

論文審査の結果の要旨

論文提出者： 大城 博矩

扁桃体は恐怖・不安といった情動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。実際に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。扁桃体における神経回路オシレーションは、例えば海馬や大脳皮質といった記憶にとって重要な部位における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、情動による記憶の固定を調節していると考えられている。その生理学的な機能から、恐怖や不安に関する記憶の傷害であるパニック障害やPTSD、負の情動記憶の影響が考えられるうつ病といった精神疾患の発生メカニズムに扁桃体オシレーションが関与している可能性が考えられる。このように生理学的に重要な機能が想定され、かつ疾患との関連も考えられる重要な現象である扁桃体オシレーションはその生成機構や神経伝達物質による調節機構について多くの点が不明なままである。

一方、扁桃体に対してドーパミンニューロンから投射があり、恐怖や不安といった扁桃体との関わりが示されている行動が、ドーパミンによって調節されていること、さらに扁桃体における神経細胞の活動がドーパミンによって調節されていることから、扁桃体ネットワークオシレーション活動の調節にドーパミンが大きく関わっている可能性が示唆される。

そこで論文提出者は、扁桃体を含む脳スライス標本においてオシレーション神経活動が報告されている基底外側核錐体神経細胞よりホールセルパッチクランプ法を用いて記録を行い、ドーパミンによるオシレーション調節作用とその作用機序、また受容体サブタイプ別の調節作用をシナプスレベルで明らかにすることを目的として実験を行った。さらに、オシレーションの生成や調節において重要な役割を果たしていると考えられる介在神経細胞の活動を明らかにするため、介在神経細胞を蛍光タンパク質を用いて可視化した遺伝子改変動物を用い、介在神経細胞からの直接記録、および介在神経細胞と錐体神経細胞との同時記録を試みた。

まず本論文では、ドーパミンによる扁桃体抑制性ネットワークオシレーション調節作用について述べられており、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、オシレ

ーションに対して異なる影響を与えることが明らかにされた。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た解析が行われた。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が行われた。その結果、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。

最後に、オシレーション回路内における $D1$ 様受容体、 D_4 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 D_4 受容体作動薬の作用について解析が行われた。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、 D_4 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、 D_4 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、 D_4 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。

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。

以上の結果は、扁桃体における抑制性ネットワークオシレーションに対するドーパミンの作用、またドーパミン受容体サブタイプ別の寄与や作用メカニズムなどを詳細に検討を行った、初めての研究である。また直接記録を行うことが困難である介在神経細胞より記録を行い、オシレーション作用メカニズム解明に先鞭をつけた点において、神経科学における基礎研究、また以降の応用研究に対して大きな貢献をするものと認められる。したがって、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するのにふさわしいものと認定する。