

審査の結果の要旨

氏名 五十嵐 ひかる

前帯状皮質(anterior cingulate cortex: ACC)は、多様な脳機能に関与する脳領域である。齧歯目における ACC 興奮性神経の活性化は場所嫌悪性を惹起するほか、ヒトにおいては侵害刺激を予測することで ACC の活性化が起こることが報告されている。一方、ACC は認知や報酬関連行動に関わることも報告されている。他者への報酬譲渡の際に ACC が活性化することがサルで報告されているほか、ヒトの ACC への電気刺激は物事への意欲を向上させるといった報告も存在する。ACC に存在する神経細胞は、他の脳領域に投射を送ることも複数報告されている。そこで本研究では「ACC が担う異なる情報は、神経投射によって分類されている」という仮説のもと、齧歯目による光遺伝学的手法を用いて検証を行った。以下、本研究により得られた主要な知見をまとめた。

1. ACC 興奮性神経細胞の他領域投射の解析

ACC からの神経投射を組織学的に観察するため、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてラット ACC の興奮性神経細胞に Channelrhodopsin-2(ChR2)-eYFP を導入した。ChR2-eYFP を CaMKII α プロモーターの下流に接続した AAV ベクターを ACC に投与することで、神経終末の eYFP 蛍光により投射先を同定した。投与から少なくとも 6 週間以上が経過後に、免疫組織化学法を用いて全脳レベルでの解析を行った。その結果、前障、側坐核、視床、扁桃体基底外側核、中脳水道周囲灰白質などの領域で eYFP の蛍光が観察された。

PAG は活性化により痛みを抑制することが知られている。ACC もまた痛みに関与することが報告されている脳領域のため、特に ACC-PAG 経路に着目して以下の実験を行った。ACC への ChR2-eYFP 導入により、PAG の中でも特に背側で強い蛍光が観察された。また、マウス背側 PAG に逆行性トレーサーである Fluoro-Gold を注入し、ACC 神経細胞が標識されるかの検討を行った。Fluoro-Gold を注入してから 2 週間以上が経過した後に ACC を蛍光観察したところ、トレーサー注入と同側の第 V, VI 層において Fluoro-Gold 陽性の細胞が多く観察された。これらの結果から、ACC 第 V, VI 層に存在する興奮性神経細胞の一部は背側 PAG に対して投射を送っていることが同定された。

2. ACC 神経細胞は PAG 神経細胞と興奮性シナプスを形成する

光遺伝学的手法、および電気生理学的手法を用い、ACC 神経細胞が PAG 神経細胞とシナプスを形成しているかを検証した。ACC の興奮性細胞に ChR2-eYFP を導入し、6 週間以上が経過した後に PAG を含む脳スライス標本を作製した。ChR2 は青色光の照射によって Na⁺チャネルが開口し、発現した神経細胞を興奮させるはたらきを持つ光感受性イオンチャネル受容体である。そこで ChR2 を発現した ACC 神経終末近傍の背側 PAG 神経細胞からパッチクランプ記録を行い、光を照射した際の応答を観察した。励起光である青色光を照射し、PAG に投射する ACC 神経終末を活性化させたところ、興奮性シナプス後電流

が観察された。一方、抑制性シナプス後電流は光刺激を行っても観察されなかった。これらの結果から、ACC 神経細胞は背側 PAG 神経細胞に対して直接的に興奮性投射を送っていることが示された。

3. ACC-PAG 経路の活性化は運動量を増加させる

ACC-PAG 経路の活性化が行動学的にどのような変化を引き起こすかについて、オープンフィールド試験を用いて検討を行った。ACC に ChR2-eYFP を導入し、光ファイバーを通じて PAG に青色光を照射、*in vivo* で ACC-PAG 経路を活性化させた。コントロール群として、eYFP のみを導入、発現したマウスを用いた (eYFP 群)。光刺激の強度決定のため、まず 3 種類の刺激強度を用いて検討を行った。白い壁のフィールドにマウスを入れ、2.5 分ごとに光照射の有無を切り替えて 20 分間行動を観察した。この結果、9 mW の刺激強度で運動量が増加する傾向が見られた。そこで、9 mW の光刺激で以下の検討を行った。光刺激ありとなしのセッションを 3 回繰り返し、各セッションの移動距離を算出した結果、ChR2 群は eYFP 群と比較して光照射時に有意に移動距離が増加した。光照射を行わない時間帯では、移動距離に有意な差はみられなかった。また、マウスの探索行動の指標の一つである立ち上がり行動の頻度をカウントした。フィールド壁際でのマウスの立ち上がり回数をカウントした結果、pre から 1 回目の光刺激において ChR2 群で光照射時に立ち上がり行動が有意に増加した。eYFP 群ではそのような傾向はみられなかった。また、不安の指標であるフィールドでの中央滞在時間に有意な差は見られなかった。これらの結果から、ACC-PAG 経路の活性化は探索意欲増加に伴う運動量の増加を引き起こす可能性が示唆された。

本研究は ACC 神経細胞が脳内で多数の脳領域に対して投射を送り、特に PAG に対しては ACC 第 V, VI 層から背側に興奮性の投射を送ること、更に ACC-PAG 経路の活性化は運動量の増加を惹起することを明らかとした。ACC が投射を送る他の領域の一つに扁桃核基底外側核 (BLA) が挙げられる。本実験者は修士論文において ACC-BLA 経路の活性化は運動量の増加を惹起しないことを報告している。これらの結果は、2 つの神経投射が異なる情報を担っていることを示唆している。ACC は異なる多数の行動に関連することが報告されており、本研究は同一領域に存在する神経細胞が神経投射先により異なる情報を担うことを示す一つの知見を提供するものである。

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。