

論文の内容の要旨

氏名：千喜良 緑

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Orexin facilitates GABAergic synaptic transmission by activation of postsynaptic PKC without an increase in endocannabinoid in the rat insular cortex

（オレキシンはラット島皮質において内因性カンナビノイドの増加なしにシナプス後細胞の PKC を活性化して GABA 作動性抑制性シナプス伝達を促進する）

オレキシンは視床下部外側野で発見された神経ペプチドで、摂食行動の亢進、睡眠の各ステージの安定化、ニコチン依存の形成、疼痛抑制など多くの生理的機能を有することが知られている。中でも疼痛抑制に関しては、オレキシンの投与が急性および慢性疼痛における感覚閾値を上昇させることが明らかにされてきており、創薬への期待が高まっている。

侵害情報の処理において重要な役割を果たす大脳皮質の一領域である島皮質（IC）では、豊富なオレキシン含有線維の投射およびオレキシン受容体 1（OX₁R）およびオレキシン受容体 2（OX₂R）の発現が確認されている。また、中脳水道周囲灰白質や脊髄後角においてもオレキシンが疼痛抑制に関与するという報告がある。しかし、オレキシンによる局所神経回路の調節機構は不明で、とりわけ抑制性シナプス伝達に関する知見はほとんどない。大脳皮質には複数のサブタイプの GABA 作動性抑制性神経細胞が存在し、各々に固有の形態学および生理学的特徴を有することから、サブタイプ毎に解析を行うことが重要である。本研究では、抑制性シナプス伝達へのオレキシンの修飾作用を解明するため、GABA 作動性抑制性神経細胞の 1 つである fast-spiking 細胞（FSNs）および興奮性錐体細胞（PNs）から同時ホールセル・パッチクランプ記録を行い、単一抑制性シナプス後電流（uIPSC）に対するオレキシンの修飾作用を解明することを目的として実験を行った。

蛍光顕微鏡観察下で GABA 作動性抑制性神経細胞と興奮性錐体細胞を光学的に同定できる VGAT-Venus トランスジェニック・ラットを用いて、IC を含む冠状断の急性脳スライス標本を作製した。電流固定モードにおいて 300 ms の脱分極パルスを与えると FSNs は 100 Hz 以上の高頻度発火を示すと同時に大きな後過分極電位を発生することが知られているため、GABA 作動性抑制性神経細胞を光学的に同定した上で発火パターンを記録することにより FSNs を同定した。

OX₁R および OX₂R のアゴニストであるオレキシン A（100 nM）およびオレキシン B（100 nM）をそれぞれ灌流投与したところ、uIPSC の振幅が有意に増大した。この効果は、OX₁R アンタゴニストである SB-334867（10 μM）の前投与により阻害された。一方で、OX₂R アンタゴニストである TCS-OX2-29（10 μM）の前投与では阻害されなかった。加えて、選択的 OX₂R アゴニストである [Ala¹¹, D-Leu¹⁵]-orexin B（1 μM）の灌流投与は uIPSC を変化させなかった。以上の結果より、オレキシンは IC において、主に OX₁R を介して抑制性シナプス伝達を促進することが明らかになった。したがってこれ以降の実験では、OX₁R に対する親和性がオレキシン B の 50 倍高いとされる、オレキシン A のみを用いることとした。

uIPSC の増大は、paired-pulse ratio および failure rate の変化を伴わないことから、オレキシンはシナプス後細胞に作用していると推定される。このことを検証するため、シナプス前細胞への 5 連刺激（20 Hz）によりシナプス後細胞で記録される uIPSC のそれぞれの平均振幅（mean）およびばらつき（variance）をもとに Variance-mean analysis を行った。その結果、オレキシン A（100 nM）投与により、シナプス後細胞における変化により影響を受ける quantal size が有意に増大する一方で、シナプス前細胞側の要素である放出確率および放出部位の数は変化しなかった。さらに、Rubi-GABA を用いた laser photostimulation 法も行った。これは、tetrodotoxin（1 μM）、D-AP5（25 μM）、DNQX（40 μM）灌流下に、ガラス電極を用いて uIPSC を発生する PNs の近傍に放出させた Rubi-GABA（2 mM）を可視光レーザーにて活性化させ、GABA 電流（Laser-evoked GABA current）を記録するものである。この時オ

レキシシン A (100 nM) を共に投与すると、PNs で記録される Laser-evoked GABA current の振幅は有意に増大した。この Laser-evoked GABA current は、GABA_A 受容体アンタゴニストである bicuculline (10 μM) の灌流投与により完全に消失した。

OX₁R は G_{q/11} タンパク共役型受容体であるため、その細胞内セカンドメッセンジャーの阻害薬による uIPSC へのオレキシシン A による増強効果に対する影響を検討した。その結果、IP₃ 受容体アンタゴニストである 2APB (15 μM) または xestospongin C (1 μM) の前投与により、オレキシシン A の uIPSC への効果はそれぞれ阻害された。さらに、プロテインキナーゼ C (PKC) 酵素活性阻害薬である staurosporine (1 μM) または chelerythrine (1 μM) の前投与により、オレキシシン A の uIPSC への効果がそれぞれ阻害された。また、PNs 記録電極内液に Ca²⁺キレート剤である BAPTA (10 mM) を添加することにより、オレキシシン A の uIPSC への効果は阻害された。この時、BAPTA による細胞内 Ca²⁺のキレート作用発現の有無は、電流固定下にて PNs の活動電位を測定し、後過分極電位の振幅および half duration が Ca²⁺依存性 K⁺チャネルの不活性化により変化することを利用して確認した。

一方、laser photostimulation 法においても、細胞内セカンドメッセンジャー阻害薬による laser-evoked GABA current へのオレキシシン A による増強効果に対する影響を検討した。その結果、xestospongin C (1 μM) または chelerythrine (1 μM) の前投与により、オレキシシン A の laser-evoked GABA current への効果はそれぞれ阻害された。加えて、PKC 酵素活性薬である phorbol12-myristate13-acetate (2 μM) の投与は、laser-evoked GABA current の振幅を有意に増大させた。

オレキシシン受容体は、内因性カンナビノイド (eCB) の産生を惹起することが報告されているため、オレキシシンによる uIPSC の増強効果が、eCB による影響を含む可能性が考えられる。そこで、eCB 受容体のリガンドである 2-arachidonylglycerol (2-AG) の uIPSC への影響を検討した。その結果、2-AG (1 μM) の灌流投与により uIPSC は変化しなかった。

以上の結果より、オレキシシンはシナプス後細胞に発現した OX₁R に作用して IP₃ 受容体を介した Ca⁺の放出および PKC の活性化による GABA_A 受容体のリン酸化により抑制性シナプス伝達を促進することが明らかになった。このオレキシシンによる抑制性シナプス伝達の増大効果は、IC からの出力を低下させ、疼痛を抑制する可能性が示された。