

論文内容の要旨

論文題目

扁桃体抑制性ネットワークオシレーションの生成機構と
ドーパミンによる調節作用の解明

Mechanism of rhythm generation and dopaminergic modulation of
inhibitory network oscillation in the amygdala

氏名： 大城 博矩

背景

扁桃体は恐怖・不安といった情動、またこのような情動による記憶の調節において重要な役割を果たす脳の部位であり、その機能調節メカニズムとして周期的な神経活動(オシレーション)が提案されている。オシレーションはシナプスの可塑的な変化を促進することで神経回路ネットワーク間における繋がりを変化させると考えられている。実際に恐怖記憶の固定や再固定の過程において、海馬や大脳皮質といった記憶にとって重要な部位と扁桃体との間におけるオシレーション活動の同期によって、恐怖記憶の固定が促進されることが報告されている(Seidenbecher *et al.*, 2003; Narayanan *et al.*, 2007; Popa *et al.*, 2010)。

オシレーションによる神経ネットワーク活動の調節において、グルタミン酸作動性の興奮性神経伝達や GABA 作動性の抑制性神経伝達は重要な役割を果たしている。扁桃体内のグルタミン酸作動性錐体神経細胞および GABA 作動性介在神経細胞はドーパミン作動性神経細胞の投射を受けており、恐怖条件付けや恐怖の表出といった扁桃体に関連付けられている行動が、ドーパミン受容体作動薬や拮抗薬を扁桃体内に投与することで影響を受ける (Pérez de la Mora *et al.*, 2010)。

ラット扁桃体基底外側核の錐体神経細胞よりホールセルパッチクランプ記録を行うと、自発的、

周期的(1 Hz 以下)な振幅の大きい抑制性シナプス後電流(IPSC)が観察される。この周期的な IPSC 活動、すなわち抑制性ネットワークオシレーションは情動による記憶固定の促進において重要な役割を果たしていると考えられているが、そのメカニズム、とりわけドーパミンによる調節作用に関する研究はほとんどなされていない。そこで本研究は、ドーパミンによる抑制性ネットワークオシレーションの調節作用およびその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

方法

10~40 日齢両性 Wistar ラットより扁桃体を含む脳スライス標本を作成し、扁桃体基底外側核錐体神経細胞、および介在神経細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して電気生理学的及び薬理的検討を行った。介在神経細胞からの記録には、小胞型 GABA 輸送体遺伝子に蛍光タンパク質 Venus を発現させた遺伝子改変ラットを用いた。ドーパミンおよびドーパミン受容体作動薬・拮抗薬の作用は 0.1-3.0 Hz におけるパワースペクトルの曲線下面積で定量化した。ドーパミン等の薬物は灌流液より適用した。

結果

ドーパミンは、その濃度およびオシレーション活動の初期状態に依存して異なる影響を与えた。すなわち、オシレーション活動の初期値が小さい細胞に対してドーパミン 10 μM はオシレーションを促進する一方、初期値が大きい細胞に対してはドーパミン 30、100 μM はオシレーションを抑制した。

ドーパミン受容体は D_1 、 D_5 のサブグループからなる G_s タンパク共役型の $D1$ 様受容体と、 D_2 、 D_3 、 D_4 のサブグループからなる $G_{i/o}$ タンパク共役型の $D2$ 様受容体の二種類に大別される。オシレーション促進および抑制作用におけるドーパミン受容体サブタイプ別の関与を明らかにするために、各受容体の作動薬および拮抗薬を用いて解析を行った。オシレーション活動初期値が小さい細胞において、 $D1$ 様受容体作動薬もしくはドーパミンと同時に $D2$ 様受容体拮抗薬を適用することでオシレーションは促進された。また、ドーパミン 10 μM のオシレーション促進作用は $D1$ 様受容体拮抗薬によって消失した。一方、オシレーション活動の初期値が大きな細胞において、 D_4 受容体作動薬もしくはドーパミンと同時に $D1$ 様受容体拮抗薬を適用することでオシレーションは抑制された。またドーパミン 30 μM によるオシレーション抑制作用は D_4 受容体拮抗薬によって消失した。以上の結果より、オシレーション初期値が小さい細胞におけるドーパミンによるオシレーション促進作用は $D1$ 様受容体を介して、初期値が大きい細胞における抑制作用は D_4 受容体を介して生じることが明らかとなった。

次に、抑制性ネットワークオシレーションのメカニズムを明らかにすることを目的として、錐体神経細胞とGABA作動性介在神経細胞から2細胞同時ホールセルパッチ記録を行ったところ、錐体神経細胞における抑制性ネットワークオシレーションと同期した興奮性シナプス後電位のオシレーション活動(EPSPオシレーション)が介在神経細胞において観察された。Rainnie *et al.* (2006)の基準に従いこのEPSPオシレーションと介在神経細胞の発火パターンとの関連を調べた結果、EPSPオシレーションが観察されたのはstutter-firingニューロンでは90.3%(28/31 cells)、regular-firingニューロンでは60%(3/5 cells)、fast-firingニューロンでは61.5%(8/13 cells)であった。

オシレーション回路内におけるD1様受容体、D₄受容体の作用点を推定するために、介在神経細胞に対するD1様受容体およびD₄受容体作動薬の作用を解析した。介在神経細胞上のEPSPオシレーション頂点付近における活動電位発火頻度をD1様受容体作動薬は増加させ、D₄受容体作動薬は減少させた。D1様受容体作動薬は介在神経細胞に対する直接的興奮作用として脱分極刺激による活動電位発火頻度を上昇させた。一方、D₄受容体作動薬は介在神経細胞に対して直接作用を示さなかった。介在神経細胞より上流の回路から入力する興奮性シナプス後電流(EPSC)に対して、D1様受容体作動薬はEPSC面積を増大させ、D₄受容体作動薬はこれを減少させた。以上のことから、ドーパミンによる抑制性ネットワークオシレーション促進作用は介在神経細胞自体およびその上流に存在するD1様受容体を介して、抑制作用は介在神経細胞の上流に存在するD₄受容体を介して生じることが明らかとなった。

考察

ドーパミンが抑制性ネットワークオシレーションを弱い活動状態に対しては促進し、強い活動状態に対しては抑制することから、ドーパミンによる調節作用は抑制性ネットワークオシレーションをある適切な活動状態に維持する機能をもつことが考えられる。扁桃体におけるオシレーション活動は情動による記憶固定の促進において重要であること、またドーパミンは意欲・動機づけにおいて重要な神経伝達物質であることから、これらの結果は報酬系の適切な活動レベルが記憶の固定を促進するという現象を考える上でその作用機構の一端を示唆するものと考えられる。