

論文の内容の要旨

論文題目：瞬目反射条件付けにおける小脳 LTD 及び小脳皮質神経回路の役割

氏 名：鈴木 成教

[はじめに]

瞬目反射条件付けとは、条件刺激(CS)を音、無条件刺激(US)をまぶたへの電気刺激とし、CS-US をペアにして繰り返し与えることにより、CS のみで条件応答(CR)としての瞬きをするようになる学習である。瞬目反射学習の paradigm には CS と US が同時に終わる delay paradigm と CS と US が時間的に重ならない trace paradigm がある。ウサギを用いた損傷実験により、前者には小脳が必須であり、後者には小脳に加えて海馬が重要であるということが明らかにされた。しかし、損傷実験の場合、目的の部位と共にその周辺部まで損傷される可能性、目的の部位が完全に損傷されていない可能性、それから目的の部位が不可逆的に除去されることにより、残った部位に何らかの変化が生じる可能性が常に存在し、明確な結論を導くためにはより精度の高い実験が求められた。また、瞬目反射学習の神経基盤としては小脳皮質における長期抑圧(LTD)が重要な役割を果たすという LTD 仮説が立てられた。この LTD 仮説を検証するために、これまでに小脳 LTD に障害を持ついくつかのノックアウトマウスを用いた実験が行われ、delay paradigm における学習障害が観察された。さらに、小脳特異的に発現するグルタミン酸受容体サブタイプ GluR δ 2 をノックアウトした LTD 障害マウスにおいては、delay paradigm では学習が障害されるが、trace paradigm では野生型マウスと同等な学習がなされる事が見いだされた。このことは、学習には LTD 依存的なメカニズムと非依存的なメカニズムの2種類があり、これらが paradigm 依存的に切り替わることを示唆している。しかしながら、ノックアウトマウスにおいては、未知の障害や補償回路が存在する可能性があるため、この paradigm 依存的な学習が GluR δ 2 ノックアウトマウスに特異的なことなのか、それとも野生型マウスを含む一般的な系で起こることなのか、さらなる検討が必要となった。そこで私は、小脳 LTD に必須の因子である一酸化窒素 (NO) の生産を、その合成阻害薬物により阻害することで、delay paradigm における LTD 仮説の検証を行うとともに、瞬目反射学習に及ぼす効果の paradigm

依存性を野生型マウスを用いて調べることを目的とした。さらに、AMPA、カイニン酸受容体阻害剤 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) により薬理的に小脳皮質を阻害したマウスや小脳プルキンエ細胞脱落マウスを用いて、小脳皮質回路が瞬目反射学習にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

[方法]

CSとしては音(1 kHz, 90 dB, 352 ms)を、USとしてはまぶた皮下への電気刺激(100 Hz, 100 ms)を用いた。刺激電圧の大きさは無条件応答 (UR) を起こさせる最小限の大きさに設定した。

NO 合成阻害薬 N^G -nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME; 15 mM, 0.5 μ l/animal)は条件付け開始 20 分前に小脳左半球の simplex lobe に定速注入した(0.5 μ l/min)。

[結果と考察]

1. 瞬目反射条件付けにおける小脳 LTD の関与

小脳内に直接L-NAMEを投与した動物群(○)では、delay paradigm の acquisition の7日間(session 3-9)ほとんど学習率は上がらず、コントロール群(Saline, あるいは D-NAME 投与群)に比べて有意に学習率が低かった($p < 0.01$ by ANOVA in session 3-9)。一方、trace paradigm (trace interval = 0 ms)では、コントロール群と同様に学習した($p > 0.05$ by ANOVA in session 3-9)。NO 阻害剤により小脳 LTD が阻害されることが報告されており、これらの結果は小脳 LTD 阻害によるものと考えられ、GluR δ 2 ノックアウトマウスの結果から示唆された「瞬目反射学習には小脳 LTD 依存的なメカニズムと非依存的なメカニズムの2種類があり、これらが paradigm 依存的に切り替わる」という仮説を支持している。また、delay paradigm において小脳 LTD が重要な役割を演じているという小脳 LTD 仮説を支持している。しかし、GluR δ 2 ノックアウトマウスを含めたこれまでの小脳 LTD 欠損マウスに比べ、delay paradigm における学習障害はより顕著である。学習障害の程度が違う可能性として考えられるのは(1)平行線維→プルキンエ細胞の LTD 以外の NO 依存的な可塑性が小脳内に存在し、学習に関係している可能性、(2)ノックアウトマウスで常に問題とされる補償回路が存在する可能性、が挙げられる。

