

# 【 1 】

氏 名	お ざわ ひで ちか 小 澤 継 史
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第700号
学位授与の日付	平成29年10月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (麻酔・疼痛学)
学位論文題目	Three types of A11 neurons project to the rat spinal cord (A11領域内における3種類の神経細胞がラット脊髄へ投射する)
論文審査委員	(主査) 教授 藤 田 朋 恵 (副査) 教授 奥 田 泰 久 教授 松 島 久 雄

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【 背 景 】

ドーパミン (DA) 作動性神経細胞が豊富に存在する脳領域は通常の神経核を同定するNissl染色による区分と異なり、A8-A16の領域に分類されている。このうち、視床下部に存在するA11領域は脊髄に投射する唯一のDA細胞群であり、A11領域のDA経路は疼痛抑制に関わっている。さらに、この経路の活動性低下がレストレスレッグス症候群の1つの原因と考えられており、近年、A11領域内の部位ごとの異なる生理機能に関わる研究が散見されている。しかしながら、A11領域がどのような神経細胞から構成されているかは不明な点が多く、A11領域のDA経路の活動調節機構は明らかになっていない。

### 【 目 的 】

A11領域の神経細胞の構成、分布や局所神経回路網の構造を明らかにするために組織学的な検討を行った。手法として、DA神経細胞のマーカーであるチロシン水酸化酵素 (TH) に加え、カルビンディン (Calb) やパルブアルブミン (PV) などの神経細胞の分子マーカーとして使用されているカルシウム結合蛋白質の免疫組織化学染色を用いた。

### 【対象と方法】

本研究は動物実験倫理委員会による承認を得た後に、8週齢の雄のSprague-Dawley (SD) ラットを用いて実施した。ラットを灌流固定した後に脳を摘出し、クリオスタットを用いて脳の凍結薄切切片を作製した。得られた凍結薄切切片に対してCalb、PVおよびTHによる免疫組織化学染色を行った。解析では、A11領域は吻尾方向に広がるため、吻側、中間部、尾側の3ヵ所の部位に分けて各神経細

胞の神経細胞体の分布や大きさ、神経突起の伸張方向などについて、その特徴を評価した。

また、A11領域のDA細胞群は脊髄へ投射する唯一のDA細胞であることから、逆行性トレーサーであるフロオロゴールド (FG) を脊髄へ注入し、逆向性に標識された細胞のCalb、PVまたはTHによる免疫組織化学法を用いた2重染色を行い、A11領域から脊髄へ投射している神経細胞体の神経学的特徴も検討した。

### 【結 果】

A11領域において多方向に広がっているCalbおよびPV陽性の神経突起が存在した。神経細胞体は、Calb陽性の細胞体が高密度に検出されたが、PV陽性の細胞体は検出されなかった。すなわち、CalbとPVは共発現していなかった。Calb陽性細胞体の中にはTHを共発現する細胞も存在したが、THのみを発現している細胞群に比して少ない傾向にあった。A11領域では、TH陽性細胞 (TH+) とTHを発現しない非TH陽性細胞 (TH-) が存在し、さらにCalb陽性細胞 (Calb+) と非Calb陽性細胞 (Calb-) も認められた。FGを脊髄へ注入したSDラットの脳凍結切片の検討では、2重染色によって、TH+かつCalb-、TH+かつCalb+、TH-かつCalb+、TH-かつCalb-、の4種類の細胞群が同定された。

以上の結果から、赤核後部 (A8)、黒質緻密部 (A9)、中脳被蓋野 (A10) などの他のDA細胞群と同様に、A11領域も様々な種類の神経細胞で構成されていることが確認された。そして、これら4種の細胞には脊髄へ投射するものが存在することが明らかとなった。また、A11領域内におけるCalbおよびPV陽性神経突起の特徴的な分布として、吻側では短く様々な方向に伸び、尾側では垂直方向に長く伸びる傾向にあることが組織学的に明らかとなった。

### 【考 察】

多くの脳領域で、Calb発現細胞はグルタミン酸、GABA、アセチルコリンなどの伝達物質を持ち、神経細胞間の調節的役割を担っている。このことから、A11領域におけるTH-かつCalb+神経細胞の中に他の脳神経細胞にもみられるような神経細胞の活動調節を行う細胞が存在する可能性が示された。また、Calb陽性細胞がTH陽性細胞に近接して存在し、多数の神経突起がTH陽性細胞の間に広がっていることは、A11領域内での局所回路の存在を強く示唆するものであり、Calb陽性細胞はTH陽性細胞の活動調節を担っている可能性があると考えられた。しかしながら、A11領域外からの投射が存在している可能性も否定できず、今後の組織学的な検討が必要であると考えた。

これまでの行動生理学的実験によって、A11領域の吻側部と尾側部には異なる神経機能を持つことが知られている。本研究では、A11領域内におけるCalbおよびPV陽性神経突起の特徴的な分布を明らかにした。すなわち、吻側では短く様々な方向に伸び、尾側では垂直方向に長く伸びる傾向にある。このことは、A11領域の吻側と尾側に見られる生理的な機能の違いが、形態的に異なる神経回路による制御を受けている可能性を示唆する。

今回の実験で、A11領域にはDA細胞以外にも非DA細胞が存在することが示された。これらが脊髄へ投射していることを明らかにした。非TH陽性細胞が促進性か抑制性かはさらなる研究が必要であるが、この結果はA11領域のDA細胞による疼痛抑制はA11領域内の局所調節のみならず、脊髄でも行われている可能性を示し、この調節は様々な神経化学的特性をもった神経細胞によって行われている

