

学 位 論 文 要 旨

氏名 森 脇 千 夏

論 文 題 目

Distribution of histaminergic neuronal cluster in the rat and mouse hypothalamus.....

(ラットとマウス視床下部におけるヒスタミン神経クラスターの分布)

要 旨

【緒言】

ヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) によって、L-ヒスチジンから合成される。ヒスタミン感作性神経系は、多数の結節状構造の樹状突起と軸索で HDC を含む神経細胞からなり、日内リズム、覚醒睡眠、食行動、熱発生、神経内分泌制御、気分、記憶、学習と認識能力などの多くの脳機能に関係している。ラット脳内におけるヒスタミン神経細胞の分布については、Watanabe,1984、Inakagki,1990 ら他によって乳頭核領域(TMN) において E1-E5 というやや広範囲な領域で合成されていることが報告されているが、ヒスタミン神経クラスターの明確な局在に関する研究は少なく、あっても一部の領域に限ったものである。本研究は、ヒスタミン神経クラスターの分布を明らかにすることを目的とした。

【研究対象および方法】

動物は Wister 系 ラット(雄性、約 10 週齢)、C57BL/6 マウス(雄性、約 10 週齢)それぞれ 10 匹を用いた。動物を深麻酔下にて 4%paraformaldehyde で灌流固定し、脳を取り出して同固定液にて 24 時間固定した。上昇系列アルコールにて脱水、パラフィン包埋し、10 μ m 連続切片とした。一次抗体は polyclonal Rabbit Anti HDC 抗体(PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg)を用い、二次抗体は HRP

標識 Envision 抗 Rabbit IgG (DAKO) を使用し、DAB で発色し、光学顕微鏡にて観察・撮影し、Rat Brain map (Paxinos and Watson, 2005)、Mouse Brain map (Franklin and Paxinos, 2008) を用いて評価した。先行研究に基づいて、今回 HDC 免疫反応陽性神経細胞クラスターを新たに分類した。さらにヒスタミン神経クラスター内の各神経単位の直径は、個々の顕微鏡検査像のスケール・バーによって計量されて、平均値±標準誤差 (μm) として評価された。Stereological quantification 評価は、HDC 免疫反応陽性神経細胞数の正確な推定値を得るために用いた。

【結果】

E1 は最後部視床下部の腹外側部に限局する大型細胞群として、E2 は後部視床下部の腹外側部にやや広く分布する大型細胞群として、それぞれ認められ、多くの報告と矛盾しなかった。一方、E3 は正中隆起および弓状核の外側領域に、E2、E1 および E5 と比較しても有意に小さい最小細胞群として認められた。E4 は視床下部内側部の第 3 脳室周囲に背側結節乳頭核:DTM(dorsal tuberomammillary nucleus) を中心に広範囲に分布する小型細胞群として認められ、最吻側の脳室周囲の周室核:Pe(periventricular hypothalamic nucleus) から視床下部室傍核下部領域:Spa(subparaventricular zone of the hypothalamus)、背内側核:DM(dorsomedial hypothalamic nucleus) で認められた。E5 は視床下部全体にびまん性に拡散した中型細胞群として認められ、最吻側は前部視床下部の脚部外側野:PLH(peduncular part of lateral hypothalamus) および隆起部外側野:TuLH(tuberal region of lateral hypothalamus) の分布に沿って尾側へ拡散し、E2 が認められる前額断位置付近より背側と尾側に更に別れ、背側では視床下部後核:PH(posterior hypothalamic nucleus) から後部視床下部:PHA(posterior hypothalamic area) に至る範囲で、腹側では視床下部外側野:LH(lateral hypothalamic area) から前乳頭核:PM(premammillary nucleus) に至る範囲で、それぞれ散在性に認められた。HDC 陽性神経細胞群の Stereological quantification 評価では、マウスよりラットでより多い陽性細胞数が認められた。

