

## 審査の結果の要旨

氏名 佐藤 暢彦

TrkB を介した BDNF シグナリングは、ニューロンの発達、シナプス可塑性、記憶・学習などにとって重要な役割をしているだけでなく、近年、不安障害やうつ病といった情動障害への関与も明らかになってきている。また、線条体は運動の制御、手続き記憶や薬物濫用にとって重要な脳部位であることが知られており、更にはうつ病、強迫性障害、ADHD や統合失調症といった障害への関与も示唆されている。そこで、本研究は線条体における BDNF/TrkB シグナリングの役割を明らかにするため、Cre-loxP 系を用いた線条体選択的な TrkB ノックアウトマウス (変異マウス)の系統を確立し、組織学的解析および行動学的解析を行い、以下の結果を得ている。

1. **Medium spiny neuron (MSN)**は、線条体のニューロンの 90-95%を占める投射ニューロンである。コントロールマウスと変異マウスから得た脳切片に対し *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行ったところ、変異マウスにおいて、MSN 選択的な TrkB mRNA のシグナルの消失が観察された。この観察結果を定量化するため、コントロールマウスと変異マウスの線条体をホモジナイズして得た試料に対し定量 PCR 解析を行ったところ、変異マウスではコントロールマウスに比べ、TrkB mRNA が量的に顕著に減少していた。また、TrkB のタンパク質量を定量化するため、コントロールマウスと変異マウスの線条体をホモジナイズして得た試料に対しイムノブロット解析を行ったところ、変異マウスではコントロールマウスに比べ、TrkB タンパク質の量が約 50%まで減少していた。変異マウスの線条体 MSN (ポストシナプス)では TrkB mRNA が顕著に消失していることから、この残留している TrkB タンパク質は MSN に投射しているニューロンの終末 (プレシナプス)に存在する TrkB のものと考えられる。以上のことから、線条体のプレシナプスの TrkB

は残したまま、ポストシナプスである MSN における TrkB の役割を解析することが可能な変異マウスの系統が確立出来たと言える。

2. 線条体の MSN は、dopamine D1 receptor (D1R), substance P, muscarinic acetylcholine receptor 4 (mAChR M4) を特異的に発現している直接経路のニューロンと、dopamine D2 receptor (D2R), enkephalin, adenosine A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R) を特異的に発現している間接経路のニューロンに大別される。コントロールマウスと変異マウスから得た脳の切片に対し *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行ったところ、変異マウスの線条体で enkephalin mRNA のシグナルの減少が確認された。これに対し、D1R, substance P, mAChR M4, D2R, A<sub>2A</sub>R mRNA のシグナルは、コントロールマウスと変異マウスの間に顕著な違いが観察されなかった。この結果を定量化するため、コントロールマウスと変異マウスの線条体をホモジナイズして得た試料に対し定量 PCR 解析を行ったところ、コントロールマウスに比べ、変異マウスでは enkephalin mRNA が量的に顕著な減少を示したのに対し、substance P mRNA についてはコントロールマウスと変異マウスとの間に顕著な差はみられなかった。また、コントロールマウスと変異マウスから得た脳の切片に対して免疫染色解析を行ったところ、コントロールマウスに比べ、変異マウスでは間接経路を構成する MSN の投射先である淡蒼球外側において enkephalin のシグナルの減少が観察されたのに対し、直接経路を構成する MSN の投射先である黒質においては substance P のシグナルにコントロールマウスと変異マウスで顕著な違いが観察されなかった。これらのことは、線条体 TrkB が間接経路における enkephalin の発現の制御に関わっていることを示している。
3. 変異マウスとコントロールマウスが同一ケージで飼育されている場合のみ、1 割程度の頻度で背中に重度の傷を負ったマウスが観察されたことから、変異マウスにおける攻撃性の亢進の可能性が考えられた。そこで、攻撃行動を定量化するため、コントロールマウスと変異マウスに対し *isolation-induced aggression* を行ったところ、コントロールマウスに比べ、変異マウスは攻撃行動の頻度が顕著に高いことが明らかになった。このことは、線条体 TrkB が攻撃行動の抑制に重要であることを示している。

また、先行論文により enkephalin の減少が攻撃行動を亢進させることが明らかになっている(König ら, 1996)ことと、本研究で変異マウスの間接経路

で **enkephalin** の減少が見られたことから、線条体 **TrkB** による攻撃行動の抑制が、間接経路における **enkephalin** の発現の調節を介したものである可能性が考えられる。

4. 攻撃行動との関与が示唆されている不安様行動について調べるため、コントロールマウスと変異マウスに対し高架式十字迷路試験を行ったところ、コントロールマウスに比べ、変異マウスは **open arm** への進入頻度および滞在時間の割合が顕著に高かった。また、ガラス玉覆い隠し試験を行ったところ、コントロールマウスに比べ、変異マウスでは隠されたガラス玉の数が顕著に少なかった。これらの結果は、変異マウスでは不安様行動が減弱していることを示しており、従って、線条体 **TrkB** は不安様行動の発現に重要であると言える。
5. 高架式十字迷路試験、ガラス玉覆い隠し試験において、変異マウスが一貫して高い行動量を示したことから、変異マウスでは自発運動活性が亢進している可能性が考えられたため、コントロールマウスと変異マウスに対しオープンフィールド試験および 24 時間行動量解析を行った。コントロールマウスに比べ、変異マウスはオープンフィールド試験および 24 時間行動量解析の暗サイクルにおいて顕著に高い自発運動活性を示した。これらのことは、線条体 **TrkB** が新規環境および活動時間における自発運動活性を抑制的に制御していることを示している。

以上、本論文は線条体選択的な **TrkB** ノックアウトマウスの系統を確立し、解析することにより、線条体 **TrkB** が自発運動活性の抑制、不安様行動の発現、攻撃行動の抑制にとって重要な役割を担っていることを明らかにし、更に、攻撃行動の抑制に、線条体 **TrkB** による間接経路における **enkephalin** 発現の調節が関与している可能性を示した。これらの結果は、先行研究でなされてきた **BDNF/TrkB** シグナリングの脳全体としての役割の解析ではなく、線条体に焦点を当てて解析することにより得られた新しい知見であり、運動機能障害、不安障害、攻撃行動のメカニズム解明に大きく貢献するものとして、学位の授与に値するものと考えられる。