

氏名	渡辺純
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 644 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	バソプレシンあるいはオキシトシン産生ニューロンのトランスジェニックラットを用いた局所破壊法の開発と社会的行動における役割の解明
論文審査委員	(委員長) 田島敏広教授 (委員) 菊地元史教授 須田史朗教授

論文内容の要旨

1 研究目的

社会記憶は、同種の個体を識別するための記憶であり、相手に応じて適切な行動を行うために必要であるが、その詳細な機構は不明である。この社会記憶にバソプレシンとオキシトシンが関与することが示唆されている。これらのペプチドは、どちらも脳内の視索上核（supraoptic nucleus: SON）、視床下部室傍核（paraventricular hypothalamic nucleus: PVN）そして分界条床核のニューロンで産生される。バソプレシンは、視交叉上核（suprachiasmatic nucleus: SCN）にも産生ニューロンが存在している。しかし、各領域のニューロンの社会記憶における役割の詳細は分かっていない。以上のことから本研究では、各領域のバソプレシンあるいはオキシトシン産生ニューロンを時期領域特異的に破壊する方法を確立させること、さらに PVN のバソプレシン産生ニューロン破壊した動物を用いて社会記憶テストを行い、社会記憶における役割の検討を行うことを目的とした。

2 研究方法

脳内局所のバソプレシンあるいはオキシトシン産生ニューロンを時期領域特異的に破壊するために、破壊の標的となる細胞にヒト型ジフテリア毒素受容体を発現させたトランスジェニックラットとジフテリア毒素投与を組み合わせた破壊法を用いた。ジフテリア毒素分子は、ジフテリア毒素受容体と結合し、細胞内に取り込まれ、細胞死を誘導する。ヒト型のジフテリア毒素受容体は、毒素に対する親和性がマウスやラットの受容体と比較して 1000 倍程度高い。本研究では、この特徴を利用し、ヒト型ジフテリア毒素受容体をバソプレシンあるいはオキシトシン遺伝子プロモーター制御下に特異的に発現するラット（VP-DTR および OT-DTR ラット）を用いて実験を行った。まず、VP-DTR ラットの脳室内にジフテリア毒素を投与し、バソプレシン産生ニューロンが破壊されるか、さらに尿崩症の症状を示すかを検討した。尿崩症の症状を示したラットに対し、バソプレシン受容体アゴニストを持続的に投与することで症状が消失するかの確認も行った。さらに、ジフテリア毒素を脳内局所に投与することでバソプレシンあるいはオキシトシン産生ニューロンを領域特異的に破壊する方法の検討を行った。視床下部におけるヒト型ジフテリア毒素受容体、バソプレシンあるいはオキシトシン産生ニューロンはそれぞれに対する特異抗体と二次抗

体を用いて免疫組織化学的に可視化した。さらに、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、ヒト型ジフテリア毒素受容体の mRNA を検出した。

社会記憶は、社会記憶テストにおける新奇個体に対する探索行動を定量化した。ラットは、出会ったことのある個体や物体よりも出会ったことのない新奇な個体あるいは物体に対して、より長く探索行動をするという特性を持つ。社会記憶テストでは、出会ったことのある個体と新奇個体とを同時に曝露させ、探索時間を計測した。このテストでは、出会ったことのある個体を記憶していれば、その個体の探索時間が短くなり、新奇個体の探索時間が長くなる。記憶の指標としては、この探索行動時間の比率を用いた。新奇個体あるいは新奇物体をより探索するほどこの指標は高値となる。社会記憶テストの対照実験としては、暴露させるものを物体にした物体記憶テストを行った。また、テストラットを長時間ほかのラットとケージに入れ、接触時間及び運動量を測定する社会的相互作用テストも行った。PVN のバソプレシン産生ニューロンが破壊されていたラットを用いて、行動テストを行い、PVN のバソプレシン産生ニューロンの社会記憶における役割を検討した。

3 研究成果

作成した VP-DTR ラットは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応と蛍光免疫染色の結果から、標的とする領域のバソプレシン産生ニューロン特異的にヒト型ジフテリア毒素受容体が発現することが示唆された。このラットの脳室内にジフテリア毒素を投与すると、非食塩負荷群ではバソプレシン陽性細胞数は変化せず、尿崩症様の症状を示さなかった。しかし、食塩負荷群では、ジフテリア毒素を脳室内に投与すると尿崩症様の症状が現れた。この症状は、バソプレシン受容体アゴニストを末梢に、持続的に投与することで改善された。食塩負荷群では、SON および PVN のバソプレシン陽性細胞が減少していた。SCN のバソプレシン陽性細胞数および視床下部のオキシトシン陽性細胞数に関しては、有意に変化しなかった。

