

博士学位論文

恐怖条件付け徐脈における小脳の役割  
Role of the cerebellum in fear-conditioned bradycardia

東京大学大学院総合文化研究科  
広域科学専攻 生命環境科学系

古田島 浩子

## 目次

第1章 序論 .....	8
1.1 諸言 .....	8
1.2 小脳と自律神経系 .....	10
1.3 小脳におけるシナプス可塑性 .....	11
1.4 小脳と恐怖条件付け徐脈 .....	14
1.5 下オリーブ核-登上線維 .....	15
1.6 $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体 .....	16
1.7 本研究の目的 .....	18
第2章 下オリーブ核破壊による恐怖条件付け徐脈への影響 .....	20
2.1 諸言 .....	20
2.2 実験方法 .....	23
2.2.1 実験動物 .....	23
2.2.2 3-acetylpyridine (3-AP)の投与 .....	23
2.2.3 回転棒課題 .....	23
2.2.4 心電図導出用電極埋め込み手術 .....	24
2.2.5 実験装置 .....	24
2.2.6 恐怖条件付け手順 .....	25
2.2.7 条件付け徐脈の評価 .....	29

2.2.8	痛覚応答テスト .....	29
2.2.9	下オリーブの組織化学的解析 .....	29
2.2.10	統計的解析 .....	30
<b>2.3</b>	<b>結果 .....</b>	<b>31</b>
2.3.1	3-AP 投与による下オリーブ核破壊の組織化学的解析結果 .....	31
2.3.2	下オリーブ核破壊による回転棒課題への影響 .....	33
2.3.3	実験環境に対する馴化 .....	34
2.3.4	音刺激に対する馴化 .....	35
2.3.5	条件付け .....	36
2.3.6	無条件刺激としての電気刺激に対する心拍応答 .....	37
2.3.7	痛み刺激に対する応答 .....	38
<b>2.4</b>	<b>考察 .....</b>	<b>39</b>
	<b>第 2 章の結論 .....</b>	<b>43</b>
	<b>第 3 章 <math>\delta 2</math> 型グルタミン酸受容体変異による恐怖条件付け徐脈への影響 .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>諸言 .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>実験方法 .....</b>	<b>47</b>
3.2.1	実験動物 .....	47
3.2.2	心電図導出用電極埋め込み手術 .....	47

3.2.3	実験装置 .....	48
3.2.4	恐怖条件付け手順 .....	49
3.2.5	条件付け徐脈の評価 .....	51
3.2.6	痛覚応答テスト .....	51
3.2.7	統計的解析 .....	51
<b>3.3</b>	<b>結果 .....</b>	<b>53</b>
3.3.1	実験環境に対する馴化 .....	53
3.3.2	音刺激に対する馴化 .....	54
3.3.3	条件付け CS-US phase 1 日目 .....	55
3.3.4	CS-US phase 5 日間における条件付け徐脈の応答率 .....	56
3.3.5	CS-US phase 5 日間における平均心拍数 .....	57
3.3.6	CS-US phase 5 日間における条件付け徐脈 .....	58
3.3.7	条件付け徐脈の消去 .....	60
3.3.8	無条件刺激としての電気刺激に対する心拍応答 .....	61
3.3.9	痛み刺激への応答 .....	62
<b>3.4</b>	<b>考察 .....</b>	<b>63</b>
	<b>第3章の結論 .....</b>	<b>67</b>
	<b>第4章 小脳皮質へのグルタミン酸受容体阻害薬注入による条件付け徐脈への影響</b>	<b>68</b>

<b>4.1 諸言</b> .....	68
<b>4.2 実験方法</b> .....	70
4.2.1 実験動物 .....	70
4.2.2 心電図導出用電極埋め込み手術 .....	70
4.2.3 実験装置 .....	71
4.2.4 恐怖条件付け手順 .....	72
4.2.5 条件付け徐脈の評価 .....	73
4.2.6 NBQX 注入 .....	73
4.2.7 NBQX 注入部位の組織化学的解析 .....	74
4.2.8 回転棒課題 .....	74
4.2.9 統計的解析 .....	75
<b>4.3 結果</b> .....	76
4.3.1 NBQX 注入による条件付け徐脈への影響 .....	76
4.3.2 NBQX 注入による条件付け徐脈発現率への影響 .....	78
4.3.3 NBQX 注入による回転棒課題への影響 .....	80
4.3.4 NBQX 注入による薬液拡散の組織化学的解析 .....	81
<b>4.4 考察</b> .....	82
<b>第4章の結論</b> .....	84

第5章 総合論議.....	85
5.1 条件付け徐脈における小脳皮質神経回路.....	86
5.1.1 恐怖条件付け徐脈において徐脈応答が生じるメカニズム.....	87
5.1.2 平行線維-プルキンエ細胞間シナプス.....	88
5.2 自律神経系制御に対する小脳以外の脳領域の関与について.....	91
5.3 本研究の展望.....	92
5.4 本研究の今後の研究課題.....	93
5.5 本博士論文の研究の結論.....	94
参考文献.....	95
謝辞.....	112

## 略語表

(アルファベット順)

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor

3-AP: 3-acetylpyridine

Cbln1: cerebellin1

CNQX: 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CS: conditioning stimulus

GABA:  $\gamma$ -aminobutyric acid

GluD2:  $\delta$ 2 glutamate receptor

GluR2: glutamate receptor 2

GRIP1: glutamate receptor interacting protein 1

GRIP2: glutamate receptor interacting protein 2

*hotfoot 15J: ho15J*

LIVBP: leucine/isoleucine/valine-binding protein

mGluR1: metabotropic glutamate receptor 1

NBQX: 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4- tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide

PICK1: protein kinase C alpha binding protein 1

PP2B: calcium/calmodulin-activated protein phosphatase 2B

SCA3: spinocerebellar ataxia 3

US: unconditioned stimulus

# 第1章 序論

## 1.1 諸言

自律神経は交感神経と副交感神経に分けられ、呼吸や循環、体温などの機能の調節を行っており、生体の内部環境を維持し、恒常性を保つ役割がある。またランニングをする、自転車をこぐなどの種々の運動場面において、交感神経の活動が亢進することで、心拍数の増加、血圧の上昇により末梢組織への血流量が増加し、骨格筋への血液供給を増やす。このため、交感神経活動の亢進は骨格筋が活動するためのエネルギー供給にも貢献している。

私たちの日常生活や運動場面における身体運動の制御は、多種多様な環境に加え、自身の心理状況や情動によっても大きな影響を受ける。例えば、大事なプレゼンテーションや緊迫した試合の場面においては、過度の緊張や不安、恐怖感から練習中に容易に行えた動作を練習時と同様に発揮できなくなることがある。緊張や不安、恐怖感を生じた際、私たちには精神性発汗や心拍数の増加などの自律神経系による生理的な応答が生じる。これらの応答は、自律神経系の応答が周囲の環境や種々のストレスに対する身体機能の恒常性の維持や骨格筋へのエネルギー供給に寄与する一方で、自身の心理状況や情動に応じて影響を受けることを示している。

外部環境や自身の心理状況、情動に対して心拍数や血圧の増加あるいは減少が引き起こされるが、それらの適応的な制御には中枢神経系が関与している。例えば、外部からの快・不快を惹起させるような刺激は、感覚器を介して視床、大脳新皮質を経て扁桃体に伝えられると、扁桃体から視床下部、延髄、脊髄を介して、交感神経活動を調節することで刺激に対する自律神経系の応答が生じる(Medina et al., 2002)。中枢神経系の中でも、これまで小脳は歩行や姿勢の制御、運動の学習において重要であることが詳細に調べられてきたが(Ito, 2001)、自律神経系の制御にも関与することが報告されている(Nisimaru, 2004)。自律神経系の制御において、小脳は解剖学的に視床下部と双方向性の

連絡を有し(Zhu et al., 2006)、脚傍核を介して交感神経系を調節する(Supple, 1994)、一つの迂回経路として位置づけられる。小脳は背側から観察すると正中は虫部、左右は小脳半球部(中間部、外側部)に分けられる(図 1-1)。小脳の表面には多数の横走する溝(小脳溝)があり、小脳溝の第一裂により前葉と後葉に分けられ、後外側裂により後方の片葉小節葉に分けられる。さらに、小脳は小脳溝により 10 葉(I ~ X)に分けられる。ウレタン麻酔下のウサギの小脳虫部第 III 葉の電気刺激により、腎交感神経系の活動が減少することや(Nisimaru et al., 1984)、 $\alpha$  クロラロース麻酔下で小脳虫部第 IX 葉に電気刺激を行うと、動脈圧の減少や、腎交感神経活動の一時的な抑制、大腿動脈のコンダクタンスの増加を示すことが報告されている(Bradley et al., 1987)。小脳の心拍数制御への関与は、条件刺激と無条件刺激を組み合わせ、繰り返し呈示することで条件付け応答を誘導する古典的条件付け学習をモデルにした恐怖条件付け徐脈を用いて調べられてきた。小脳虫部を破壊すると、条件付け徐脈の獲得及び発現が障害されることがラットやウサギを用いて報告され(Supple and Leaton, 1990, Supple and Kapp, 1993, Ghelarducci and Sebastiani, 1999)、同様の報告は細胞浮腫のため小脳虫部を除去した患者においても報告されている(Maschke et al., 2002)。これらの研究は、小脳が運動制御のみならず、恐怖条件付けにおける心拍数の応答にも関与することを示している。

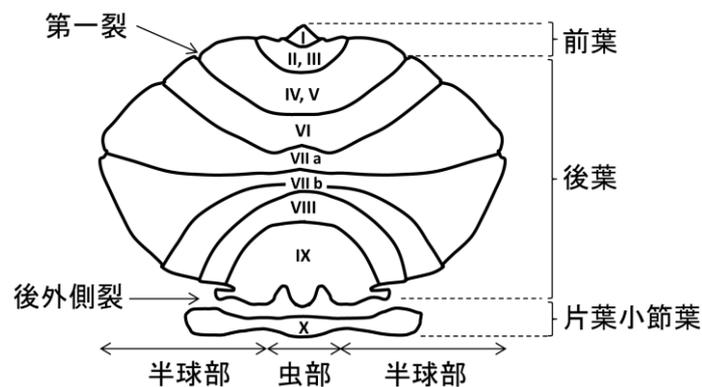


図 1-1 小脳の解剖図

このように、小脳は姿勢や歩行などの体性運動の制御系としても重要であるが、状況に依存した心拍数の調節に関与することも恐怖条件付け徐脈を用いて明らかにされてきた。これらの報告から、小脳は運動場面において、姿勢や歩行の制御に伴う骨格筋機能の調節と心理状況や情動に応じた心拍数などの循環機能の調節を機能的に連携し、統合的に調節を行うことで、多種多様な場面や状況に応じた適切なパフォーマンスを発揮するのに貢献しているのではないかと推測できる。しかしながら、これまでの条件付け徐脈課題を用いた心拍数の制御における小脳の関与について調べた研究は、小脳虫部の破壊や刺激実験のみに留まり、神経生理学的に十分に理解されているとは言い難い。多種多様な場面や状況に応じて心拍数が調節されることは、周囲の環境や状況に依存した適応的な機能であり、その機能に対する小脳の役割を調べることは生理学・医学のみならず、教育学、スポーツ科学においても重要である。

## 1.2 小脳と自律神経系

小脳の運動の制御や学習における役割が詳細に調べられてきた(Ito, 2001)。小脳の虫部は姿勢や歩行の制御に重要であることが示されている(Yanagihara, 2010)。一方で小脳の虫部は、運動の制御や学習における役割のみならず、心循環系、腎臓などの内臓への自律神経系の調節にも関与することが報告されてきた(Nisimaru, 2004)。刺激実験や破壊実験を用いて、小脳虫部が血圧や心拍数の調節に関与することが報告されている。ウレタン麻酔下のウサギにおいては、小脳虫部前葉に電気刺激を行うと刺激の強さに応じて、腎性の交感神経活動が減少することが報告されている(Nisimaru et al., 1984)。 $\alpha$  クロラロース麻酔下のネコにおいて、小脳虫部後葉の刺激を行うと血圧、心拍数の減少が見られること、一方無麻酔では血圧、心拍数の増加が見られることが報告されている(Bradley et al., 1987)。無麻酔のウサギにおいても小脳虫部後葉の刺激は、前肢の筋電図における筋活動の増加と共に、血圧の上昇も生じることが報告されている(Bradley et al., 1990)。また光活性化チャンネルであるチャンネルロドプシン 2 をラットの小脳のプルキン

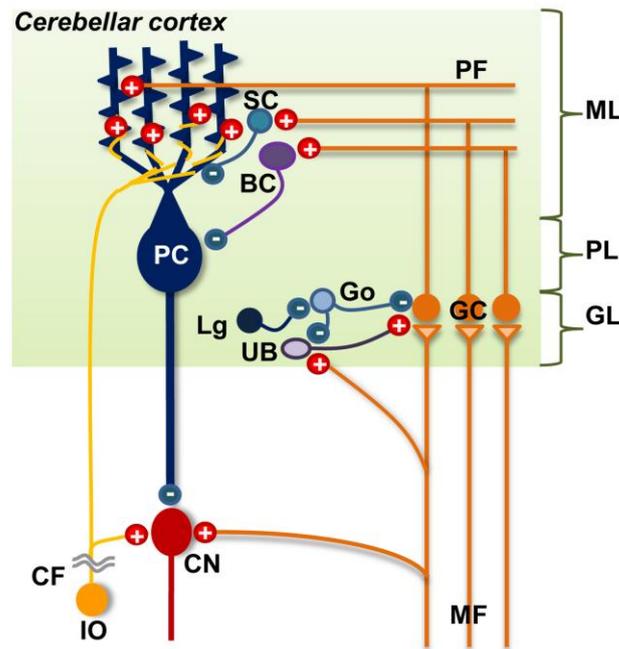
エ細胞特異的に強制発現させ 593nm のオレンジ波長にてプルキンエ細胞の活動を抑制する操作を行うと、姿勢変化に伴う血圧の変化が減弱することが報告されている (Tsubota et al., 2012)。これらの研究は小脳虫部が自律神経系の応答の調節に関与することを示している。