であろうと考えられた。

## 【結 論】

A11領域の神経細胞には生理機能のみならず神経化学的な多様性のあることが確認された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

本研究では、ドーパミン (DA) 神経細胞のマーカーであるチロシン水酸化酵素 (TH) に加え、神経細胞の分子マーカーとして使用されているカルビンディン (Calb) やパルプアルブミン (PV) などのカルシウム結合蛋白質の免疫組織染色を行い、視床下部後部DA神経細胞が存在するA11領域の神経細胞の多様性や局所神経回路網の構造に関して組織学的な検討を行った。

灌流固定したSprague-Dawley (SD) ラットから脳を摘出し、凍結薄切切片を作製した。得られた切片はTH、CalbおよびPV抗体を用いた免疫組織染色を行い、A11領域の神経細胞体の分布や大きさ、神経突起の伸張方向などについて、神経化学的な特徴を評価した。その結果、A11領域内にはCalb陽性神経細胞体が高密度に検出されたが、PV陽性の神経細胞体は同じ領域には存在せず、TH陽性細胞 (TH+) と非TH陽性細胞 (TH-)、Calb陽性細胞 (Calb+) と非Calb陽性細胞 (Calb-) がこの領域に存在することを明らかにした。さらに少数ではあるがCalbとTHが共発現する細胞の存在を証明した。さらに、A11領域から脊髄へ投射する神経細胞の神経化学的特徴を検討するため、逆行性トレーサーであるフルオロゴールド (FG) を脊髄へ注入し、A11領域の切片をTHあるいはCalbで二重染色した。A11領域から脊髄へ投射する神経細胞にはTH+のみ、TH+およびCalb+、Calb+のみ、さらにTHおよびCalb-の4種類の細胞群が同定され、多様な神経調節機能を有する可能性が示唆された。

以上の結果から、視床下部後部DA神経細胞が存在するA11領域は、腹側被蓋野 (A10) を代表とするDA細胞群と同様に、多種類の神経細胞で構成されていること、またこの領域から脊髄へ投射する神経細胞にはDA神経細胞以外の細胞も存在すること、さらにこれら標識神経細胞の突起の分布の違いから、A11領域のDA神経細胞はA11領域内において内在性神経回路による調節を受けていることが明らかとなった。それぞれのマーカーにより標識される細胞がA11領域内で不均等に分布することから、この神経化学的な多様性はA11領域における生理機能の複雑さを背景にもつことが示唆された。

### 【研究方法の妥当性】

今回、SDラットを灌流固定し、摘出し作製した脳の凍結薄切切片を用いてTH、CalbとPV抗体による免疫組織染色を行った。この実験法は確立された手法であり、これまでA9 (黒質) やA10など他のDA神経細胞群も同様の手法を用いて局所内の神経調節機序の解明が進められてきた経緯がある。したがって、本研究の手法は妥当であると考えられる。

### 【研究結果の新奇性・独創性】

これまでの行動生理学的実験によって、A11領域の吻側部と尾側部では異なる機能を持つことが示唆されてきたが、その背景となる組織形態学的な解明はなされていない。本研究はA11領域の神経解剖学的・神経化学的な特性を明らかにした点で新奇性の高いものと考えられる。また、A11領域内におけ

るCalb+およびPV+神経突起の特徴的な分布が本研究によって明らかとなり、その構造は吻側では短く種々の方向に伸び、尾側では垂直方向に長く伸びる傾向にあることが確認された。これは、A11領域の吻側と尾側に見られる生理的な機能の違いが、形態的に異なる神経回路による制御を受けている可能性を示唆する所見である。さらに、A11領域にはDA細胞以外にも非DA細胞が存在し、これらが脊髄へ投射していることも明らかとなった。これらの研究結果はA11領域のDA細胞の主要機能である下行性疼痛制御がA11領域内の異なる神経化学的特性を持つ神経細胞により局所調節されるのみならず、脊髄でも行われている可能性を示唆する初めての研究であり、独創性の高い研究と考えられる。

#### **【結論の妥当性】**

A11領域は哺乳類の視床下部の一部であり、自律神経機能や神経内分泌機能と関連するが、特にこの部位のDA神経細胞が下行性疼痛制御に関与することが知られている。臨床的に疼痛制御にはオピオイド系薬物が使われるが、近年ではDA系、GABA系、グルタミン酸系の薬物も使用されており、本研究はこれらの事実と、これまでの行動生理学的・薬理学的実験によって示された結果と矛盾するものではなく、結論は妥当であると判断する。

#### **【当該分野における位置付け】**

本研究において、Calb+細胞がTH+細胞に近接して存在し、多数の神経突起がTH+細胞の間に広がっていることは、A11領域内での局所回路の存在を強く示唆するものであり、今後のA11領域と痛み疾患の関連を検討するための礎に位置付けられる。さらに、個体の週数（年齢）、性差、ホルモン調節などによるA11の役割を解明することで、これまで知られていなかった機能性疼痛疾患の機序解明の一助になると考えられる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、麻酔科学を研鑽したうえで、痛みの診断、評価、治療などの臨床経験も体得し、痛みや痺れなどの発症機序を解明するために免疫組織化学的手法、分子生物学的手法等を習得しながら基礎研究に関与してきた。それらの経験を通して研究遂行に必要な知識や能力は十分に獲得していると判断する。

#### **【学位授与の可否】**

本申請論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該研究分野への貢献度も高いと評価できる。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Neurochemical Research

42 : 2142-2153, 2017