VP-DTR ラットの SON 領域へジフテリア毒素を局所投与することにより、バソプレシン陽性細胞数は、SON および PVN の両方でトランスジェニックラット群において有意に減少した。また、SCN においては有意には変化しなかった。オキシトシン陽性細胞数に関しては、SON、PVN ともに有意な差はなかった。

ジフテリア毒素を PVN 領域に投与した VP-DTR ラットでは、人工脳脊髄液投与ラットと比較して PVN 領域のバソプレシン陽性細胞数が大きく減少していた。SON 領域のバソプレシン陽性細胞数も減少した。また、オキシトシン陽性細胞数には差がなかった。

PVN のバソプレシン陽性細胞が平均して 77%減少したラットにおいて、社会記憶テストと物体認知記憶テストを行った。両テストにおいて、トレーニングセッションの間の探索時間および記憶指標に関して人工脳脊髄液投与群とジフテリア毒素投与群の間に有意な差はなかった。社会的相互作用テストにおける接触時間および行動量も差はなかった。

OT-DTR ラットの SON 領域へジフテリア毒素の局所投与を行った結果、オキシトシン陽性細胞数が SON だけでなく PVN でも有意に減少した。

4 考察

VP-DTR ラットに対して、ジフテリア毒素を脳室内に投与した場合、食塩水を負荷しておく

ソプレシン陽性細胞数が減少し、飲水量および尿量は上昇し、尿の浸透圧が低下した。飲水量、尿量および尿の浸透圧は、バソプレシン受容体アゴニストを投与することで、野生型ラットと同程度の値にまで回復した。これらの結果から、食塩水を負荷した VP-DTR ラットへのジフテリア毒素の脳室内投与は、バソプレシン陽性細胞数を減少させ、中枢性の尿崩症様の症状を誘発することが明らかとなった。

VP-DTR ラットに対して、ジフテリア毒素を局所投与した場合、食塩水を負荷しなくても、投与部位のバソプレシン陽性細胞数が減少した。これは、バソプレシン産生ニューロンの破壊には局所投与が効果的であることを示している。

PVN 領域のバソプレシン産生ニューロンを破壊した動物を用いて、社会記憶および物体認知記憶テストそして社会的相互作用テストを行ったが、テストの結果に有意な差はなかった。従って、PVN のバソプレシン産生ニューロンは社会記憶に必須ではないのかもしれない。

5 結論

VP-DTR ラットに対し、ジフテリア毒素を脳室内投与することで SON と PVN のバソプレシン陽性細胞数が減少し、中枢性の尿崩症様の症状が出現した。また、ジフテリア毒素を視床下部の局所に投与することでバソプレシン陽性細胞を局所的に破壊することが出来た。OT-DTR ラットに対し、ジフテリア毒素を投与することでオキシトシン陽性細胞数が減少した。本研究の結果は、VP-DTR および OT-DTR ラットがバソプレシンあるいはオキシトシン産生ニューロンの破壊のモデルとなり、これらの産生ニューロンの働きを明らかにするために用いることができることを示唆する。

論文審査の結果の要旨

【学位論文内容】

バソプレシンとオキシトシンは社会記憶、社会相互作用などに関与することが知られている。これらのペプチドホルモンは脳内において視索上核 (supraoptic nucleus: SON)、視床下部室傍核 (paraventricular hypothalamic nucleus: PVN) で合成される。また一部は分界条床核 (bed nucleus of stria terminalis: BSNT) で産生される。さらにバソプレシンは視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) においても産生される。このように脳内の複数の領域にわたりバソプレシンとオキシトシン産生ニューロンが存在するが、どの部位のニューロンが社会記憶、社会相互作用に役割を果たしているのかは明らかになっていない。

そこで渡辺氏は、ラットを用いて領域特異的にそれぞれの産生ニューロンを破壊する新しい手法の開発に取り組んだ。さらにバソプレシン産生ニューロン領域特異的破壊を行ったラットにおいて行動実験を行い、社会記憶の変化を検討した。