視床下部背内側核や視床下部後核は小脳の室頂核と双方向性に線維連絡があることがラットにおいて報告されている (Cavdar et al., 2001, Zhu et al., 2006)。またウサギの視床下部に電気刺激を行うと、小脳前葉の虫部のプルキンエ細胞における自発的な発火活動が修飾される (Supple et al., 1993)。逆行性トレーサーを用いた研究より、小脳虫部が投射する室頂核は脚傍核に線維連絡があることが示されている (Supple et al., 1994)。脚傍核はさらに吻側延髄腹外側部、交感神経の節前線維が存在する脊髄の中間質外側核に投射する。これらの研究より、虫部の小脳皮質プルキンエ細胞－室頂核－脚傍核の神経回路が交感神経の調節に関与するであろうと提案されている (Nisimaru, 2004)。小脳疾患として、脊髄小脳変性症 3 型、spinocerebellar ataxia 3 (SCA3) の患者を 5 分間台の上で仰臥位にさせ安静時の心拍数を測定すると、健常群と同様の値の心拍数を示すが、台を 60° に傾け 10 分間心拍数を測定すると、健常群と比べて SCA3 の患者群の心拍数が顕著に高くなることが報告されている (Koyama et al., 2009)。このことから小脳に障害を有する患者においては、姿勢変化に伴う自律神経系の調節が障害されていることが示唆されている。

### 1.3 小脳におけるシナプス可塑性

小脳皮質は 3 層構造であり、表層から分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層で構成されている。主な神経細胞は、プルキンエ細胞、顆粒細胞、ゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞、ルガロ細胞、ユニポーラブラッシュ細胞である (図 1-2)。小脳皮質におけるプルキンエ細胞は  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) を伝達物質とした抑制性の小脳唯一の出力細胞であり、小脳深部核 (正中から室頂核、中位核 (球状核、栓状核)、歯状

核)に投射している。小脳皮質プルキンエ細胞への求心性線維は 2 種類ある。一つは、脊髄、脳幹、橋核からの軸索を含む苔状線維が顆粒細胞に興奮性シナプス結合し、その顆粒細胞の軸索が分子層において T 字型に分岐した平行線維である。もう一つは延髄に局在し、脊髄・大脳皮質・赤核から入力を受ける下オリーブ核を起始核とした登上線維である。



BC: basket cell バスケット細胞, CF: climbing fiber 登上線維, CN: cerebellar nuclei 小脳核, GC: granule cell 顆粒細胞, GL: granule cell layer 顆粒細胞層, Go: Golgi cell ゴルジ細胞, IO: inferior olive nuclei 下オリーブ核, Lg: Lugaro cell ルガロ細胞, MF: mossy fiber 苔状線維, ML: molecule layer 分子層, PC: Purkinje cell プルキンエ細胞, PF: parallel fiber 平行線維, PL: Purkinje cell layer プルキンエ細胞層, SC: stellate cell 星状細胞, UB: unipolar blush cell ユニポーラブラッシュ細胞

図 1-2 小脳皮質神経回路

プルキンエ細胞は、平行線維と登上線維から興奮性を入力を受けている (Ito, 2001)。この二つの線維を同時頻回刺激すると平行線維からプルキンエ細胞への入力 が長期間低下する現象が起こる (Ito and Kano, 1982, Ekerot and Kano, 1985, Sakurai, 1987)。これは長期抑圧と呼ばれ、小脳のシナプス可塑性の一つであり、細胞レベルでの学習の

基礎過程と考えられている(Ito, 1989)。この長期抑圧の発現は、平行線維—プルキンエ細胞間に存在するAMPA型グルタミン酸受容体 ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor: AMPAR) が寄与している。AMPARのサブタイプである glutamate receptor 2(GluR2)のセリン残基 880番目がリン酸化され、シナプス後膜における glutamate receptor interacting protein1(GRIP1)、glutamate receptor interacting protein2(GRIP2)と離れ、protein kinase C alpha binding protein1(PICK1)が結合することで小胞内に取り込まれると、細胞膜表面におけるAMPARの数が減少することが知られている(Matsuda et al., 2000, Hirai, 2001)。また平行線維の頻回刺激により、平行線維—プルキンエ細胞間には長期増強が生じることも報告されている(Crepel and Jaillard, 1991, Lev-Ram et al., 2002)。平行線維—プルキンエ細胞間における長期抑圧、長期増強は相反性の関係にあり、その相反性は登上線維からプルキンエ細胞への  $Ca^{2+}$ の流入量に依存していることが報告されている(Coesmans et al., 2004)。

瞬目条件付け学習は小脳が担う連合学習のモデルの一つである(Freeman and Steinmetz, 2011)。この学習においては、音・光などを条件刺激として、眼球へ空気を吹きかけるエア・パフ(加圧空気)刺激や瞼への電気刺激を無条件刺激として用いて、条件刺激に対する瞬目応答を学習する。ウサギの小脳皮質の中間部を、6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)を用いて可逆的に不活化を行うと、瞬目条件付け学習における条件付け瞬目応答の獲得が一時的に阻害されることが示されている(Atwell et al., 2001)。瞬目条件付け学習においては、平行線維が音刺激、また登上線維が無条件刺激を小脳へ伝送することが示唆されている(Thompson and Steinmetz, 2009)。また代謝型グルタミン酸受容体1型(metabotropic glutamate receptor 1: mGluR1)ノックアウトマウスにおいては、長期抑圧が障害され、条件付け瞬目応答の獲得が障害されることが報告されている(Aiba et al., 1994)。さらに calcium/calmodulin-activated protein phosphatase 2B(PP2B)ノックアウトマウスは、プルキンエ細胞における長期増強が障害され、条件付け瞬目応答の獲得が障害されていることが示されている(Schonewille et al., 2010)。これ

らの研究から、小脳の平行線維—プルキンエ細胞間におけるシナプス可塑性が瞬目条件付け学習において重要なことが示されてきた。

#### 1.4 小脳と恐怖条件付け徐脈

自律神経系の反応である心拍数の増減は、無害な条件刺激(音、光など)と痛みを伴う侵害な無条件刺激を、時間的に組み合わせることで古典的条件付け応答として引き起こされ、恐怖条件付け徐脈として発現される。この条件付け学習においては、音や光などを条件刺激として、また痛みを伴う電気刺激などを無条件刺激として用い、さらに動物は学習中逃避できないように体を固定ホルダーにて拘束される。条件刺激と無条件刺激を時間的に組み合わせ、動物に繰り返し呈示すると、条件刺激に対する心拍数の漸進的な減少、すなわち恐怖条件付け徐脈が生じる。

小脳の虫部、あるいは半球部を破壊して恐怖条件付け徐脈への影響を調べると、虫部を破壊した際のみ、平均心拍数に影響することなく、条件付け徐脈の獲得及び発現が障害された(Supple et al., 1990)。さらに、小脳虫部の前葉を破壊すると平均心拍数や条件刺激、無条件刺激に対する心拍応答には影響することなく、恐怖条件付け徐脈の獲得及び発現が障害され、条件付け徐脈を獲得後に小脳虫部前葉を破壊すると、条件付け徐脈の保持が障害された(Supple et al., 1993)。小脳虫部の傷害が、平均心拍数や条件刺激、無条件刺激に対する心拍応答に影響することなく、条件付け徐脈のみに影響するということは、小脳は通常的心拍応答には関与しないが、状況に依存した条件付け学習の心拍応答に関与する、ということを示唆している。また生後4日目のウサギの小脳虫部を破壊し、成熟後に恐怖条件付け徐脈を調べると、正常無処置群のウサギの条件付け徐脈よりも、条件付け徐脈の亢進が生じた(Ghelarducci and Sebastiani, 1999)。小脳虫部のプルキンエ細胞は室頂核に投射しているが、室頂核の刺激も自律神経の応答や情動を誘発することが報告されている(Nisimaru, 2004, Achari and Downman, 1970)。金魚においても、小脳虫部に相当する小脳体部の破壊実験や、小脳体部へのリドカイン注入によるナトリウ

ムチャンネルの阻害により、恐怖条件付け徐脈が減弱する(Yoshida et al, 2004, Yoshida and Hirano, 2010)。条件付け徐脈の障害は、細胞浮腫のため小脳虫部を除去した患者においても示されている (Maschke et al., 2002)。また恐怖条件付け徐脈の際に小脳虫部プルキンエ細胞は条件刺激としての音刺激に対して短潜時の持続的な発火活動を示す(Supple et al., 1993)。これらの破壊や刺激実験を用いた先行研究から小脳虫部が恐怖条件付け徐脈に関与することが明らかにされてきた。

### 1.5 下オリーブ核—登上線維

延髄の下オリーブ核は小脳のプルキンエ細胞に興奮性の入力を送る登上線維の起始核である。主に脊髄からの入力を受け、小脳深部核にも興奮性の入力を送っている。登上線維は未成熟時において、プルキンエ細胞に対して多重支配を形成しているが (Crepel, 1982)、生後 3 週以降では単一支配となることが示されている (Offermanns et al., 1997)。単一支配になるまでの過程では、活動依存的に最も強いシナプスが残り、あとの未成熟なものは淘汰されることが示されている (Hashimoto et al., 2009)。下オリーブ核—登上線維からのプルキンエ細胞への興奮性の入力は、プルキンエ細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こし、強力な脱分極を起こすことが知られている (Sakurai, 1990)。カルシウムキレート剤をプルキンエ細胞に注入することによりプルキンエ細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇を阻害すると、平行線維—プルキンエ細胞間の長期抑圧が障害されることが報告されている (Konnerth et al., 1992, Lev-Ram et al., 2002)。このことから、長期抑圧における登上線維からプルキンエ細胞への入力の役割は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増大であると考えられている。

登上線維から小脳皮質プルキンエ細胞への入力は運動の制御、学習に重要であり、誤差信号を伝送することが示唆されている (Ito, 2013)。ラットの下オリーブ核を 3-acetylpyridine(3-AP)を用いて選択的に破壊し回転棒課題(回転する棒上を歩く課題)を行うと、回転棒から落下するまでの時間が正常ラットに比べて短くなることが示されて

いる(Rondi-Reig et al.,1997)。また前庭動眼反射の適応においても下オリブ核を電気凝固法により選択的に破壊すると、適応に障害が起こることが報告されている(Ito and Miyashita, 1975)。瞬目条件付け学習においては、可逆的な下オリブ核の不活性化は条件付け瞬目応答の発現に障害を起こすことが示されている(Zbraska et al., 2012)。無条件刺激は、登上線維が伝送することが示唆されているが(Thompson and Steinmetz, 2009)、音刺激と下オリブ核の刺激を組み合わせたと、ウサギにおいて瞬目条件付け学習における条件付け瞬目応答の獲得が生じることが報告されている(Mauk et al., 1986)。これらの研究から、下オリブ核－登上線維からプルキンエ細胞への興奮性の入力、回転棒課題による運動学習や前庭動眼反射の適応、瞬目条件付け学習の獲得及び発現に必要なことが示されてきた。

## 1.6 $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体

小脳の平行線維－プルキンエ細胞間には、AMPA、mGluR1、 $\delta 2$  型グルタミン酸受容体( $\delta 2$  glutamate receptor: GluD2)が存在する。AMPA や mGluR1 は小脳以外にも広く分布する。mGluR1 ノックアウトマウスにおいては、登上線維のプルキンエ細胞への多重支配や(Kano et al., 1997)、平行線維－プルキンエ細胞間の長期抑圧の障害や歩行失調を呈することが報告されているが(Aiba et al., 1994)、小脳への影響のみならず海馬における長期増強の減弱も報告されている(Conquet et al., 1994)。一方で、GluD2 は小脳のプルキンエ細胞に選択的に発現し(Araki et al., 1993)、なおかつ平行線維－プルキンエ細胞間シナプスに局在し、登上線維－プルキンエ細胞間には存在しないという特徴を持つ(Takayama et al., 1996)。GluD2 を培養細胞に単独発現させてもチャネル活性を示さないことから受容体としての機能を有するのかが明らかになっていなかった(Lomeri et al., 1993)。しかし、GluD2 ノックアウトマウスはプルキンエ細胞の形態に異常は示さないが、平行線維－プルキンエ細胞間のシナプスの減少を示し、登上線維のプルキンエ細胞への多重支配、平行線維－プルキンエ細胞間の長期抑圧の障害、運動学習障害、歩

行失調を呈することが報告されている(Kashiwabushi et al., 1995, Kurihara et al., 1997, Ichikawa et al., 2002, Kishimoto et al., 2001)。このため、小脳の平行線維-プルキンエ細胞間に選択的に発現する GluD2 は小脳におけるシナプスの形成、維持、平行線維-プルキンエ細胞間における長期抑圧の発現や運動学習に関与し、小脳の機能に重要なことが考えられた。長らく明らかにされていなかった GluD2 のリガンドは顆粒細胞から分泌される C1q ファミリーのうちの一つであるセレベリン 1 (Cerebellin1: Cbln1)であることが近年報告されてきた(Matsuda et al., 2010)。また Cbln1 は GluD2 と結合すると、プレシナプスの neurexin とも結合し、平行線維-プルキンエ細胞間におけるシナプスの形成を行うことが示された(Ito-Ishida et al., 2012)。GluD2 ノックアウトマウスが平行線維-プルキンエ細胞間における長期抑圧の障害を示すことから、この長期抑圧の障害がシナプスの未成熟(平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの減少、登上線維によるプルキンエ細胞への多重支配)に依存するのか、GluD2 自体が長期抑圧のシグナルに関与するのかは明らかではなかった。このため、成熟した正常な神経回路を形成した小脳の切片のプルキンエ細胞に、GluD2 の阻害抗体を添加すると、平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧を誘導する電気刺激を与えても、長期抑圧が生じなかった(Hirai et al., 2003)。さらに、未成熟なラットあるいはマウスから培養した小脳のプルキンエ細胞に GluD2 の阻害抗体を添加し、シナプス後膜における AMPAR の数を調べると、阻害抗体を添加しないプルキンエ細胞と比較して、約 25% の AMPAR が細胞内に取り込まれていた(Hirai et al., 2003)。これらのことから、GluD2 はシナプス後膜における AMPAR の数の調節をすることで、長期抑圧のシグナルカスケードに関与することが示された。また Kohda らは GluD2 が AMPAR のサブユニット GluR2 のセリンとチロシン残基のリン酸化を調整することで長期抑圧の誘導に関与することを報告している(Kohda et al., 2013)。これらの研究から、GluD2 は平行線維-プルキンエ間におけるシナプスの形成、維持、また長期抑圧の発現に重要なことが示されてきた。

