

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 シャーラー ワレヂャニ

発達期の中樞神経系は、神経回路基盤に基づいた、周期的かつ同期的な自発活動の伝播という特徴的なネットワーク振動を示す。この回路活動は、神経成長や、シンプス形成、回路形成などに関与し、神経機能の成熟に重要な役割を果たすと考えられている。これまで、大脳新皮質や海馬、あるいは脳幹や網膜などの神経系の様々な領域において、初期ネットワーク振動の存在が明らかとされているが、振動発生や伝播のメカニズムは領域によって異なることが示されている。

ワレヂャニは、扁桃体に注目して初期ネットワーク振動に関する研究を行った。扁桃体は、海馬と並び大脳辺縁系の主要な脳部位であり、情動を司ることが知られている。また近年社会的にも問題になっているうつ病や不安症、心的外傷後ストレス障害などにも扁桃体が深く関与していることが知られている。こうした精神疾患は環境要因のみならず、幼少期あるいは胎生期のストレスによってもその後の罹患率が上昇することが示唆されていることから、扁桃体の回路成熟機構を研究することは、扁桃体を起因とする精神性疾患の発症機構を理解する上で重要である。しかし、扁桃体の発生および成熟に着目した研究は少なく、回路形成がどのようになされるのか、ということに関する知見は殆どない。初期ネットワーク振動はどの脳部位においてほぼ普遍的に発生していることがわかっている。ワレヂャニは扁桃体においてもその他の脳領域と同様に初期ネットワーク振動が発生するという仮説を立て、扁桃体における初期ネットワーク振動とその他の脳領域で観察される初期ネットワーク振動との関連性を求めるとともに、扁桃体独自の回路形成の機構を明らかにするという研究戦略を立てた。

本研究において、幼若マウスから扁桃体を含む脳スライスを作成し、当研究室で開発改良された「機能的多ニューロン画像法 (functional multineuron calcium imaging, fMCI) を活用することで、自発的な神経活動の記録を試みた。その結果、幼若マウスの扁桃体において、シナプス活動に起因した初期ネットワーク振動を発見し、この神経活動の時空間パターンおよび発生機構の解明に取り組んだ。

1. 幼若マウスの扁桃体における初期ネットワーク振動

幼若マウス脳スライス標本にカルシウム蛍光指示色素 (Oregon Green 488 BAPTA-1AM) を負荷し、扁桃体領域から fMCI を行ったところ、自発的なカルシウム振動が観察された。扁桃体のニューロンからパッチクランプ記録を行うことにより、fMCI で記録される自発的なカルシウム濃度上昇がネットワーク振動に基づくバースト発火を反映したものであることを確認した。この自発的なカルシウム振動、すなわち初期ネットワーク振動は、生後1週間以内のマウス扁桃体において、数分間隔で繰り返し生じることを明らかにした。さらに、この初期ネットワーク振動が扁桃体内部のみで生じるか否かを明らかにするために、脳スライス標本から扁桃体領域のみをメスで切り出し、微小スライスを作成した。その結果、扁桃体組織のみで初期ネットワーク振動が生じることを明らかにした。さらに扁桃体を背側部と腹側部に分離切断したところ、腹側部のみにおいて振動が観察された。これらのことから扁桃体腹側部にネッ

トワーク振動の起始部があり、この活動が背側部へと伝播することで、扁桃体全体で同期した初期ネットワーク振動が生じることを明らかにした。初期ネットワーク振動に対し、様々な薬理的検討を行ったところ、電位感受性ナトリウムチャンネル、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体およびGABA_A受容体が関与することが明らかになった。したがって、初期ネットワーク振動は化学シナプス活動に依存した活動であると推察される。

2. 幼若期マウス扁桃体の初期ネットワーク振動と周辺脳領域との関連性

扁桃体とその周囲の脳領域においてそれぞれ観察される初期ネットワーク振動の時空間上の関係に着目した。低倍率の対物レンズを用いることで、扁桃体とその周辺脳領域（大脳皮質や海馬）から同時にカルシウム振動を観察することに成功した。その結果、扁桃体腹側部に起始する初期ネットワーク振動は、しばしば大脳皮質や海馬の活動と同期していることを見出した。そこで扁桃体腹側部を電気刺激することで扁桃体に初期ネットワーク振動を惹起させた。この人為的に生じさせた活動は、電気生理学的な記録により2秒ほどの脱分極を伴った発火活動であることを確認した。すなわち自然発生した振動ときわめて類似しており、惹起された扁桃体の活動はその後、大脳皮質や扁桃体へと伝播した。

3. 幼若期マウス扁桃体の初期ネットワーク振動の発達による変化

扁桃体の初期ネットワーク振動と皮質との同期パターンを観察したところ、扁桃体の振動には少なくとも3つのパターンが存在することが判明した。1つ目は扁桃体単独で生じる孤発性振動、2つ目は扁桃体が振動直後に皮質が振動を始める同期性振動、そして3つ目は扁桃体の振動に先行して皮質で振動が生じている同期性振動である。さらに詳細な観察を進めたところ、これら3つのパターンの発生頻度は、マウスの発達に応じて変化することが明らかとなった。扁桃体が主導を握ると考えられる扁桃体単独振動と扁桃体→皮質振動の二つは、胎生期から生後0日齢までの発達初期において優勢であるのに対し、皮質→扁桃体はそれ以降に優勢となり少なくとも生後4日齢までは観察された。このことから発達後期では皮質が扁桃体の初期ネットワーク振動を支配していると考えられた。

本研究においてワレデヤニは、マウス扁桃体における初期ネットワーク振動を初めて観察することに成功した。さらに同振動のメカニズムを解明したのみならず、他脳部位との関連を明らかにした。本研究は、従来未知であった扁桃体の発生および成熟について重要な知見を与えるのみならず、扁桃体を病巣とする精神疾患の病態解明に貢献することが期待されるため、博士(薬学)の学位に値するものと判定した。