【学問的意義】

このような研究は今までおこなわれたことがなく、新規性に富むチャレンジングな研究である。

第 1 にバソプレシンとオキシトシン遺伝子プロモーター制御下にヒト型ジフテリア毒素受容体遺伝子を組み込んだトランスジェニックラットの作成に成功した。

第 2 にジフテリア毒素により、産生ニューロンを破壊することを証明した。まず脳室内にジフ

テリア毒素を投与することによりバソプレシン産生ニューロンを破壊し、ラットが尿崩症になること、SON, PVN でのバソプレシン産生ニューロンが減少していることを明らかにした。さらにマイクロインジェクション法を用いて PVN と SON にジフテリア毒素を局所投与することにより、それぞれの領域のバソプレシン産生ニューロンを局所的に破壊できることを証明した。

第 3 に PVN のバソプレシン産生ニューロンを局所的に破壊したラットを用いて行動解析をおこなったが、社会記憶については野生型との差を認めなかった。

第 4 にオキシトシンの局所破壊については、SON へのジフテリア毒素投与により、SON に加え PVN においてもオキシトシン産生ニューロンの著しい減少を認めた。

上記よりバソプレシンとオキシトシンの産生ニューロンを局所的に破壊するラットモデルの作成に初めて成功したことは学問的価値が極めて高い。これらのラットを用いることにより、バソプレシンとオキシトシンニューロンの記憶、行動さらには攻撃性、性行動などの多くの役割の解明に有用なモデルラットであり、今後の発展性が大いに期待される。オキシトシン産生ニューロンの局所破壊、ラットにおける社会記憶の検討については、方法も含めてさらなる検討が必要である。

以上より新規性にとみ、科学的であり、学位論文に十分値すると審査会では判断した。

改訂点

1 バソプレシン産生ニューロンの局所破壊に成功しなかった個体が存在し、マイクロインジェクションの精度の改善が今後必要である。

2 免疫染色において HB-EGF の発現が細胞膜に認められず、細胞質に認められる。また AVP 産生が少ない細胞に逆に HB-EGF の発現が多く認められた。今後のさらなる検討が必要である。

3 p40 行動実験の考案について

野生型と差異が認められなかった理由については PVN 産生ニューロンの破壊が十分でなかったことが考案されている。仮にその仮説が正しいとすると、モデルとして十分有用ではない可能性がある。改善点、今後の展望も含めて、内容を再検討していただきたい。

4 オキシトシンニューロンの局所破壊については、技術的に克服可能なのか、今後の検討が必要である。

最終試験の結果の要旨

バソプレシンとオキシトシンは脳内のいくつかの領域で産生されている。またバソプレシンとオキシトシンは記憶、社会行動に関与するが、どの領域が関与しているのかは明らかになっていない。そこでバソプレシンとオキシトシン産生ニューロンの局所的破壊のモデルラットを作成することができれば、どの部位が記憶、社会行動に機能を果たすのかを明らかにできる。

そのため渡辺氏はバソプレシンとオキシトシン遺伝子プロモーター制御下にヒト型ジフテリア毒素受容体が発現するコンストラクトを構築し、トランスジェニックラットの作成に成功した。ヒト型ジフテリア毒素受容体がバソプレシン産生ニューロンに共発現すること、ジフテリア毒素を脳室内投与することにより、バソプレシン産生ニューロンを特異的に破壊し、尿崩症をラットに引き起こされることを示した。さらにマイクロインジェクションにより、SON, PVN にそれぞれジフテリア毒素を投与することによりバソプレシン産生ニューロンの局所的破壊に成功したこと

をバソプレシン産生ニューロンの免疫組織学的手法で証明した。

引き続きバソプレシン産生ニューロンを特異的に破壊したラットを用いてその社会記憶について、新奇個体に対する探索行動と物体記憶テストにより定量化し、野生型と比較し検討を行った。その結果は当初の予想に反して、野生型と差異を認めなかった。

オキシトシン産生ニューロンの局所破壊については、SON へのジフテリア毒素投与により、SON に加え、PVN のオキシトシン産生ニューロンも有意に減少し、こちらも予想に反していたことが示された。

また最後に今後このトランスジェニックラットを用いた研究の発展性について述べた。

以上発表については、十分な実験かつ豊富なデータに基づいて行われ、科学的かつ理路整然であった。

審査委員からは、主に、1 PVN バソプレシン産生ニューロン破壊ラットにおいて社会記憶の変化がなかった点、2 バソプレシン産生ニューロン細胞でのヒト型ジフテリア毒素の発現量、細胞膜への発現、3 オキシトシン産生ニューロンの局所的破壊についての3点が質問された。

いずれにおいても的確に解答し、社会記憶の検討方法、免疫組織染色法の検討、マイクロインジェクション法の改良点を提示した。

このような結果から学位論文も含めて、最終試験においても申請者が学位取得に必要なかつ十分な能力、知識を備えていると判断し、合格と判定した。