GluD2 の自然発生変異を有する *hotfoot* マウスは、平行線維とプルキンエ細胞間のシナプスの数の減少、登上線維のプルキンエ細胞への多重支配の残存、長期抑圧の欠損を示し、主な表現型として歩行失調を呈することが示されている (Yuzaki, 2004)。この *hotfoot* マウスは GluD2 の N 末の leucine/isoleucine/valine-binding protein (LIVBP) 類似領域のアミノ酸欠損を示すため、GluD2 がプルキンエ細胞の細胞体に留まり、膜表面に輸送されないという変異を示す (Matsuda and Yuzaki, 2002, Wang et al., 2003)。最近の臨床報告から、小脳性の歩行失調や眼球運動の異常性と発育発達の遅延を示す患者のゲノム解析より GluD2 をコードする *GRID2* 遺伝子において、LIVBP 類似領域をコードする exon のうち exon 2 における欠損が見つかったことが報告されている (Hills et al., 2013)。この患者らと同様に exon 2 の欠損を示すのが *hotfoot 15J (ho15J)* マウスである。この *ho15J* マウスにおいても、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスの減少や登上線維の多重支配の残存、長期抑圧の障害、歩行失調を示すことが報告されている (Motohashi et al., 2007, Takeuchi et al., 2012)。

## 1.7 本研究の目的

小脳は運動の制御や学習のみならず自律神経系の活動調節にも関与することが示されてきた。自律神経系の中でも心拍数の制御に関しては、恐怖条件付け徐脈を用いて条件付け徐脈を指標に調べられてきた。しかし現在まで、これらの研究は小脳の破壊や刺激実験に留まり、恐怖条件付け徐脈における小脳皮質神経回路の役割を調べたものはない。小脳皮質からの唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は平行線維と登上線維から興奮性の入力を受けており、平行線維-プルキンエ細胞間におけるシナプス可塑性は学習に関与することが示されている。そこで、恐怖条件付け徐脈における小脳皮質神経回路の役割を調べるため、登上線維の起始核である下オリーブ核と小脳の平行線維-プルキンエ細胞間に選択的に発現する GluD2 に着目した。

本研究は以下の 3 章から構成されている。

第2章においては、恐怖条件付け徐脈における下オリーブ核-登上線維から小脳への入力役割を調べることを目的とした。このため、マウスの下オリーブ核を薬理的に破壊し、条件付け徐脈への影響を調べた。

第3章においては、小脳の平行線維-プルキンエ細胞間に選択的に発現し、平行線維-プルキンエ細胞間、登上線維-プルキンエ細胞間のシナプス形成や維持、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス可塑性の発現に関与すると考えられる **GluD2** の変異の影響を調べることを目的とした。このため、**GluD2** の自然発生変異を有する *ho15J* マウスを用いて恐怖条件付け徐脈への影響を調べた。

第4章においては、恐怖条件付け徐脈において、小脳皮質の興奮性シナプス伝達を可逆的に阻害することで、*ho15J* マウスにおいて生じた条件付け徐脈に、小脳皮質における興奮性シナプス伝達が寄与しているのかどうかを調べることを目的とした。このため、**wild-type** マウスと *ho15J* マウスの小脳皮質に **AMPA**R の阻害薬を注入し、条件付け徐脈への影響を調べた。

## 第2章 下オリブ核破壊による恐怖条件付け徐脈への影響

### 2.1 諸言

下オリブ核は延髄に位置し、その軸索である登上線維により、小脳皮質のプルキンエ細胞と小脳核へ興奮性シナプス伝達を行っている(Ito, 2001)。下オリブ核は解剖学的に内側副オリブ核、背側副オリブ核、主オリブ核に区分される。各オリブ核の投射先は主に次のように分けられる。内側副オリブ核(吻側部)と背側副オリブ核(背側部)は虫部へ、背側副オリブ核(腹側部)と内側副オリブ核(尾側部)は中間部へ、主オリブ核は外側部へそれぞれ興奮性のシナプス入力を送る(Cerminara and Apps, 2011)。下オリブ核から登上線維を介したプルキンエ細胞への入力は運動の制御や学習に重要であるということが報告されてきた。例えば、ラットにおいて3-APを腹腔内投与し、下オリブ核ニューロンを選択的に傷害すると、回転棒課題において棒上を歩く時間がコントロール群に比べて減少することが報告されている(Rondi-Reig et al., 1997)。またウサギの下オリブ核を、電気凝固法を用いて破壊すると、前庭動眼反射の適応が障害されることが報告されている(Ito and Miyashita, 1975)。プルキンエ細胞における細胞外記録より、登上線維からの小脳への入力は complex spike(複雑スパイク)として、また平行線維からの入力は simple spike(単純スパイク)として記録される。下オリブ核を冷却し、小脳への登上線維を介した入力を阻害すると、プルキンエ細胞における simple spike の活動が増加することが示されている(Montarolo et al., 1982)。平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいて、長期抑圧と長期増強が生じることが報告されているが(Sakurai, 1987, Hirano, 1990)、登上線維からの入力は長期抑圧と長期増強の発現に重要な役割を持つことが調べられている。長期抑圧が生じるには、プルキンエ細胞内へ電位依存性カルシウムチャネルを介した  $Ca^{2+}$  の流入が必要であるが、この電位依存性カルシウムチャネルの活性は登上線維活動によって引き起こされる(Sakurai, 1990)。さら

に、平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧の誘導には、長期増強の誘導より、高い  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度が必要であり、登上線維入力によって生じたプルキンエ細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は平行線維-プルキンエ細胞間における長期抑圧と長期増強の誘導を調節していることが報告されている(Coesmans et al., 2004)。これらの研究から、下オリーブ核を起始核とした登上線維の小脳への入力は、平行線維-プルキンエ細胞間におけるシナプス可塑性の発現やプルキンエ細胞における simple spike の活動パターンを調節していることが考えられる。

瞬目条件付け学習は、小脳に依存した運動学習モデルの一つである(Freeman and Steinmetz, 2011)。平行線維-プルキンエ細胞間における長期抑圧が障害されている mGluR1 ノックアウトマウスにおいては、条件付け瞬目応答の獲得が野生型マウスに比べて減弱されていることが報告されている(Aiba et al., 1994)。また近年では、プルキンエ細胞における長期増強が欠損している PP2B ノックアウトマウスにおいても条件付け瞬目応答の獲得や前庭動眼反射の適応が障害されていることが報告されている(Schonewille et al., 2010)。瞬目条件付け学習においては、条件刺激(音、光など)は苔状線維が小脳核と、小脳皮質顆粒細胞及び平行線維を介してプルキンエ細胞へと伝送し、また無条件刺激(エア・パフや電気刺激など)は登上線維が伝送することが考えられている(Thompson and Steinmetz, 2009)。音刺激と背側副オリーブ核の電気刺激を組み合わせると、条件付け瞬目応答の獲得が起こることが報告されている(Mauk et al., 1986)。ウサギにおいて、下オリーブ核にリドカインを投与することにより、ナトリウムチャンネルを阻害し不活化すると、自発的な瞬目応答自体は障害されないが、条件付け瞬目応答の発現あるいは獲得は障害されることが示されている(Welsh and Harvey, 1998)。また背側副オリーブ核の AMPAR をグルタミン酸受容体阻害薬である、2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione(NBQX)を用いて阻害すると、背側副オリーブ核から小脳への無条件刺激の伝送が障害され、条件付け瞬目応答の発現が障害されたことが

報告されている(Zbarska et al., 2007)。これらの先行研究は、下オリーブ核の小脳への入力は条件付け瞬目応答の発現や獲得に必要であることを示している。

ところで、恐怖条件付け徐脈においては、下オリーブ核から登上線維を介した小脳への入力の役割は調べられていない。先行研究における瞬目条件付け学習における下オリーブ核から小脳への入力の阻害の影響を考えると、恐怖条件付け徐脈においても、下オリーブ核の入力が障害されれば、条件付け徐脈の発現や獲得に影響するのであろうと推測した。そこで、3-AP を用いてマウスの下オリーブ核を選択的に破壊し、恐怖条件付け徐脈における下オリーブ核から登上線維を介した小脳への入力の役割について調べた。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 実験動物

本実験は東京大学動物実験倫理委員会によって承認され、東京大学動物実験実施マニュアルおよびNIH(National Institutes of Health)動物実験ガイドラインに従って行った。実験動物の使用数は必要最小限にとどめ、実験中は動物へのストレスや痛みが最小限になるように努めた。

実験に用いたC57BL/6Jは日本クレア (Tokyo, Japan)より購入した。マウスはシングルケージにて飼育し、餌と水は24時間自由に摂取できるようにした。明暗サイクルは12時間(明期8-20時、暗期20-8時)に設定した。

### 2.2.2 3-acetylpyridine (3-AP)の投与

下オリーブ核破壊のために、Rondi-Reig (1997)らの研究における3-AP投与のプロトコルを参考に、マウスに3-AP (Wako, Osaka, Japan)を50 mg/kg腹腔内投与し(n=8)、3-3.5時間後にnicotinamide (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を腹腔内投与し(500 mg/kg)、3-APの下オリーブ核以外への細胞毒性を阻害した。controlマウスにはsaline (0.1 ml)を腹腔内投与した(n=8)。各群のマウス8匹中、3匹は破壊の状態を組織化学的に解析し、5匹は恐怖条件付け徐脈課題を行った。

### 2.2.3 回転棒課題

3-APとnicotinamideを投与した1週間後に回転棒課題を行い、下オリーブ核ニューロン破壊の影響を回転棒課題において確認した。マウスを着地面から180 mm上方の回転する棒の上を歩かせ、棒から落下するまでの滞在時間を測定した。回転速度は8 rpm

で、カットオフタイムを 120 秒に設定し、10 試行を行った。回転棒課題を行う前に、静止した状態の棒に 120 秒間乗せ、回転棒課題の装置に馴化させた。これを static rod という。

#### 2.2.4 心電図導出用電極埋め込み手術

マウスの心拍数を記録するために、心電図導出用の電極を作成し、外科的な手術を行い経日的に心拍数を記録できるよう、マウスの皮下に埋め込んだ。マウスを Isoflurane (Abbott Japan, Tokyo, Japan) で吸入麻酔し(導入時: 0.3 %, 維持時: 0.15 %)、脳定位固定装置 (Narishige, Tokyo, Japan) に設置した。マウスの頭頂部正中の頭皮を切開し、頭蓋を露出し、アース用ボルト電極を固定した。さらに心電図導出としてシリコンで被膜されたステンレススチールワイヤを胸部の皮下に留置した。心電図導出用の電極と頭蓋の接着部位を歯科用セメントで固定し、切開した頭皮を縫合、接着した。術後回復のため、脱水に注意しながらマウスの体温を維持した。マウスの術後の回復期間として 2-3 日を設けた。

#### 2.2.5 実験装置

##### マウスの保定

実験は、防音遮光室 (196 × 84 × 86.5 cm; 高さ×縦×横) 内に 2 段組のラックを設置し、同時に 2 匹ずつ実験を行うことができるように設定した。マウスはアクリル製のホルダー内に拘束された。

##### 刺激装置

音刺激と電気刺激を時間的に組み合わせた刺激パラダイム作成のためにパルス発生器 (Master 8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel)にてプログラムを作成した。音刺激はパルス発生器からの 5 秒間の矩形波パルス出力をマルチシンセサイザ(1941-Wave-Factory, NF Corporation, Yokohama, Japan) により 2.5 kHz のサイン波に変換後、パワーアンプ (SRP-P150, SONY, Tokyo, Japan) で増幅し、スピーカーを通してマウスに呈示した。マウスに呈示する音刺激の大きさは騒音計 (SL-1250, CUSTOM, Ibaraki, Japan)を用いて、80 dB に調節した。尾部への電気刺激は電気刺激装置 (SEN-2201, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)にて 50 Hz、0.5 秒間、0.3 mA に設定し、マウスの尾部への刺激電極に接続した。

#### 心拍記録装置

マウスに埋め込んだ心電図導出用電極からの出力は入力ボックスを介して、電気生理学用実験アンプ(MEG-2100, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) で増幅した。アンプからの出力を 2 つに分け、一方をオシロスコープ (VC-6725, Hitachi, Tokyo, Japan) に入力してモニターし、もう一方は AD 変換ボード (MacLab 8s, AD Instruments, Dunedin, New Zealand) によって、サンプリング周波数 1kHz で試行ごとにコンピュータのハードディスクへ記録した。心電図の解析にはソフトウェア (LabChart software v.3.6.1/s AD Instruments, Dunedin, New Zealand) を用いた。

#### 2.2.6 恐怖条件付け手順

本研究における恐怖条件付け徐脈において、条件刺激 (conditioning stimulus: CS) として 2.5 kHz、80 dB、5 秒間の音刺激を用いた。また無条件刺激 (unconditioned stimulus: US) として 50 Hz、0.3 mA、0.5 秒間の尾部への電気刺激を用いた。恐怖条件付けの手

順は、① Habituation phase、② CS-alone phase、③ CS-US phase、④ US-alone phase の順に実施した。各 phase は 1 日から 2 日のインターバルで行った(図 2-1)。

#### ① Habituation phase

恐怖条件付け手順の最初の 2 日間は、防音遮光室内におけるアクリル製のホルダーによる拘束、尾部への電気刺激用電極装着という環境に馴化させるために Habituation phase を行った。この phase においては CS や US はマウスに対して呈示しなかった。Habituation phase においては、心拍の記録は 90 秒毎に 10 秒間の記録を 50 回行い、その平均心拍数を安静時の心拍とした。

#### ② CS-alone phase

マウスを音刺激に馴化させるために、アクリル製のホルダーに拘束し、心拍数が安定した後 (2 分ごとに計 5 回心拍数を記録し、心拍数の変動が  $\pm 100$  bpm 以内の場合には安定とした)、1 日 50 試行を行った。試行間のインターバルは 180 秒で、この phase は 2 日間行った。

#### ③ CS-US phase

マウスが実験環境と音刺激に馴化した後、CS-US phase を行った。マウスをアクリル製のホルダー内に拘束し、心拍数が安定した後 (2 分ごとに計 5 回心拍数を記録し、心拍数の変動が  $\pm 100$  bpm 以内の場合には安定とした)、1 日 50 試行を行った。試行間のインターバルは 180 秒で、この phase は 3 日間行った。

