

別紙 1 - 1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 向 井 康 敬

論 文 題 目

Identification of substances which regulate activity of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

(視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出因子産生神経の活動を調節する物質の同定)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

竹本 了やや 

名古屋大学教授

委員

久場 博 司 

名古屋大学教授

委員

有馬 寛 

名古屋大学教授

指導教授

山中 亨 弘 

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2





本論文は、急性脳スライス標本を用いたカルシウムイメージングによる神経活動調節物質のスクリーニング法を確立し、視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) 産生神経 (PVN-CRF 神経) の活動に対して、生理活性物質がどのように作用するかを明らかにした。PVN-CRF 神経特異的にカルシウム (Ca^{2+}) 指示タンパク質 (Yellowameleon-Nano50、YC) を発現するマウスを作出し、急性脳スライス標本を作製してカルシウムイメージングを行った。63 種類の候補物質を投与した結果、PVN-CRF 神経の Ca^{2+} 濃度は 12 物質により上昇し、3 物質により低下することを見出した。さらに選択的拮抗薬を用いて、アンジオテンシン II、ヒスタミン、カルバコールの 3 物質の反応に関与する受容体を同定した。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. 本研究では YC 発現細胞の同定に CRF 抗体を用いた免疫組織化学ではなく、CRF 神経特異的に組み換え酵素 (Cre) を発現するマウス (*CRF-iCre*) と、Cre 依存的に蛍光タンパク質 (tdTomato) を発現する遺伝子改変マウス (*Ai14*) を交配させたバイジェニックマウスを用いた。CRF の発現は体内のコルチコステロン量などの影響を受けて大きく変動するため、免疫組織化学では必ずしも全ての「CRF 産生神経」を同定できるわけではない。一方、今回用いた *CRF-iCre* マウスは CRF プロモーターによって Cre を発現し、*Ai14* は一度でも Cre を発現した細胞で tdTomato を発現する。このため本研究では、tdTomato 発現細胞を潜在的な「CRF 産生能」を持つ CRF 神経と捉え、YC 発現細胞の同定に使用した。
2. 本研究では最大 7 時間連続してカルシウムシグナルの記録を行った。この間、記録途中でシグナルが消失した細胞は解析に含めなかった。また、記録開始時点からシグナルが消失した細胞の数は 1 割未満であった。さらに、投与物質の順序を実験毎に変更して以前に投与した物質の影響を最小限に留めた。このため、長時間に及ぶ記録による細胞の状態への影響は少ないと考えられる。
3. 本研究では最大 171 細胞を同時に記録し、1 物質あたり最低 98 細胞のシグナルを記録した。これらの結果で生じた反応の大きさのばらつきの原因は、(1) PVN-CRF 神経における YC の発現強度の違い、(2) PVN-CRF 神経の物質に対する反応の多様性、(3) PVN-CRF 神経の物質投与前のシグナル変動の多様性、の 3 つが考えられる。
4. 本研究では主要な糖質コルチコイドであるコルチコステロンを投与したところ、PVN-CRF 神経において明らかな Ca^{2+} 濃度変化は観察されなかった。本研究では投与後 5 分間の Ca^{2+} 濃度変化にのみ着目したため、より長時間の解析では変化が認められる可能性がある。

本研究は、様々な種類の神経細胞の活動調節因子を同定するための有用な手法となる。以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	向井 康敬
試験担当者	主査	竹本 さやか		副査 ₁ 久場 博司 
	副査 ₂	有馬 寛		指導教授 山中 貴弘 
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. YC発現細胞の同定手法について 2. 長時間に及ぶ記録による細胞の状態への影響について 3. 反応の大きさにばらつきが生じた原因について 4. 糖質コルチコイドによる遺伝子発現制御や未知の受容体を介した影響の解析について <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、神経性調節学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				