【考察・結語】

本研究における HDC 免疫反応陽性神経細胞クラスターの分布は、先行研究と矛盾しなかった。本研究で我々の Brain Map に基づいた HDC 免疫反応陽性神経細胞クラスターの正確な局在を示した結果は、ヒスタミン感受性ニューロン・システムの将来の研究のナビゲーターとして役立つ可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 551 号	氏名	森 脇 千 夏
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	松原悦朗
		副査氏名	吉岡秀克
		副査氏名	上村尚人
<p>論文題目 Distribution of histaminergic neuronal cluster in the rat and mouse hypothalamus (ラットとマウス視床下部におけるヒスタミン神経クラスターの分布)</p> <p>論文掲載雑誌名 Journal of Chemical Neuroanatomy</p> <p>論文要旨</p> <p>【緒言】 ヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) によって、L-ヒスチジンから合成される。ヒスタミン感作性神経系は、多数の結節状構造の樹状突起と軸索で HDC を含む神経細胞からなり、日内リズム、覚醒睡眠、食行動、熱発生、神経内分泌制御、気分、記憶、学習と認識能力などの多くの脳機能に関係している。ラット脳内におけるヒスタミン神経細胞の分布については、Watanabe, 1984、Inakagki, 1990 ら他によって乳頭核領域 (TMN) において E1-E5 というやや広範囲な領域で合成されていることが報告されているが、ヒスタミン神経クラスターの明確な局在に関する研究は少なく、あっても一部の領域に限ったものである。本研究は、ヒスタミン神経クラスターの分布を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【研究対象および方法】 動物は Wister 系 ラット (雄性、約 10 週齢)、C57BL/6 マウス (雄性、約 10 週齢) それぞれ 10 匹を用いた。動物を深麻酔下にて 4%paraformaldehyde で灌流固定し、脳を取り出して同固定液にて 24 時固定した。上昇系列アルコールにて脱水、パラフィン包埋し、10 μm 連続切片とした。一次抗体は polyclonal Rabbit Anti HDC 抗体 (PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg) を使い、二次抗体は HRP No.2 標識 Envision 抗 Rabbit IgG (DAKO) を使用し、DAB で発色し、光学顕微鏡にて観察・撮影し、Rat Brain map (Paxinos and Watson, 2005)、Mouse Brain map (Franklin and Paxinos, 2008) を用いて評価した。先行研究に基づいて、今回 HDC 免疫反応陽性神経細胞クラスターを新たに分類した。さらにヒスタミン神経クラスター内の各神経単位の直径は、個々の顕微鏡検査像のスケール・バーによって計量されて、平均値±標準誤差 (μm) として評価された。Stereological quantification 評価は、HDC 免疫反応陽性神経細胞数の正確な推定値を得るために用いた。</p> <p>【結果】 E1 は最後部視床下部の腹外側部に限局する大型細胞群として、E2 は後部視床下部の腹外側部にやや広く分布する大型細胞群として、それぞれ認められ、多くの報告と矛盾しなかった。一方、E3 は正中隆起および弓状核の外側領域に、E2、E1 および E5 と比較しても有意に小さい最小細胞群として認められた。E4 は視床下部内側部の第 3 脳室周囲に背側結節乳頭核: を中心に広範囲に分布する小型細胞群として認められ、最吻側の脳室周囲の周室核から視床下部室傍核下部領域、背内側核で認められた。E5 は視床下部全体にびまん性に拡散した中型細胞群として認められ、最吻側は前部視床下部の脚部外側野および隆起部外側野の分布に沿って尾側へ拡散し、E2 が認められる前額断位置付近より背側と尾側に更に別れ、背側では視床下部後核から後部視床下部に至る範囲で、腹側では視床下部外側野から前乳頭核に至る範囲で、それぞれ散在性に認められた。HDC 陽性神経細胞群の Stereological quantification 評価では、マウスよりラットでより多い陽性細胞数が認められた。</p> <p>【考察・結語】 本研究における HDC 免疫反応陽性神経細胞クラスターの分布は、先行研究と矛盾しなかった。本研究で我々の Brain Map に基づいた HDC 免疫反応陽性神経細胞クラスターの正確な局在を示した結果は、ヒスタミン感作性ニューロン・システムの将来の研究のナビゲーターとして役立つ可能性がある。</p> <p>本研究は、これまで不明確であったヒスチジン作動性細胞の脳内局在を Brain Map に基づき初めて標準化したもので、ヒスチジンが関与する様々な病態研究の礎になるもので、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 (課)・論	第551号	氏名	森脇千夏
審査委員会委員	主査氏名	松原悦朗 	
	副査氏名	吉岡秀克 	
	副査氏名	上村尚人 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 先行研究のヒスタミン作動性ニューロンの形態的特徴について 2. 「クラスター」の用語定義について 3. 先行研究でアルツハイマー病とヒスタミンとの関係はどこまで判っているか 4. マウスの先行研究の内容について 5. アルツハイマー病患者の剖検例において脳内ヒスタミンが低下したという先行研究があるということであるが、どのような方法でヒスタミンを測定したのか？ 6. 立体的総数の求め方について 7. 加齢による差の検証についてどう考えているか？ 8. 今後、本研究知見をスタンダードにするにあたり、実験計画時に考慮した点は何か？ 9. 抗体を使用するにあたって、チェックの方法について 10. 神経細胞の直径はどのようにして測定したのか？ 11. 直径については、全ての動物で得られた細胞での統計量ということなのか？ 12. Stereological estimationにおけるN totalという概念は、ある部位に関して一定の厚みあたりの細胞の総数を示すということは、細胞の密度を示しているという考えでよいのか？ 13. 機能解析を加味し、オレキシンA, B等との蛍光顕微鏡などでの二重染色など検証しなかったのは何故か？ 14. 弱拡大ばかりでなく、強拡大での局在観察を加えなかったのは何故か？ 15. アルツハイマー病との因果関係を示唆する知見は得られているか？ 16. 脳幹所見は先行研究にない新規知見か？であればその意義は？ 17. 過去の研究結果と本研究結果の違いについて 18. この研究では、HDCの存在する細胞を同定しているが、それは自動的にhistamine neuronと考えてよいのか？ 19. 今後この研究の活用のあり方をどう考えているか？ 20. ヒスタミンと加齢との関係で先行研究の知見にどのようなものがあるか？ 21. コレステロール関連での様々な介入を考えているのであれば、脳内のコレステロール産生源であるアストロサイトに関して今回知見は得られているか？これまでの報告は？ 22. 発生におけるヒスタミン発現の意義について 23. 視床下部におけるヒスタミンの発現の男女差について 24. 脳内ヒスタミンシグナルと褐色肥満細胞との関連はあるのか？ あるとすれば、肥満治療への創薬応用についての現状は？ 25. OCT2/3は、ヒスタミンの再取込みに関わるトランスポーターなのか？ 26. HDC, OCT2/3や下流の酵素についても局在があるとすれば、部位に依存した機能の解明に役に立つかもしれない(コメント)。 27. ナルコレプシー患者での脳内ヒスタミンは増加しているというが、ヒスタミンとオレキシンとの間のinterplayをテーマにした研究は進んでいるのか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審議委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。