#### ④ US-alone phase

無条件刺激として用いた電気刺激に対するマウスの心拍応答を調べるために、心拍数が安定した後 (2分ごとに計5回心拍数を記録し、心拍数の変動が±100 bpm 以内の場合には安定とした)、1日20試行を行った。試行間のインターバルは180秒で、このphaseは1日のみ行った。

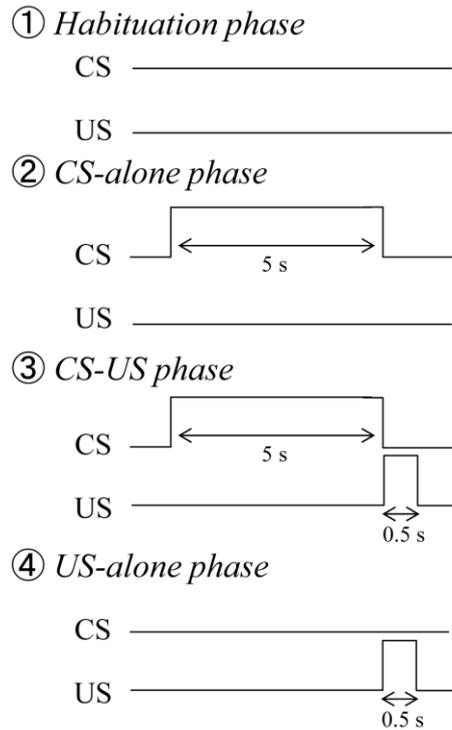
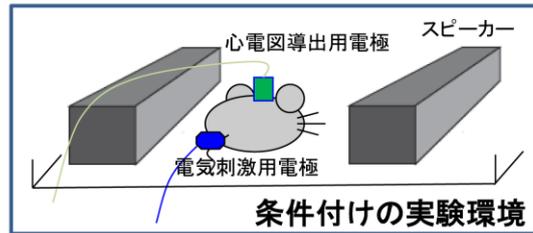


図 2-1 条件付けの実験環境と条件付け手順

条件付け実験環境におけるマウスの様子と条件付け手順を示した。マウスに心電図導出用電極を埋めこみ、尾部に電気刺激用電極をつけ、アクリル製のホルダーにて固定にした状態でスピーカーの間に設置した。各 phase における CS と US の時間的なパラダイムを以下に示す。①の **Habituation phase** においては、CS、US は呈示されない。②の **CS-alone phase** においては、5 秒間の CS みが呈示される。③の **CS-US phase** においては、5 秒間の CS の直後に 0.5 秒間の US が呈示される。④の **US-alone phase** においては、US のみが呈示される。

CS: conditioning stimulus, US: unconditioned stimulus

### 2.2.7 条件付け徐脈の評価

マウスの心拍数は記録した心電図の連続した R 波を指標として、R-R 間隔を beats/min に換算した。CS に対する心拍数の変化は、CS 呈示直前の 1 秒間の心拍数(pre-CS baseline)と、CS 5 秒間を 1 秒間ずつに区分し、pre-CS baseline からの変化として評価した。US 呈示後の心拍数変化は、US 呈示の開始から 1 秒後の 6 秒間を 1 秒ずつに区分し、それぞれの区間の心拍数と pre-US baseline からの変化として評価した。US 呈示後 1 秒間以降を評価した理由は、US 呈示直後の 1 秒間は心電図に筋電図活動が混入するため R 波の検出が不可能なためである。

### 2.2.8 痛覚応答テスト

本研究における恐怖条件付けでは無条件刺激として尾部への電気刺激を用いているが、尾部への痛覚刺激に対する応答を確かめるために tail-flick test を行った。このテストにおいては、マウスの尾部に 2 種類の輻射熱 (80 °C、110 °C) を与え、尾を振るまでの潜時を測定した。

### 2.2.9 下オリーブの組織化学的解析

全ての実験終了後にマウスを urethane にて深麻酔し、最初に血液凝固防止剤を含んだ saline、次いで formalin 液(4 % paraformaldehyde in 0.1M Phosphate Buffer, pH 7.4)を用いて心臓経由で還流固定した。頭蓋より取り出した脳組織は、4 % paraformaldehyde in 0.1M Phosphate Buffer にて 24 時間後固定した。その後、5 % sucrose に置換し 1 週間浸漬させ、次に 10 % sucrose に 1 週間、最後に 20% sucrose に 1 週間浸漬した。回転式ミクロトーム(HM 355S, Thermo, Yokohama, Japan)にて脳組織を前額断の 4 $\mu$ m の厚さで薄

切し、切片をスライドガラスに張り付けた。切片を蒸留水で水洗し、Nissl 染色液(0.1 % cresyl violet)にて 10 -30 分間染色し、水洗後、低濃度から高濃度のエタノール(50% → 70% → 80% → 90% → 100% → 100%)へと浸けていき、アルコール脱水を行った。その後、キシレンにて透徹し、封入剤にて封入した。光学顕微鏡(BZ-9000, KEYENCE, Osaka, Japan)を用いて切片画像を取り込み、正中線を中心に、延髄下オリブ核群を 1 × 1 cm のマス目を 16 区画作成し、各区画の生存細胞を計数した。また虫部、中間部、外側半球部からの投射先による下オリブ核の部位ごと(内側副オリブ核、背側副オリブ核、主オリブ核)のカウントは Paxinos and Franklin (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition)に従って各部位を特定し、生存細胞数を計数した。計数の際には、核や核小体があるものを生存細胞とした。

#### 2.2.10 統計的解析

各項目の解析結果は平均値±標準誤差(SEM)で示した。統計処理には統計解析ソフトウェア SPSS version 16.0(SPSS Japan. Inc., Tokyo, Japan)を用いた。解析によって求められた平均値の差は、Levene 検定において等分散性が認められた場合は Student-*t* 検定を、等分散性が認められなかった場合は Welch 検定を行った(図 2-3, 2-4, 2-6)。マウス要因×試行要因を独立変数とする繰り返しのない 2 要因の分散分析を行い、Bonferroni post hoc test を行った(図 2-5)。マウス要因×時間要因を独立変数とする繰り返しのない 2 要因の分散分析を行い、Bonferroni post hoc test を行った(図 2-7, 2-8, 2-9)。マウス要因×温度要因を独立変数とする繰り返しのない 2 要因の分散分析を行い、Bonferroni post hoc test を行った(図 2-10)。有意水準は 5%未満とした。

## 2.3 結果

### 2.3.1 3-AP 投与による下オリーブ核破壊の組織化学的解析結果

Nissl 染色後の組織標本にて、下オリーブ核の生存細胞の計数を行った(図 2-2,2-3,2-4)。下オリーブ核を破壊されたマウス(以下 IO マウスとする)における下オリーブ核の生存細胞数は、control マウスに比べて、有意に減少していた (control;  $2082 \pm 59$ , IO;  $1281 \pm 81$ ,  $t(5) = 8.197$ ,  $p < 0.001$ ; 図 2-3)。下オリーブ核を背側副オリーブ核(dorsal accessory olive: DAO)、内側副オリーブ核(medial accessory olive: MAO)、主オリーブ核(principal olive: PO)ごとに細胞を計数すると、背側副オリーブ核、内側副オリーブ核、主オリーブ核において IO マウスは control マウスに比べて有意に減少していた(DAO: control  $257 \pm 14$ , IO  $145 \pm 5$ ,  $t(4) = 7.380$ ,  $p = 0.001$ , MAO: control  $181 \pm 27$ , IO  $37 \pm 12$ ,  $t(4) = 4.707$ ,  $p = 0.009$ , PO: control  $310 \pm 35$ , IO  $164 \pm 20$ ,  $t(4) = 3.589$ ,  $p = 0.022$ ; 図 2-4)。

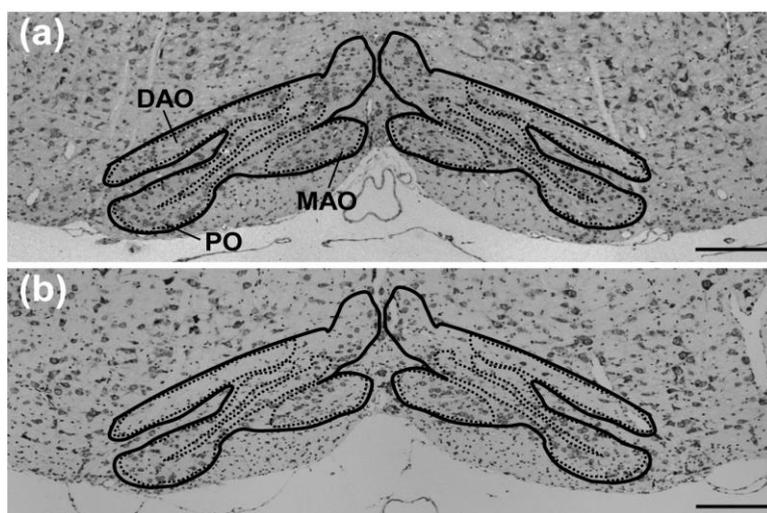


図 2-2. Nissl 染色の組織画像

(a) control マウス、(b) IO マウス 図中の枠線内は下オリーブ核を示す。

Interaural から-3.08 mm, scale bar は 200  $\mu$ m

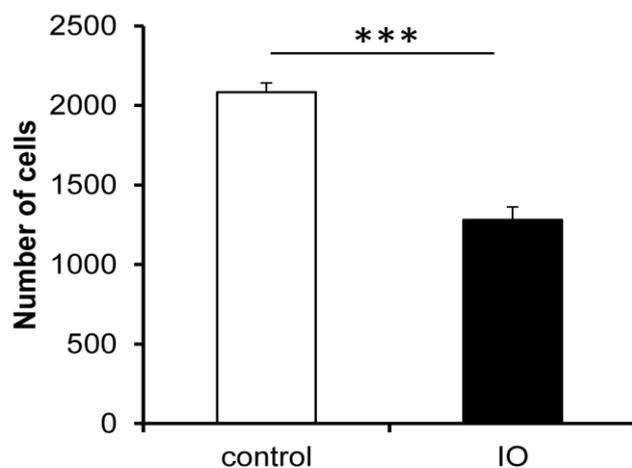


図 2-3. 下オリーブ核の細胞数

control マウスと IO マウスにおける下オリーブ核の生存細胞数を示した。

図は平均値±SEM を示す。\*\*\* $p < 0.001$

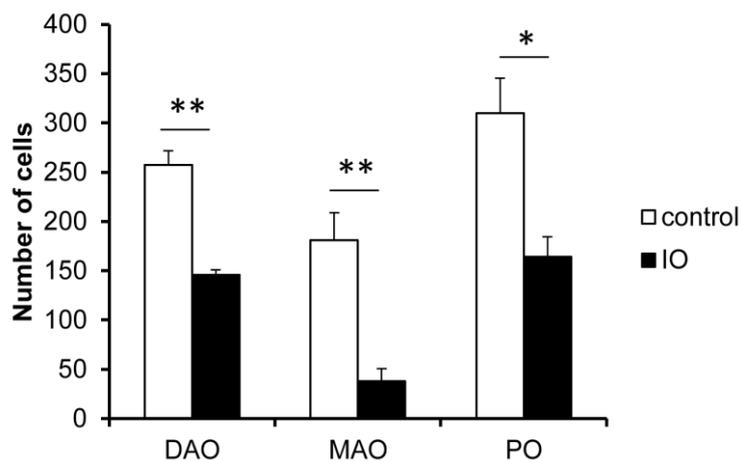


図 2-4. 下オリーブ核の部位ごとの細胞数

control マウスと IO マウスにおける下オリーブ核の部位ごとにおける細胞数を示した。図は平均値±SEM を示す。DAO (dorsal accessory olive; 背側副オリーブ核)、MAO (medial accessory olive; 内側副オリーブ核)、PO (principal olive; 主オリーブ核)

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### 2.3.2 下オリーブ核破壊による回転棒課題への影響

下オリーブ核破壊の歩行運動に対する影響を回転棒課題にて確認した(図 2-5)。

IO マウスは control マウスに比べて回転する棒の上での歩行時間が有意に減少した (mice  $\times$  trial interaction;  $F(9,72) = 21.76, p < 0.001$ , mice;  $F(1,8) = 442.169, p < 0.0001$ )。

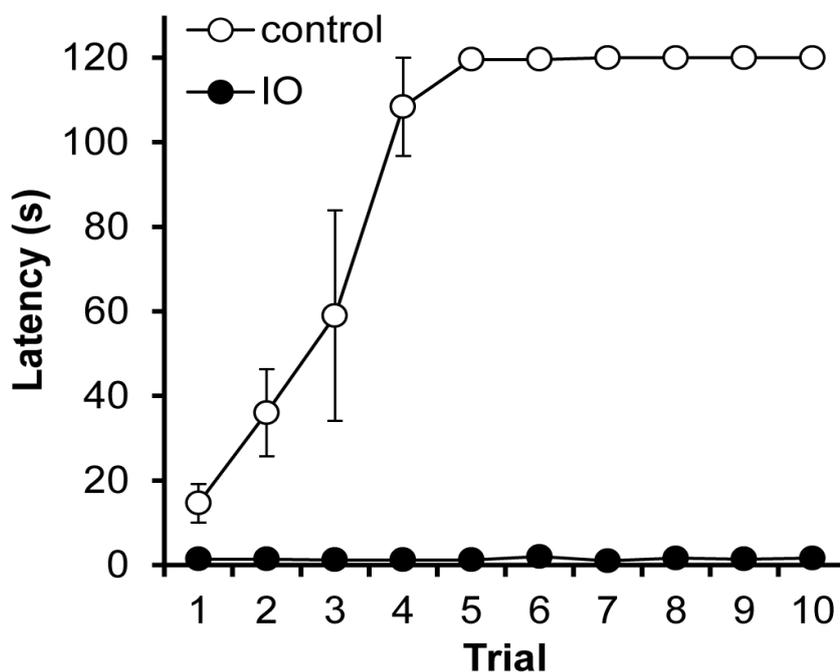


図 2-5. 回転棒課題

control マウスと IO マウスにおける回転棒から落下するまでの潜時を示した。

縦軸は回転棒上から落下するまでの時間、横軸は試行を示している。図は平均値  $\pm$  SEM を示す。

### 2.3.3 実験環境に対する馴化

実験装置として用いる防音・遮光装置、及び拘束ホルダーと尾部へ装着する電気刺激装置にマウスを馴化させるために、Habituation phase を2日間行った。この phase においては、マウスに音刺激も電気刺激も与えない。Habituation phase 2日目の平均心拍数において、control マウスと IO マウスの値に有意な差はなかった (control;  $671 \pm 18$  beats/min, IO;  $713 \pm 12$  beats/min:  $t(8) = -1.918, p = 0.091$ )。

