタゴニストである $10 \mu\text{M}$ の SB334867 および OX_2 受容体アンタゴニストである $10 \mu\text{M}$ の TCS-OX₂-29 を TTX と同時に適用した後、ローダミン標識オレキシン A の効果を検討した。

観察領域に存在する神経細胞から得られた GCaMP6s 蛍光輝度の経時的変化を Z-Score に変換し、カルシウム応答のピークが 5 以上のものを高応答神経細胞、5 未満のものを低応答神経細胞と定義した。観察領域にはしばしば、脳表を走行する太い血管による影響で信号が不明瞭となる部位が存在したため、この領域に存在する神経細胞は解析対象外とした。

島皮質表面に $10 \mu\text{M}$ のローダミン標識オレキシン A を適用すると、浸透に伴い観察領域全体でロ

ーダミン蛍光強度が徐々に増加した。それに伴い血管周囲にローダミン蛍光の強い集積が認められた。これは、脳に存在する血管はアストロサイトによって包囲されていることから、アストロサイト上に存在するオレキシン受容体にローダミン標識オレキシン A が集積している可能性が考えられた。そのため、血管と神経細胞のシグナルが分別できない位置に存在する神経細胞は、解析対象から除外した。ローダミン蛍光の輝度上昇と並行して多くの神経細胞において GCaMP6s 蛍光の輝度上昇を認め、そのカルシウム応答は数分以内にピークに達した。また、わずかな上昇もしくは輝度変化を示さない神経細胞も観察された。

カルシウム応答とローダミン蛍光の相関性を定量化するために、記録した神経細胞を高応答神経細胞と低応答神経細胞の 2 つに分類した。その結果、9 頭のマウスから 300 個の高応答神経細胞、141 個の低応答神経細胞を得た。神経細胞周囲のローダミン蛍光上昇の経時的变化を比較した結果、高応答神経細胞の周囲から得られたローダミン蛍光の上昇速度は低応答神経細胞よりも早く、ローダミン標識オレキシン A の投与から約 3 分後に有意に高い輝度となった。

カルシウム応答時の蛍光輝度上昇の軌跡は直線上でなく、しばしばゆっくりとした振動を伴うものが認められた。この振動が細胞内カルシウム濃度上昇に関わるかどうかを検討するために、ベースラインおよびローダミン標識オレキシン A 適用下でのカルシウム応答のパワースペクトラム解析を行ったところ、いずれも 0.04-0.05 Hz にピークを認める振動が存在することが明らかとなった。このことから、島皮質の神経細胞には未知の内因性のカルシウム振動を誘発する機構が存在する可能性が示唆された。

OX₁ 受容体アンタゴニストの SB334867 および OX₂ 受容体アンタゴニストである TCS-OX₂-29 の前処置によって、ローダミン標識オレキシン A 投与後に認められる高応答神経細胞の割合は有意に減少した。5 頭のマウスから、27 個の高応答神経細胞と 170 個の低応答神経細胞を記録した。この結果は、合成したローダミン標識オレキシン A はオレキシン受容体を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させたことを示している。

以上の結果から、島皮質の多くの興奮性神経細胞にはオレキシン受容体が存在しており、神経細胞がオレキシン A に対して示す応答性は不定であること、さらに、その根底にあるメカニズムとして、神経細胞膜上に発現しているオレキシン受容体の発現量が異なることが示唆された。