別記様式第６号（第 16 条第３項，第 25 条第３項関係）

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

博士の専攻分野の名称	博士（　医学　）	氏名	寺井　はるひ
学 位 授 与 の 条 件	学位規則第４条第①・２項該当		

論　文　題　目
Electrophysiological and pharmacological characterization of spreading depolarization in the adult zebrafish tectum
（ゼブラフィッシュ成魚視蓋における拡延性脱分極の電気生理学的および薬理学的特徴）

論文審査担当者

主　　査　　教授　　　丸山　博文　　　　　印

審査委員　　教授　　　堀江　信貴

審査委員　　准教授　　飯田　幸治

〔論文審査の結果の要旨〕

拡延性脱分極（SD）は神経細胞やグリアの脱分極が波状に伝搬する現象で、多くの研究から SD は片頭痛や脳梗塞、脳外傷などの神経疾患で発生する事が明らかになっている。しかし、これらの臨床学的重要性にも関わらず、SD の分子メカニズムは明らかになっていない。その背景には、これまでの SD 研究がマウスのような哺乳動物を用いて進められ、より遺伝子操作や効率的な薬剤スクリーニングに特化したモデル動物による実験系が確立されていないことが問題点として挙げられる。

ゼブラフィッシュは遺伝子操作や表現型スクリーニングを簡便に行うことができるモデル脊椎動物として古くから使用されてきた。例えば、てんかんなどの神経疾患の進行や病態生理に関わる新規遺伝子の同定や、これらの遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いたドラッグスクリーニングによる多くの新規抗てんかん薬候補の同定に成功している。SD はてんかん同様に興奮性の亢進を伴うが、ゼブラフィッシュを用いた SD の研究は皆無である。ゼブラフィッシュを用いた抗てんかん薬開発の成功を鑑みると、ゼブラフィッシュにおける SD 実験系を開発することは喫緊の課題である。この問題に取り組むため、本研究ではゼブラフィッシュを用いた電気生理学実験系を新規に開発し、ゼブラフィッシュ SD モデルを確立した。

SD は哺乳動物においては電気生理学的に観察され、細胞外フィールド電位の直流成分（低周波成分）の大きな減少（DC シフト）と、交流成分（高周波成分）の減弱が起こる事が特徴的である。無動化したゼブラフィッシュ成魚視蓋において電気生理学的記録を行ったところ、塩化カリウム刺激によって誘発された DC シフトとその伝搬する様子が観察された。この伝搬速度はマウスの大脳皮質の SD で観察されたものと同程度であった（ゼブラフィッシュ：平均±標準誤差 4.96±0.596 mm/min, マウス：4.56±1.68 mm/min, p = 0.551）。さらに、この DC シフトは細胞外電位の交流成分の一時的減少も伴っており、マウス大脳皮質 SD と同様の特徴を示した。ゼブラフィッシュ視蓋におけるこれらの電気的変化は局所的な血流の増加と同時に引き起こされており、マウスの大脳皮質 SD で観察された脳血流量の増加と高い類似性を示した。

SD による神経細胞の分子的変化を調べるために、記録後のゼブラフィッシュ脳を固定し、最初期遺伝子である c-fos タンパク質の発現分布を調べたところ、SD を引き起こした個体では対照群と比較して有意に高い発現を視蓋の periventricular gray (PVG)に認めた。また、他の動物種で関与が示唆されているグルタミン酸作動性神経伝達の役割を調べるため、N-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体阻害薬である MK-801 を投与した。実験の結果、薬剤投与群で塩化カリウム誘導性 SD の伝搬速度が対照群と比較して有意に低下していた（薬剤投与群：平均±標準誤差 3.31±0.109 mm/min, 対照群：4.96±0.597 mm/min, p = 0.00894）。これらの結果は、ゼブラフィッシュ視蓋がマウス大脳皮質と同様の SD を示し、その背景にグルタミン酸作動性神経伝達が関与することを示唆している。哺乳類と同様にグルタミン酸作動性神経伝達が SD を媒介していることから SD は種や脳領域を超えて進化的に保存されていることが示唆された。

本研究ではゼブラフィッシュ成魚視蓋において初めて SD を観察し、ゼブラフィッシュが

今後のSD研究に有用なモデル動物となる可能性を示した。ゼブラフィッシュでは、CRISPR/Cas9によるヒト遺伝子変異導入が容易であり、本実験系を応用した片頭痛などの神経疾患の病態研究への展開が期待される。

よって審査委員会委員全員は，本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。