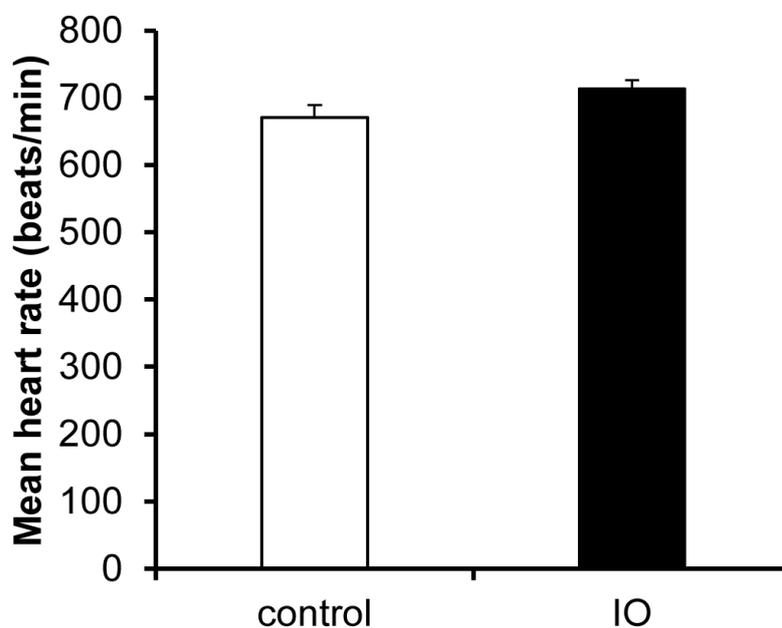


図 2-6. Habituation phase 最終日における安静時の平均心拍数

条件付けの実験環境における control マウスと IO マウスの安静時平均心拍数を示した。この phase においては音刺激と電気刺激の両方が呈示されない。図中のバーは平均値 $\pm$ SEM を示す。

### 2.3.4 音刺激に対する馴化

条件刺激として用いる音刺激にマウスを馴化させるために、CS-alone phase を 2 日間行った。この phase においては、音刺激のみがマウスに呈示される。音刺激呈示前の平均心拍数(pre-CS baseline)からの 50 試行分の平均変化分を解析した。繰り返し呈示される音刺激に対して、徐脈や頻脈は観察されず、CS-alone phase 最終日の心拍数において、control マウスと IO マウスに有意な差はなかった(time × mice interaction;  $F(4,28) = 1.947, p = 0.130$ , mice;  $F(1,7) = 5.148, p = 0.058$ )。このため、control マウスと IO マウスは音刺激に対して同様に馴化したことが示された。

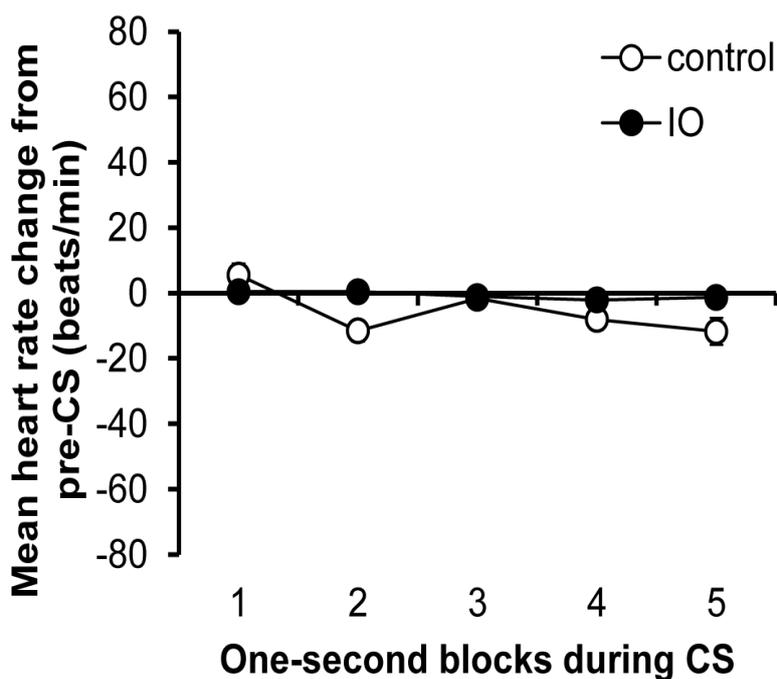


図 2-7. CS-alone phase 最終日における心拍数の平均変化分

図中の 0 のライン(pre-CS baseline)は CS 呈示前の平均心拍数を表す。音刺激 5 秒間呈示中の心拍数の 50 試行の平均変化分を control マウスと IO マウスにおいて示した。図中の各プロットは平均値±SEM を示す。

### 2.3.5 条件付け

条件刺激である音刺激と無条件刺激である電気刺激を組み合わせ、マウスに呈示し、音刺激に対するマウスの心拍応答を調べた。control マウスは音刺激中、漸進的な心拍数の減少が生じ、条件付け徐脈を呈した。一方、IO マウスは条件付け徐脈が障害されていた ( $\text{time} \times \text{mice}; F(4,28) = 36.994, p < 0.001, \text{mice}; F(1,7) = 22.569, p = 0.002$ )。1日目における control マウスと IO マウスの条件付け徐脈は2日目、3日目においても同様であった( $\text{time} \times \text{mice}; \text{second day}; F(4,32) = 12.62, p < 0.001, \text{time} \times \text{mice}; \text{third day}; F(4,32) = 7.625, p < 0.001, \text{data not shown}$ )。

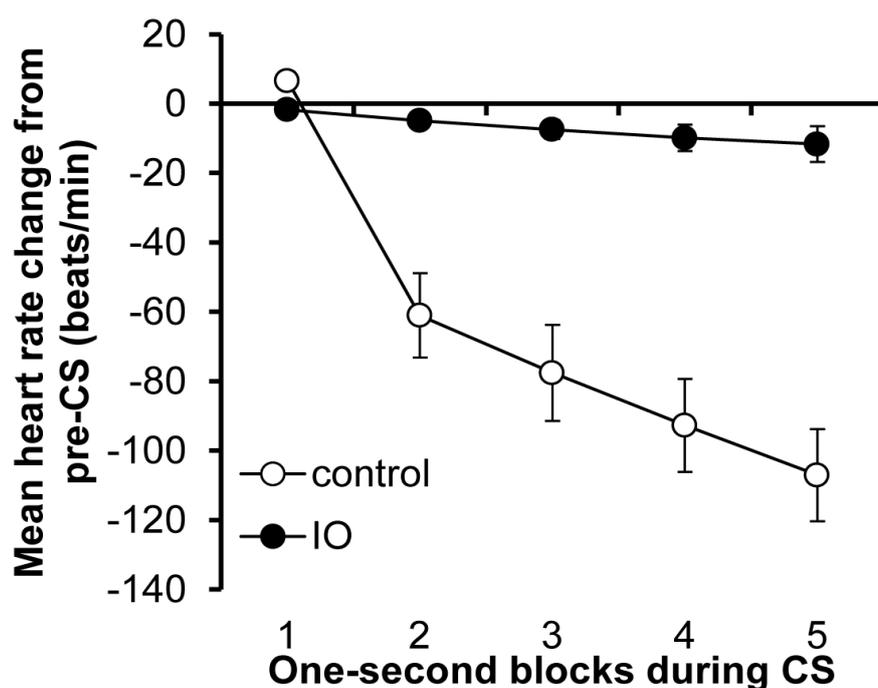


図 2-8. CS-US phase 1 日目における心拍応答

図中の 0 のライン(pre-CS baseline)は CS 呈示前の平均心拍数を表す。control マウスと IO マウスにおける音刺激 5 秒間中の心拍数の 50 試行の平均変化分を示した。図中の各プロットは平均値 $\pm$ SEM を示す。

### 2.3.6 無条件刺激としての電気刺激に対する心拍応答

CS-US phase が終了した後、無条件刺激としての電気刺激に対する心拍応答を調べるために、US-alone phase を行った。この phase においては、電気刺激のみがマウスに呈示された。control マウスは US としての電気刺激に対して頻脈応答を示す。IO マウスは control マウスより、顕著に低い頻脈応答を示した (time×mice;  $F(5,35) = 0.969, p = 0.450$ , mice;  $F(1,7) = 98.524, p < 0.001$ )。

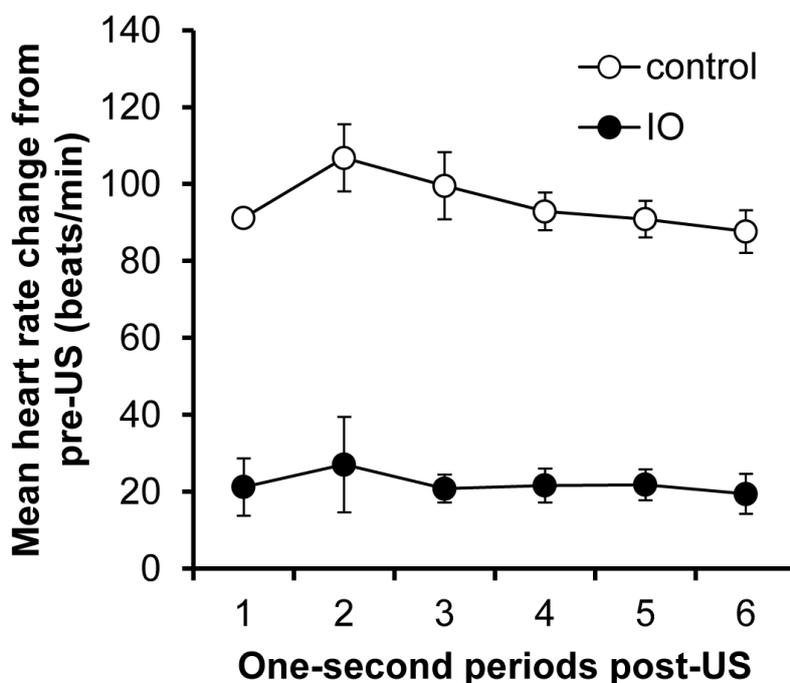


図 2-9. US に対する心拍応答

US 呈示後 6 秒間における、心拍数の 20 試行の平均変化分を control マウスと IO マウスにおいて示した。縦軸は US 呈示前の心拍数からの平均変化分を示している。横軸は US 呈示後の 6 秒間を示している。マウスは US を与えられると頻脈応答を示す。図中の各プロットは平均値±SEM を示す。

### 2.3.7 痛み刺激に対する応答

US-alone phase が終了した後、尾部への痛み刺激に対する応答を調べるために、tail-flick test を行った。このテストでは、マウスの尾部に2種類の輻射熱を与え、尾を振るまでの潜時時間を測定した。輻射熱はそれぞれ、80°Cと110°Cであった。Tail-flick test においては control マウスと IO マウスの潜時応答に有意な差はみられなかった(80°C: control;  $7.4 \pm 0.3$  s, IO;  $7.0 \pm 0.5$  s; 110°C: control;  $4.2 \pm 0.4$  s, IO;  $3.3 \pm 0.5$  s, temperature  $\times$  mouse;  $F(1,7) = 0.113$ ,  $p = 0.747$ , mouse;  $F(1,7) = 2.711$ ,  $p = 0.144$ )。

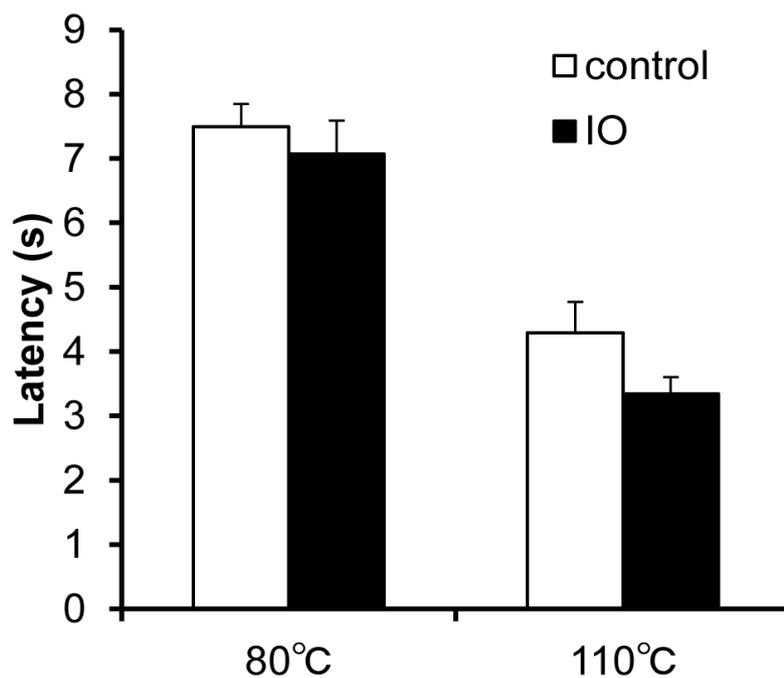


図 2-10. Tail-flick test

control マウスと IO マウスの尾部に2種類の輻射熱(80°C、110°C)を与え、尾を振るまでの潜時を示した。図中の各バーは平均値 $\pm$ SEMを示す。

## 2.4 考察

第2章においては、下オリーブ核を薬理的に破壊することで、条件付け徐脈における下オリーブ核-登上線維から小脳への入力役割を調べた。マウスに3-APを腹腔内投与すると、下オリーブ核ニューロンが破壊され、回転棒上を歩く時間が著しく減少していることが示された[図 2-2, 2-3, 2-4, 2-5]。IO マウスは、条件付けのための防音遮光装置の環境への心拍応答(Habituation phase)と、条件刺激として用いた音刺激に対する心拍応答(CS-alone phase)において、control マウスと同様に馴化した[図 2-6, 2-7]。しかし、CS-US phase においては control マウスが条件付け徐脈を呈するのに対して、IO マウスは条件付け徐脈応答が障害され [図 2-8]、さらに、US-alone phase においては、無条件刺激として用いた電気刺激呈示後、control マウスが頻脈応答を示すのに対して、IO マウスの頻脈応答は減弱していた[図 2-9]。Tail-flick test を用いて痛み刺激そのものに対する応答を調べた結果、両群に有意な差はみられなかった[図 2-10]。これらの結果より、下オリーブ核を破壊されたマウス(IO マウス)は、条件付け徐脈の獲得及び発現が障害され、US に対する頻脈応答が減弱されることが示された。