2. 小脳皮質神経回路の薬理的阻害が CR 表出に及ぼす効果

delay paradigm および trace paradigm (trace interval = 0 ms)において saline を小脳内投与して7日間条件付けを行って学習を成立させ(session 3-9)、その後AMPA、カイニン酸受容体の阻害剤であるCNQX(3 mM, 0.5 μ l/animal)を小脳内投与して条件付け (session 10)を行った。CNQXによりAMPA、カイニン酸受容体が阻害されると、登上線維(US入力)および平行線維(CS入力)からの小脳皮質のプルキンエ細胞(唯一の出力細胞)への興奮性入力に阻害され、小脳皮質からの出力が阻害されることとなる。結果としては、どちらのparadigmにおいてもCNQX投与により、学習率は有意に低下した($p < 0.01$ by paired-*t* test, session 9 vs. 10)。これは、delay paradigm においても trace paradigm においても、CR を表出するために simplex lobe 周辺の小脳皮質回路が重要な役割を演じていることを示している。L-NAME 投与の実験の結果と併せて考えると、trace paradigm において、小脳 LTD がなくても学習は出来るが、CR を表出するメカニズムの一つとして小脳皮質の神経回路が関与していることが示唆された。これまで、HVI lobe (simplex lobe に相当するウサギの部位)を損傷した時に、一時的に学習率が低下するという結果が報告されている。しかし、この場合小脳深部核まで損傷されている可能性や、不可逆的に損傷部

位がなくなったことにより、残った部位に何らかの変化が起こる可能性もあり、純粋な小脳皮質損傷の影響を観察できていない可能性もあった。今回の薬理実験では可逆的に小脳皮質回路を阻害することにより、trace paradigm における CR の表出に対する純粋な小脳皮質阻害効果を明らかにすることに初めて成功したと思われる。

3. プルキンエ細胞脱落による CR 表出に対する効果

Cre-loxP 組換え系を利用したプルキンエ細胞除去マウス(NSE-DTA;CrePR1 マウス)を用いて、CR の表出において小脳皮質回路がどのように関与しているかを調べることを目的とした。Cre-loxP 組換え系を利用した神経細胞除去マウス(NSE-DTA マウス)では神経細胞特異的エノラーゼ遺伝子座に、ジフテリア毒素の遺伝子が組み込まれており、組換えがおこった後に毒素が産生された神経細胞が除去される。また、神経細胞で誘導型Cre組換え酵素を発現するトランスジェニックマウス(CrePR1 マウス)では、RU486の投与により、主に小脳プルキンエ細胞で誘導的な組換えが起こる。NSE-DTA マウスと CrePR1 マウスを交配し得られたマウス(NSE-DTA;CrePR1 マウス)にRU486を投与すると、主に小脳プルキンエ細胞でジフテリア毒素が産生され、細胞が除去される。私は、NSE-DTA;CrePR1 マウスを用いて delay paradigm で条件付けを行い(session 3-8)、学習成立後に RU486 を 5 日間投与し(session 8 - session 12)、引き続き条件付けを続け(session 13-20)、プルキンエ細胞脱落に伴う学習率の変化を調べた。NSE-DTA;CrePR1 マウスに RU486 を投与した動物群を実験群として、NSE-DTA;CrePR1 マウスに OIL を投与した動物群と、NSE-DTA マウスに RU486 を投与した動物群をコントロール群とした。結果としては、プルキンエ脱落とともに学習率が有意に低下することが観察された($p < 0.01$ by ANOVA in session 9-20)。これは delay paradigm において CR の表出に小脳皮質の神経回路が必要であることを示唆している。これまで、Purkinje cell degeneration マウス(プルキンエ細胞のないミュータントマウス)において delay paradigm における学習障害が報告されていたが、プルキンエ細胞が生後 2 週間ぐらいから脱落し始めるため、条件付けに用いた成体マウスにおいては補償回路が存在する可能性がある。今回の研究では、正常に働いていたプルキンエ細胞を比較的短期間に脱落させることにより、代償機構が働きにくい状況下でのプルキンエ細胞脱落の効果を調べることができた。また、CR の表出に小脳皮質が必要であるという結論を、小脳皮質損傷実験よりも精度の高い系により明確に導くことが出来た。