

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 中山 大輔

2つの異なる情報の関連性を記憶する連合学習は日常の様々な場面でみられ、その機構解明は神経科学における最重要課題の一つである。連合学習に寄与する脳領域の一つに前頭連合野がある。これまでに、前頭連合野が連合学習に寄与すること、音などの感覚刺激によって前頭連合野シナプスの構造的変化が生じることが報告されている。しかし、前頭連合野が連合学習に寄与する細胞・神経回路機構は未だ不明である。本論文は、学習における前頭連合野の役割解明を目的とし、細胞・神経回路レベルでの検討を行った結果をまとめたものである。

本研究では、連合学習のモデルとして、文脈的恐怖条件づけを用いている。この課題においてマウスは、「環境」と「電気ショック」の関連性を学習し、その環境を恐怖の対象として記憶する。マウスは再び実験環境に提示することで、電気ショックのない状態でもすくみ反応を示す。すくみ反応時間を測定することで記憶の程度を定量できる。

文脈的恐怖学習における前頭連合野の必要性を確認するため、NMDA 受容体阻害薬またはタンパク質合成阻害薬（アニソマイシン）を前頭連合野内に局所投与している。NMDA 受容体阻害薬またはアニソマイシンの投与により学習が障害されたことから、文脈的恐怖学習に前頭連合野が寄与することを示した。

前頭連合野が環境と電気ショックのうち、どちらの情報処理に寄与するかを検討するため、文脈的恐怖学習を改変し、環境と電気ショックの提示を 1 日間空けることで分離した。まず、環境提示直後に前頭連合野内にアニソマイシンを投与することで環境の情報処理に与える影響を検討した。アニソマイシンの投与によって、テスト時のすくみ反応時間が低下した。前頭連合野は環境の情報処理に寄与すると考えられる。次に、電気ショック提示直後にアニソマイシンを投与することで電気ショックの情報処理に与える影響を検討した。環境提示直後と同様に、アニソマイシン投与によって、テスト時のすくみ反応時間が低下した。これらの結果から、前頭連合野は環境と電気ショック両方の情報処理に寄与することが示唆された。

前頭連合野が環境と電気ショック両方の情報処理に寄与する。このことから中山は、学習時に前頭連合野の同一神経細胞が異なる 2つの情報を受け取ることで、情報が統合されると考えた。環境と電気ショックに対する神経細胞の活動をそれぞれ独立して検出し、比較するためには、時間的に離れた 2 点の活動を区別して検出する必要がある。そのため、Arc catFISH 法を用いている。Arc mRNA は神経活動 5 分後に核内に、神経活動 30 分後に細胞質にのみ局在する特徴を

有しており、Arc の細胞内局在に着目することで個々の細胞の活動履歴を捉えられる。

Arc catFISH 法により環境と電気ショックに対する前頭連合野の活動を解析するため、環境と電気ショックを 25 分の間隔を空けて提示した。環境提示 30 分後に細胞質に、電気ショック提示 5 分後に核内に Arc を発現することを確認するため、それぞれ環境群、電気ショック群を設けた。その結果、環境群では、細胞質陽性細胞数の増加がみられたが、核陽性細胞数は対照群と同程度であった。電気ショック群では、細胞質陽性細胞数は対照群と同程度であったが、核陽性細胞数の増加がみられた。そして学習群では、細胞質陽性・核陽性細胞数ともに増加した。これらの結果から、環境と電気ショックそれぞれに対して前頭連合野の神経細胞が活動することが示唆された。更に、核・細胞質両方に Arc を発現している細胞数の割合を解析した結果、学習群でのみ核・細胞質共陽性細胞の割合が多かった。核・細胞質共陽性細胞の割合は、偶然核・細胞質両方に Arc を発現しうる割合であるチャンス値よりも高い値を示した。以上のことから、前頭連合野の一部の同一神経細胞が学習時に環境と電気ショック両方の情報を受け取っていると考えられる。

最後に、前頭連合野に環境と電気ショックの情報を送っている脳領域を検討した。神経トレーサーであるコレラトキシンサブユニット B (CTB) を前頭連合野内に局所投与し、その逆行性シグナルを全脳で解析することで前頭連合野に投射を送る領域を同定した。文脈的恐怖学習との関連が示されている脳領域の中でも、特に鼻周囲皮質と島皮質において逆行性シグナルが多くみられた。そこで中山は、環境・電気ショックの情報処理における鼻周囲皮質→前頭連合野・島皮質→前頭連合野経路の機能を検討した。

まず、前頭連合野内に CTB を局所投与することで、前頭連合野に投射を送る神経細胞を標識した。そして、環境または電気ショックを提示後に脳を摘出した。神経活動依存的に発現する c-Fos タンパク質の免疫染色により、神経活動を可視化した。その結果、鼻周囲皮質では環境提示によって c-Fos 陽性細胞数が増加したが、電気ショック提示時には対照群と同程度であった。一方で、島皮質では電気ショックの提示によって c-Fos 陽性細胞数が増加したが、環境提示時には対照群と同程度であった。この結果から、前頭連合野に投射を送る鼻周囲皮質神経細胞が環境提示時に、島皮質神経細胞が電気ショック提示時にそれぞれ活動することが示唆された。更に、鼻周囲皮質の活動を Na チャネル阻害薬で阻害した場合、前頭連合野の環境に対する Arc 発現が抑制された。島皮質の活動を阻害した場合、前頭連合野の電気ショックに対する Arc 発現が抑制された。以上の結果から、鼻周囲皮質が環境の情報を、島皮質が電気ショックの情報を前頭連合野に送ると考えられる。

本研究により、連合学習における前頭連合野の細胞・神経回路機構が明らかとなった。前頭連

合野は、環境・電気ショック両方の情報処理に寄与する。そして、鼻周囲皮質・島皮質を介して送られてくる環境・電気ショックの情報が、前頭連合野内の同一神経細胞内に収斂する。別々の神経回路を介して送られてくる異なる情報が前頭連合野内の同一細胞内で統合されることで連合学習が形成されると考えられる。

本論文は、前頭連合野内での異なる 2 つの情報の統合を支える一細胞レベルから神経回路レベルの機構を初めて明らかとした点で意義深い。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。