3-AP は神経毒であり、nicotinamide のアンタゴニストであることが知られている(Desclin et al., 1974)。これまで、3-AP を用いて延髄下オリーブ核を選択的に破壊することで、歩行や運動学習における影響が調べられてきた(Llinás et al., 1975, Rondi-Reig et al., 1997, Seoane et al., 2005)。本研究においても、3-AP 投与を行うと下オリーブ核の破壊が確認され、回転棒課題における成績の低下が示された。一方で、3-AP の投与として本研究においては、腹腔内投与法を用いたため、下オリーブ核以外のニューロンへの影響が考えられる。先行研究において、ラットに3-APを腹腔内投与し、nicotinamideをその3.5時間後に投与すると下オリーブ核の破壊が確認され、海馬におけるニューロンの変性は見られないことが報告されている(Rondi-Reig et al., 1997)。またラットに3-APを腹腔内投与し、nicotinamideを4.5時間後に投与し、Fluoro-Jade B染色により、変性細胞

を確認したところ、下オリブ核とさらに疑核における顕著な変性と、2 - 30%の舌下神経核、迷走神経の背側運動核や黒質における変性が報告されている(Seoane et al., 2005)。この研究において、nicotinamide を 3.5 時間後に投与した場合、下オリブ核の顕著な変性は見られるが、疑核、舌下神経核、迷走神経の背側運動核や黒質における変性細胞はない、あるいは 1-2%以下であったと報告されている。また、本研究におけるマウスへの 3-AP 投与による下オリブ核破壊は、control マウスと比較して約 40%の下オリブ核生存細胞数の減少であったが、下オリブ核の部位ごとの細胞計数により、条件付け徐脈に關与する小脳虫部へ登上線維を送る内側副オリブ核においては control マウスに比べて、IO マウスの内側副オリブ核の約 80 %が破壊されていた。このことから、条件付け徐脈への下オリブ核破壊による影響を調べるのに、本研究で行った 3-AP 投与による下オリブ核破壊のプロトコルは適切であったと考えられる。

小脳皮質神経回路において、プルキンエ細胞は平行線維と下オリブ核を起始核とした登上線維から興奮性のシナプス入力を受けている(Ito, 2001)。平行線維と登上線維に同時に頻回刺激を行うと、平行線維からプルキンエ細胞への興奮性シナプス伝達における長期抑圧が生じる。また平行線維とプルキンエ細胞間においては長期抑圧のみならず、長期増強も起こることが報告されている(Crepel and Jaillard, 1991)。瞬目条件付け学習においては、苔上线維が小脳核と小脳皮質顆粒細胞から平行線維を介してプルキンエ細胞に条件刺激(CS)を伝送し、登上線維が無条件刺激(US)を伝送することが示唆されている(Thompson and Steinmetz, 2009)。ウサギを用いた瞬目条件付け学習においては、CS と背側副オリブ核刺激の組み合わせにより、条件付け瞬目応答の獲得が起こることが報告されている(Mauk et al., 1986)。本研究においても、US を伝送すると考えられている登上線維の起始核である下オリブ核を 3-AP を用いて薬理的に破壊すると、条件付け徐脈の獲得及び発現が障害されたことが示された。さらに、US-alone phase において US として用いた電気刺激に対して頻脈応答が減弱した。これらの結果から、条件付け徐脈において、下オリブ核－登上線維から小脳への入力の役割は、US を小脳

へ伝送することであると考えられ、条件付け徐脈の獲得及び発現に必要なことが示唆された。

IO マウスは US-alone phase においては頻脈応答の減弱を示したが、tail-flick test における、尾部への2種類の輻射熱に対する潜時は control マウスと同様の値を示した。痛み刺激は、脊髓を通り、網様体や視床を介して大脳皮質や視床下部、大脳辺縁系に伝送される(Saadé and Jabbur, 2008)。脊髓から入力を受ける下オリーブ核を破壊しても、tail-flick test における痛み刺激に対する応答には、差異は認められなかった。しかし、US-alone phase における尾部への電気刺激においては、下オリーブ核破壊によって頻脈応答の減弱が認められた。このため、下オリーブ核は tail-flick test における痛み刺激への応答には関与しないが、恐怖条件付け徐脈における US に対する頻脈応答に関与することが示された。心拍応答における下オリーブ核の関与は動物を用いた刺激実験から報告されている。例えば、麻酔下のネコの下オリーブ核に対して、グルタミン酸を注入すると、心拍数のわずかな変化が見られることが報告されている(Waldrop and Iwamoto, 1991)。

平行線維からプルキンエ細胞への入力は simple spike として、また登上線維からプルキンエ細胞への入力は、complex spike として記録することができる(Barmack and Shojaku, 1995)。金魚を用いた恐怖条付け徐脈において、条件付け徐脈の獲得中、小脳のプルキンエ細胞が CS に対して simple spike を生じ、US に対して complex spike を生じることが報告されている(Yoshida and Kondo, 2012)。このため、小脳皮質や小脳核への下オリーブ核の入力が、US に対する頻脈応答に関与することが考えられる。しかしながら、どのようなメカニズムで、CS-US phase においては CS に対する条件付け徐脈を示し、US-alone phase における US に対して頻脈応答を生じたのだろうか。小脳虫部のプルキンエ細胞の軸索は小脳深部核の一つである室頂核に投射している。また室頂核は自律神経系の応答に関連しており、ここに電気刺激を与えると、心拍数の増加が生じることが報告されている(Achari and Downman, 1970)。これらの先行研究から、US に対する頻脈

応答が生じるには、室頂核の活動が増加していることが考えられる。頻脈応答が生じるために室頂核の活動の増加が必要ならば、徐脈応答を生じるには、室頂核の活動が減少することが推測される。室頂核の活動が減少するためには、プルキンエ細胞への興奮性シナプス入力が増大し、プルキンエ細胞の活動が増加することで、室頂核への抑制性の入力が増加していることが考えられる。このため、プルキンエ細胞の活動を増加させるメカニズムの一つとして、CS 呈示中(音刺激中) に平行線維-プルキンエ細胞間において、長期増強が生じている可能性が考えられる。長期増強によって増加したプルキンエ細胞の活動が、室頂核への抑制性の入力が増大し、その結果として、室頂核の活動が減少し、CS に対する条件付け徐脈が生じるのかもしれない。ラットの恐怖条件付けすくみ応答においては、条件付けすくみ応答獲得後の小脳虫部において、平行線維-プルキンエ細胞間に長期増強が生じることが報告されている(Sacchetti et al., 2004)。

一方で、US に対する頻脈応答のメカニズムは次のように考えられる。条件付け徐脈の獲得中に生じる US に対する complex spike 応答は CS に対する simple spike の活動を一時的に抑えることが示されている(Yoshida and Kondo, 2012)。プルキンエ細胞における simple spike と complex spike の活動は、相反関係にあり、一方の活動が他方の活動を抑えることが報告されている(Barmack and Shojaku, 1995)。さらに登上線維入力がプルキンエ細胞における simple spike と complex spike の相反的な活動を制御していることが示唆されている(Badura et al., 2013)。これらの先行研究から、complex spike による simple spike の抑制がプルキンエ細胞から室頂核への抑制性の入力を減少させ、US に対する頻脈応答が引き起こされたのではないかと考えられる。

## 第 2 章の結論

第 2 章において延髄の下オリーブ核を 3-AP を用いて薬理的に破壊し、条件付け徐脈への影響を調べた。CS-US において下オリーブ核を破壊されたマウスは条件付け徐脈の獲得及び発現が障害されており、また US-alone において US に対する頻脈応答の減弱を示した。恐怖条件付け徐脈における下オリーブ核から小脳への入力役割は、小脳へ US を伝送することであり、条件付け徐脈の獲得及び発現に必要であることが示唆された。

## 第3章 δ2型グルタミン酸受容体変異による恐怖条件付け徐脈への影響

### 3.1 諸言

瞬目条件付け学習においては、条件刺激は苔状線維により小脳核と、小脳皮質顆粒細胞及び平行線維を介してプルキンエ細胞へと伝送され、また無条件刺激は下オリブ核を起始核とする登上線維が伝送されることが示唆されている(Thompson and Steinmetz, 2009)。小脳の顆粒細胞特異的に破傷風毒素を発現させシナプス小胞からのグルタミン酸放出を阻害したマウスにおいて瞬目条件付け学習を行うと、条件付け瞬目応答の発現が減弱した(Wada et al., 2007)。一方で、下オリブ核のAMPAを、NBQXを用いて可逆的に阻害すると、条件付け瞬目応答の獲得が障害された(Medina et al., 2002)。さらに、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの長期抑圧が障害されているマウスにおいては、瞬目条件付け応答の獲得が障害されることが報告されている(Aiba et al., 1994, Miyata et al., 2001)。第2章において、下オリブ核を薬理的に破壊し、恐怖条件付け徐脈を行うと、条件付け徐脈応答の獲得及び発現が障害されることを示した。しかしながら、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの減少や平行線維-プルキンエ細胞間における長期抑圧の障害が、恐怖条件付け徐脈において影響するののかについて調べた研究はない。

GluD2は小脳の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスのシナプス後膜に選択的に発現するという特徴を持っている(Takayama et al., 1996)。しかしながらGluD2はグルタミン酸やカイニン酸のいずれに対しても活性を示さないことが報告されていた(Lomeli, 1993)。そのため、グルタミン酸受容体として機能するのかどうかは明らかでなく、orphan receptorとして考えられていた(Matsuda and Yuzaki, 2012)。GluD2ノックアウトマウスは小脳の平行線維-プルキンエ細胞間における長期抑圧の障害、平行線維とプ

ルキンエ細胞間のシナプスの数の減少、登上線維のプルキンエ細胞への多重支配の残存、歩行失調を呈することが報告されている(Kashiwabuchi et al., 1995)。これらの特徴からGluD2は小脳における機能に重要な役割を果たしていることが考えられた。HiraiらはGluD2ノックアウトマウスの平行線維-プルキンエ細胞間における長期抑圧の障害が平行線維、登上線維の未成熟に由来するのか、あるいは長期抑圧のシグナル伝達そのものにGluD2が関与するのかを調べた。成熟した正常な小脳の切片におけるプルキンエ細胞にGluD2の阻害抗体を添加し、長期抑圧を引き起こす刺激を与えたところ長期抑圧の発現が障害され、さらに生後0日目のラットあるいはマウスから培養した小脳におけるプルキンエ細胞にGluD2の阻害抗体を添加した際にAMPAの数を調べると、AMPAの数はGluD2の阻害抗体を添加しないものに比べて減少していた(Hirai et al., 2003)。このため、GluD2は平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧の発現において、AMPAのシナプス後膜における数の調整をすることで関与することが示唆された。GluD2ノックアウトマウスを用いて、瞬目条件付け学習を行うと条件付け瞬目応答の獲得が障害されることが報告されている(Kishimoto et al., 2001)。また成熟した野生型マウスにGluD2の阻害抗体を小脳クモ膜下腔に注入し、回転棒課題を行うと学習の獲得は起こるが、24時間後に再度課題を行うと、前日に獲得した学習の保持に障害が示された(Hirai et al., 2003)。これらの研究から、GluD2は平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの長期抑圧や学習に重要であることが示された。

GluD2の自然発生変異を有する*hotfoot*マウスは、GluD2ノックアウトマウスと類似した症状を呈し、平行線維とプルキンエ細胞間のシナプス数の減少、登上線維のプルキンエ細胞への多重支配の残存、長期抑圧の障害や歩行失調を示すことが報告されている(Yuzaki, 2004)。*hotfoot*マウスのうち、GluD2をコードする*grid2*遺伝子のLIVBP類似領域をコードするexonのうち、exon5-8を欠損している*ho4J*マウスにおいて恐怖条件付けすくみ応答を学習させたところ、条件付けすくみ応答の獲得は正常だが、獲得後10分後と24時間後に測定を行うと、条件付けすくみ応答の減弱を示した (Sacchetti et al., 2004)。

このことから、*ho4J*マウスにおいては獲得した条件付け応答の保持に影響があったことが示唆された。近年、小脳性の歩行失調や眼球運動の異常性と発育発達の遅延、言語発達の障害を示す患者のゲノム解析より *GluD2* をコードする *GRID2* 遺伝子において、*LIVBP* 類似領域をコードする exon のうち exon 2 における欠損が見つかったことが報告されている (Hills et al., 2013)。この患者らと同様に exon 2 の欠損を示すのが *ho15J* マウスである。*ho15J* マウスは、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスの減少、登上線維の多重支配の残存、長期抑圧の障害や歩行失調を示すことが報告されている (Motohashi et al., 2007, Takeuchi et al., 2012)。また *ho15J* マウスの平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスは *wild-type* マウスに比べて、約 60 % 減少していることが報告されている (Takeuchi et al., 2012)。このため、*ho15J* マウスにおいては、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス数が減少していること、プルキンエ細胞への登上線維の多重支配が残存すること、また平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧が障害されていることから、条件付け徐脈に影響するのではないかと考えた。そこで、第3章においては、*ho15J* マウスを用いて恐怖条件付け徐脈を行い、条件付け徐脈における *GluD2* の変異の影響を調べた。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 実験動物

本実験は東京大学動物実験倫理委員会によって承認され、東京大学動物実験実施マニュアルおよびNIH(National Institutes of Health)動物実験ガイドラインに従って行った。実験動物の使用数は必要最小限にとどめ、実験中は動物へのストレスや痛みが最小限になるように努めた。

実験には *ho15J* ホモ変異体マウス(C3H/HeJcl background)を用いた。*ho15J* マウス(n=9, 8-10 週齢, オス)および比較対照群として正常野生型 C3H/HeJcl マウス(n=10, 8-10 週齢, オス)を用いて行った。正常野生型マウスは株式会社日本クレア(Tokyo, Japan)より購入した。マウスはシングルケージにて飼育し、餌と水は 24 時間自由に摂取できるようにした。明暗サイクルは 12 時間(明期 8-20 時、暗期 20-8 時)に設定した。

