

論文審査の結果の要旨

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）

審査委員：（主査） 教授 岩田 幸一

（副査） 教授 大井 良之 教授 小林 真之

教授 白川 哲夫

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つつある。侵害情報処理において重要な役割を果たす島皮質（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）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、ICにおけるオレキシンによる局所神経回路の調節機構については不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、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。

その結果、以下に示す知見を得た。

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. Rubi-GABA を用いた laser photostimulation 法を行ったところ、オレキシン A（100 nM）の投与により、PNs で記録される GABA 電流（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。
5. 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、オレキシン A の uIPSC への効果がそれぞれ阻害された。
6. 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、オレキシン A の uIPSC への効果は阻害された。
7. Xestospongin C（1 μM）または chelerythrine（1 μM）の前投与により、オレキシン A の laser-evoked

GABA current への効果がそれぞれ阻害された。さらに，PKC 活性化薬である 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。

8. 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。

以上から，オレキシンはシナプス後細胞に発現した OX_1R に作用して IP_3 受容体を介した Ca^{2+} 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ることによって疼痛を抑制する可能性があることを示している。本研究結果は創薬および新たな疼痛治療法の開発に寄与することが期待でき歯科医学に貢献すること大であると考えられる。

よって本論文は，博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和2年3月11日