### 3.2.2 心電図導出用電極埋め込み手術

マウスの心拍数を記録するために、心電図導出用の電極を作成し、外科的な手術を行い経日的に心拍数を記録できるよう、マウスの皮下に埋め込んだ。マウスを Isoflurane (Abbott Japan, Tokyo, Japan)で吸入麻酔し(導入時: 0.3 %, 維持時: 0.15 %)、脳定位固定装置 (Narishige, Tokyo, Japan)に設置した。マウスの頭頂部正中の頭皮を切開し、頭蓋を露出し、アース用ボルト電極を固定した。さらに心電図導出としてシリコンで被膜されたステンレススチールワイヤを胸部の皮下に留置した。心電図導出用の電極と頭蓋の接着部位を歯科用セメントで固定し、切開した頭皮を縫合、接着した。術後回復のため、脱水に注意しながらマウスの体温を維持した。マウスの術後の回復期間として 2-3 日を設けた。

### 3.2.3 実験装置

#### マウスの保定

実験は、防音遮光室 (196 × 84 × 86.5 cm; 高さ×縦×横) 内に 2 段組のラックを設置し、同時に 2 匹ずつ実験を行うことができるように設定した。マウスはアクリル製のホルダー内に拘束された。

#### 刺激装置

音刺激と電気刺激を時間的に組み合わせた刺激パラダイム作成のためにパルス発生器 (Master 8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel)にてプログラムを作成した。音刺激はパルス発生器からの 5 秒間の矩形波パルス出力をマルチシンセサイザ(1941-Wave-Factory, NF Corporation, Yokohama, Japan) により 2.5 kHz のサイン波に変換後、パワーアンプ (SRP-P150, SONY, Tokyo, Japan) で増幅し、スピーカーを通してマウスに呈示した。マウスに呈示する音刺激の大きさは騒音計 (SL-1250, CUSTOM, Ibaraki, Japan)を用いて、80 dB に調節した。尾部への電気刺激は電気刺激装置 (SEN-2201, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)にて 50 Hz、0.5 秒間、0.3 mA に設定し、マウスの尾部への刺激電極に接続した。

#### 心拍記録装置

マウスに埋め込んだ心電図導出用電極からの出力は入力ボックスを介して、電気生理学用実験アンプ(MEG-2100, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) で増幅した。アンプからの出力を 2 つに分け、一方をオシロスコープ (VC-6725, Hitachi, Tokyo, Japan) に入力してモニターし、もう一方は AD 変換ボード (MacLab 8s, AD Instruments, Dunedin, New

Zealand) によって、サンプリング周波数 1kHz で試行ごとにコンピュータのハードディスクへ記録した。心電図の解析にはソフトウェア (LabChart software v.3.6.1/s AD Instruments, Dunedin, New Zealand) を用いた。

### 3.2.4 恐怖条件付け手順

本研究における恐怖条件付けにおいて、条件刺激(conditioning stimulus: CS) として 2.5 kHz、80 dB、5 秒間の音刺激を用いた。また無条件刺激(unconditioned stimulus: US) として 50 Hz、0.3 mA、0.5 秒間の尾部への電気刺激を用いた。

① Habituation phase、② CS-alone phase、③ CS-US phase、④ Extinction phase、⑤ US-alone phase の順に実施した。各 phase は 1 日から 2 日のインターバルで行った。

#### ① Habituation phase

恐怖条件付け手順の最初の 2 日間は、防音遮光室内におけるアクリル製のホルダーによる拘束、尾部への電気刺激用電極装着という環境に馴化させるために Habituation phase を行った。この phase においては CS や US はマウスに対して呈示しなかった。Habituation phase においては、心拍の記録は 90 秒毎に 10 秒間の記録を 50 回行い、その平均心拍数を安静時の心拍とした。

#### ② CS-alone phase

マウスを音刺激に馴化させるために、アクリル製のホルダーに拘束し、心拍数が安定した後 (2 分ごとに計 5 回心拍数を記録し、心拍数の変動が ±100 bpm 以内の場合

には安定とした)、1日50試行行った。試行間のインターバルは180秒で、この phase は2日間行った。

### ③ CS-US phase

マウスが実験環境と音刺激に馴化した後、CS-US phase を行った。マウスをアクリル製のホルダー内に拘束し、心拍数が安定した後 (2分ごとに計5回心拍数を記録し、心拍数の変動が±100 bpm 以内の場合には安定とした)、1日50試行連続5日間行った。試行間のインターバルは180秒であった。

### ④ Extinction phase

CS-US phase における条件徐脈を消去するために、音刺激のみを与える Extinction phase を行った(条件付け学習において、条件付け応答獲得後に、再び条件刺激のみを与えて、一度獲得した条件付け応答を消去することを Extinction という)。心拍数が安定した後 (2分ごとに計5回心拍数を記録し、心拍数の変動が±100 bpm 以内の場合には安定とした)、1日20試行、連続5日間行った。試行間のインターバルは180秒であった。

### ⑤ US-alone phase

無条件刺激として用いた電気刺激に対するマウスの心拍応答を調べるために、心拍数が安定した後 (2分ごとに計5回心拍数を記録し、心拍数の変動が±100 bpm 以内の場合には安定とした)、1日20試行行った。試行間のインターバルは180秒で、この phase は1日のみ行った。

### 3.2.5 条件付け徐脈の評価

マウスの心拍数は記録した心電図の連続した R 波を指標として、R-R 間隔を beats/min に換算した。CS に対する心拍数の変化は、CS 呈示直前の 1 秒間の心拍数(pre-CS baseline)と、CS 5 秒間を 1 秒間ずつに区分し、pre-CS baseline からの変化として評価した。US 呈示後の心拍数変化は、US 呈示の開始から 1 秒後の 6 秒間を 1 秒ずつに区分し、それぞれの区間の心拍数と pre-US baseline からの変化として評価した。US 呈示後 1 秒間以降を評価した理由は、US 呈示直後の 1 秒間は心電図に筋電図活動が混入するため R 波の検出が不可能なためである。

### 3.2.6 痛覚応答テスト

本研究における恐怖条件付けでは無条件刺激として尾部への電気刺激を用いているが、尾部への痛覚刺激に対する応答を確かめるために tail-flick test を行った。このテストにおいてマウスの尾部に 2 種類の輻射熱 (80 °C、110 °C)を与え、尾を振るまでの潜時を測定した。

### 3.2.7 統計的解析

各項目の解析結果は平均値±標準誤差 (SEM)で示した。統計処理には統計解析ソフトウェア SPSS version 16.0 (SPSS Japan. Inc., Tokyo, Japan) を用いた。解析によって求められた平均値の差は、Levene 検定において等分散性が認められた場合は Student-*t* 検定を、等分散性が認められなかった場合は Welch 検定を行った(図 3-1, 表 3-1)。マウス要因×時間要因を独立変数とする繰り返しのない 2 要因の分散分析を行い、Bonferroni post hoc test を行った(図 3-2, 3-3, 3-8)。マウス要因×日要因を独立変数とする繰り返しの

ない 2 要因の分散分析を行い、Bonferroni post hoc test を行った(図 3-4, 3-5, 3-7)。マウス要因×温度要因を独立変数とする繰り返しのない 2 要因の分散分析を行い、Bonferroni post hoc test を行った(図 3-9)。マウス要因×ブロック要因×日要因を独立変数とする 3 要因の分散分析を行い、Turkey HSD post hoc test を行った(図 3-6)。有意水準は 5%未満とした。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 実験環境に対する馴化

実験装置として用いる防音・遮光装置、及び拘束ホルダーと尾部へ装着する電気刺激装置にマウスを馴化させるために、Habituation phase を 2 日間行った。この phase においては、マウスは音刺激も電気刺激も与えられない。Habituation phase 2 日目の安静時の平均心拍数において、wild-type マウスと *ho15J* マウスの値に有意な差はなかった [wild-type:  $738 \pm 14$  beats/min, *ho15J*:  $727 \pm 10$  beats/min,  $t(17) = 0.565$ ,  $p = 0.578$ ]。

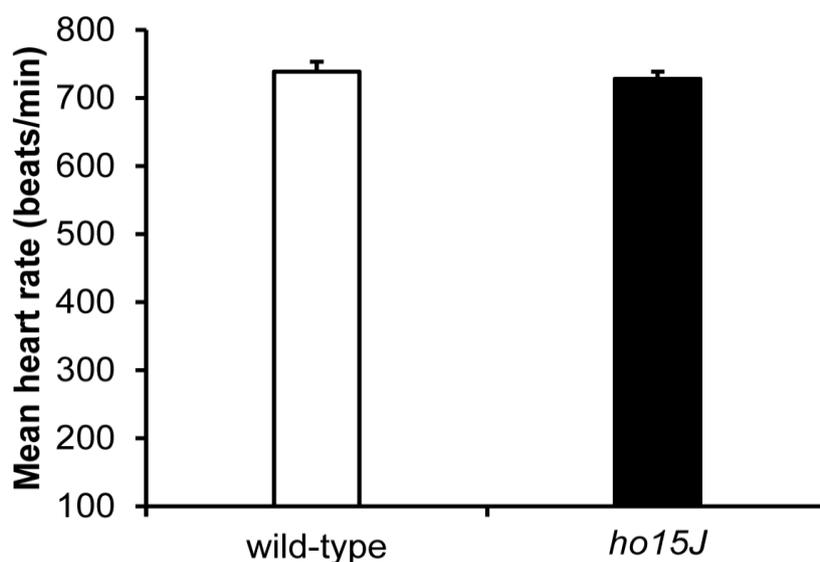


図 3-1. Habituation phase 最終日における安静時の平均心拍数

条件付けの実験環境における wild-type マウスと *ho15J* マウスの安静時平均心拍数を示した。この phase においては音刺激と電気刺激の両方が呈示されない。図の各バーは平均値 $\pm$ SEM を示す。

### 3.3.2 音刺激に対する馴化

条件付け学習に用いる音刺激に対して馴化させるために、CS-alone phase を 2 日間行った。この phase においては、音刺激のみがマウスに呈示される。音刺激呈示前の平均心拍数(pre-CS baseline)からの 50 試行の平均変化分を示した。繰り返し呈示される音刺激に対して、徐脈や頻脈は観察されず、CS-alone phase 2 日目の音刺激中の心拍応答において、wild-type マウスと *ho15J* マウスの値に有意な差はなかった [mice × time interaction,  $F(4,68) = 1.015, p = 0.406$ ]。このため、control マウスと IO マウスは音刺激に対して馴化したことが示された。

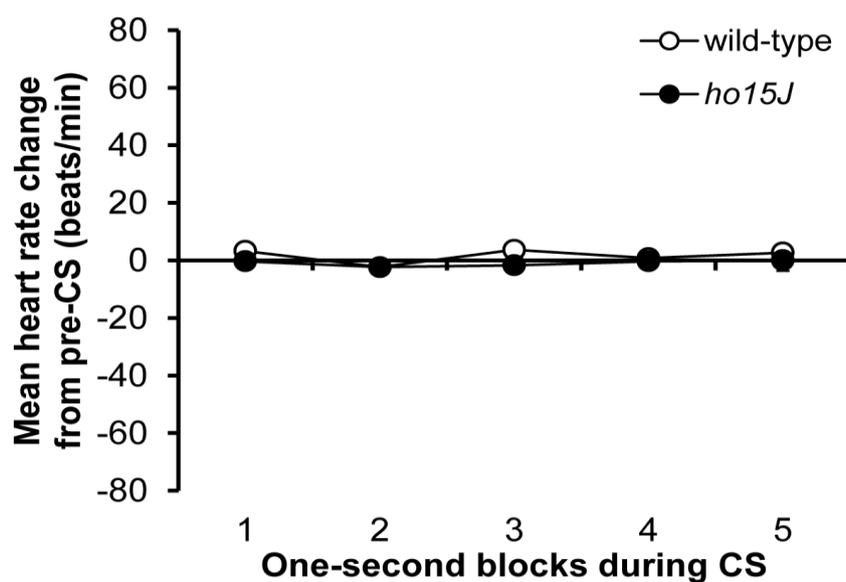


図 3-2. CS-alone phase 最終日における心拍応答

図中の 0 のライン(pre-CS baseline)は CS 呈示前の平均心拍数を表す。音刺激 5 秒間呈示中の心拍数の 50 試行の平均変化分を wild-type マウスと *ho15J* マウスにおいて示した。図中の各プロットは平均値±SEM を示す。

### 3.3.3 条件付け CS-US phase 1 日目

マウスに音刺激と電気刺激を呈示し、音刺激に対する漸進的な心拍数の減少(条件付け徐脈)を学習するために CS-US phase を行った。CS 呈示の 1 秒前の心拍数を基準とし、5 秒間の CS 呈示における心拍変化分を算出した。下記は第 1 日目における、音刺激 5 秒間中の条件付け徐脈、50 試行の平均を表している。wild-type マウスと *ho15J* マウスは共に音刺激に対して条件付け徐脈を示しており、両群に有意な差はなかった [mice  $\times$  time interaction,  $F(4,68) = 0.595, p = 0.514$ ]。

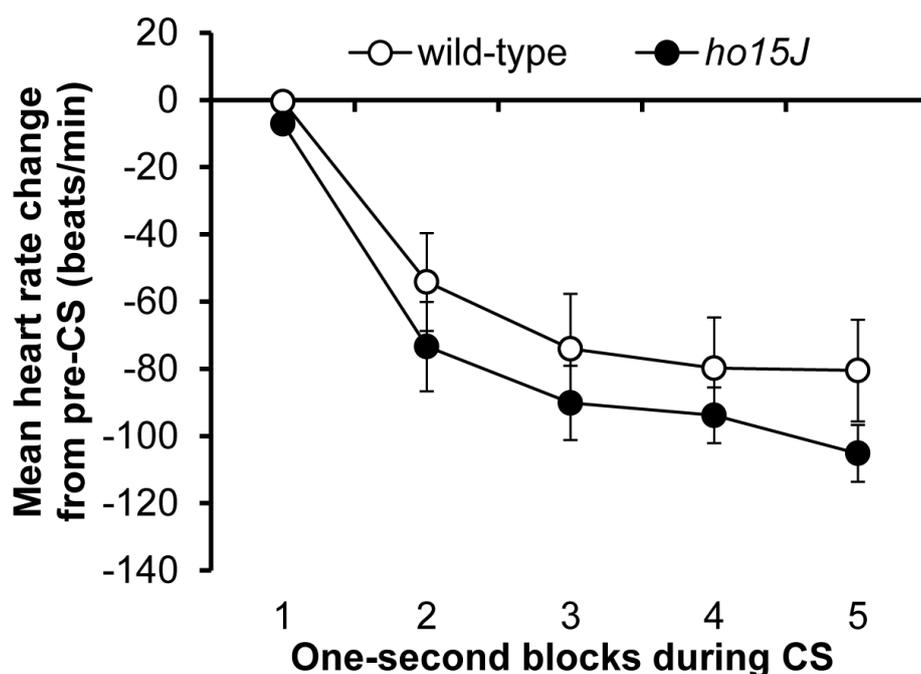


図 3-3. CS-US phase 1 日目における心拍応答

図中の 0 のライン(pre-CS baseline)は CS 呈示前の平均心拍数を表す。control マウスと *ho15J* マウスにおける音刺激 5 秒間中の心拍数の 50 試行分の平均変化分を呈示した。図中の各プロットは平均値 $\pm$ SEM を示す。

### 3.3.4 CS-US phase 5 日間における条件付け徐脈の応答率

CS 呈示の 1 秒前の心拍数の値 50 試行を平均し、その平均値の 1SD 以下を条件付け徐脈としたとき、CS-US phase における条件付け徐脈の応答の発現率を示した。5 日間において条件づけ徐脈応答の確率には wild-type マウスと *ho15J* マウスの間に有意な差はなかった[mice  $\times$  day interaction,  $F(4,32) = 0.828, p = 0.517$ ]。

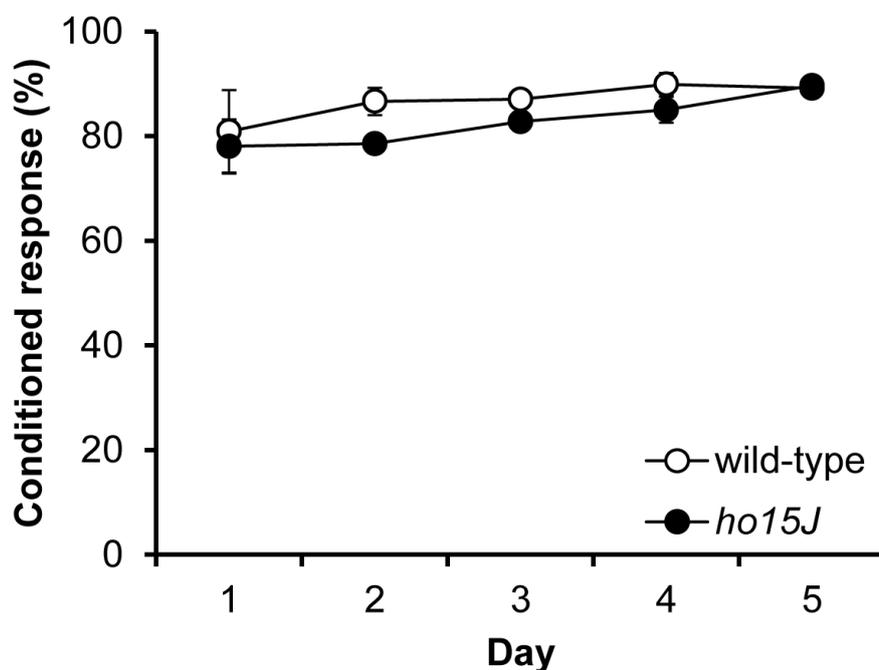


図 3-4. CS-US phase5 日間における条件付け徐脈応答率

CS-US phase 5 日間における条件付け徐脈の発現率を示した。図中の各プロットは平均値 $\pm$ SEM を示す。

### 3.3.5 CS-US phase 5 日間における平均心拍数

CS-US phase 5 日間における平均心拍数は、wild-type と *ho15J* マウスの上に、有意な差はなかった[mice×time interaction,  $F(4,68) = 1.008, p = 0.382$ ]

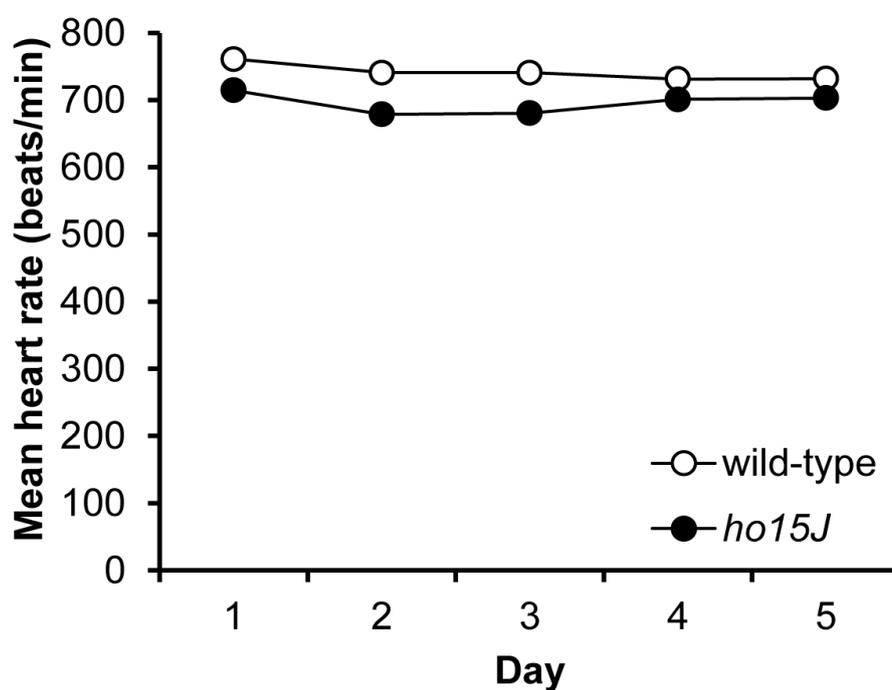


図 3-5. CS-US phase5 日間における平均心拍数

CS 呈示 1 秒前の心拍数を CS-US phase における各日ごとに 50 試行平均し、CS-US phase の安静時の平均心拍数として呈示した。図中の各プロットは平均値±SEM を示す。

### 3.3.6 CS-US phase 5 日間における条件付け徐脈

CS-US phase において、CS 5 秒間呈示中に示された条件付け徐脈の 5 秒目の値を、10 試行ずつ平均し、日ごとに 5 ブロックずつ呈示した(図 3-6)。図の 3-7 は、図の 3-6 において示された、前日の最後の 10 試行と翌日の最初の 10 試行における条件付け徐脈の値を wild-type マウスと *ho15J* マウスにおいて呈示したものである。CS-US phase 1 日目における条件付け徐脈以降、4 日間(CS-US phase 2-5 日)の条件づけ徐脈の各日において、wild-type マウスと *ho15J* マウスは異なる変動パターンを示した[mouse×block;  $F(4,345) = 3.104, p = 0.016$ ]。wild-type マウスは 1 日目の条件付け徐脈の獲得以降、2-5 日目はほぼ安定して条件付け徐脈を呈している。しかし、*ho15J* マウスは前日の最後の 10 試行(41-50 試行)から翌日の最初の 10 試行(1-10 試行)にかけて条件付け徐脈応答が亢進されており、日内においては wild-type の値に近づいていくことが観察された。*ho15J* マウスにおける条件付け徐脈の変動パターンは CS-US phase 1 日目以降、連続 4 日間同様に示された。前日の最後の 10 試行と翌日の最初の 10 試行における条件付け徐脈の値と統計量、 $p$  値を以下に記す(表 3-1)。

表 3-1. CS-US phase における前日の最後の試行と翌日の最初の試行の徐脈値の比較

	CS-US 1-2		CS-US 2-3		CS-US 3-4		CS-US 4-5	
	wild-type	<i>ho15J</i>	wild-type	<i>ho15J</i>	wild-type	<i>ho15J</i>	wild-type	<i>ho15J</i>
Last-block on previous day (beats/min)	-97 (12)	-107 (11)	-80 (12)	-84 (10)	-82 (14)	-100 (10)	-92 (7)	-100 (11)
First-block on next day (beats/min)	-102 (10)	-132 (11)	-101 (12)	-158 (12)	-109 (8)	-151 (14)	-103 (14)	-162 (14)
Test statistic $P$ value	$p = 0.75$	$p = 0.128$	$p = 0.232$	$p = 0.019$	$p = 0.113$	$p = 0.013$	$p = 0.503$	$p = 0.04$

各値の下の()内の数値は SEM を示す。

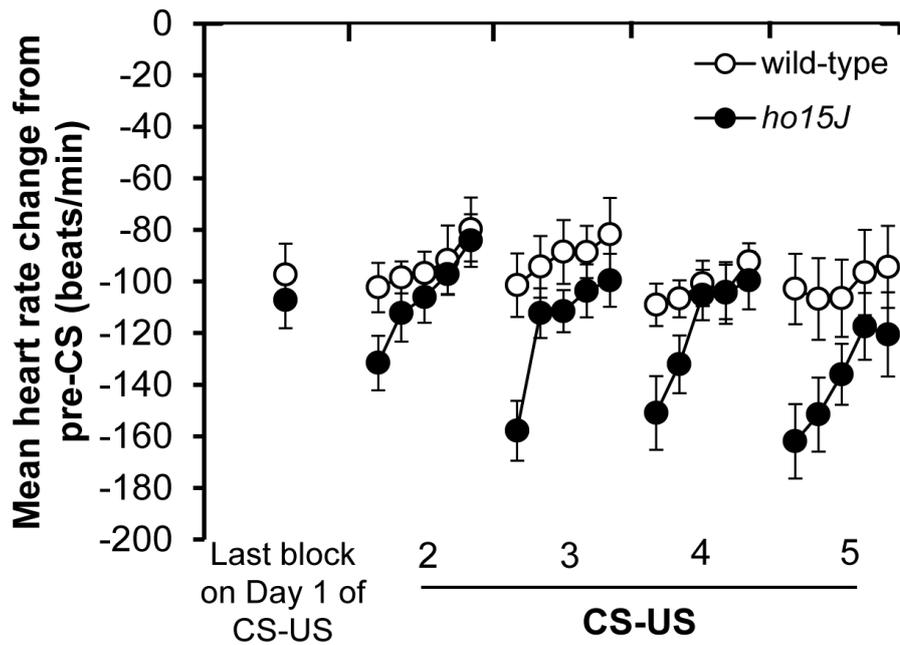


図 3-6. CS-US phase 5 日間における条件付け徐脈の変動パターン

図中の 0 のライン(pre-CS baseline)は CS 呈示前の平均心拍数を表す。1 日 50 試行行ったうち、音刺激 5 秒間中、最後の 5 秒目を 10 試行ずつまとめ、日ごとに 5 ブロックずつ呈示した。CS-US phase 1 日目においては最後の 41-50 試行を示している。図中の各プロットは平均値±SEM を示す。

### 3.3.7 条件付け徐脈の消去

連続5日間のCS-US phase後に、CSのみを与えて条件付け徐脈の消去を行う、Extinction phaseを行った。音刺激最後の1秒間(5秒目)の値を20試行分平均し、日ごとに呈示した。wild-typeマウスと*ho15J*マウスにおいて、条件付け徐脈の消去に有意な差はみられなかった[mice×time interaction,  $F(4,68) = 2.394, p = 0.059$ ]。また、5日目における両群の条件付け徐脈の値に有意な差はなく[wild-type,  $-47 \pm 7$ ; *ho15J*,  $-38 \pm 8, t(-0.829), p = 0.418$ ]、*ho15J*マウスはwild-typeマウスと同様に条件付け徐脈を消去した。

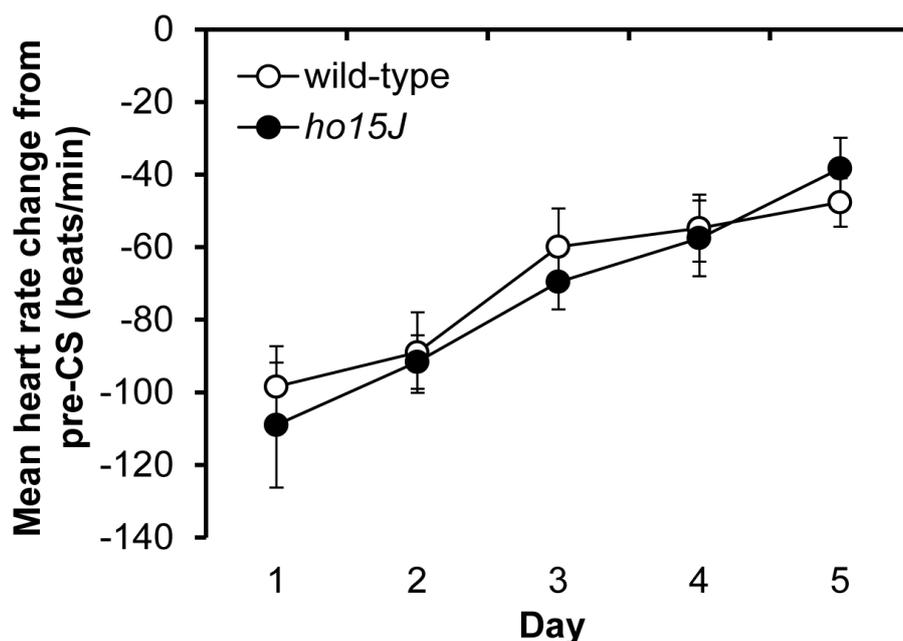


図 3-7. Extinction phase 5 日間における条件付け徐脈の推移

図中の0のライン(pre-CS baseline)はCS呈示前の平均心拍数を表す。音刺激5秒間のうち、最後の5秒目の心拍数を20試行分平均し、日ごとに呈示している。図中の各プロットは平均値±SEMを示す。

### 3.3.8 無条件刺激としての電気刺激に対する心拍応答

CS-US phase が終了した後、無条件刺激として用いた電気刺激に対する心拍応答を調べるために、US-alone phase を行った。この phase においては、電気刺激のみがマウスに呈示される。wild-type マウスと *ho15J* マウスともに、頻脈応答を示し、両群に有意な差はなかった[micextime interaction,  $F(5,65) = 0.226, p = 0.950$ ]。

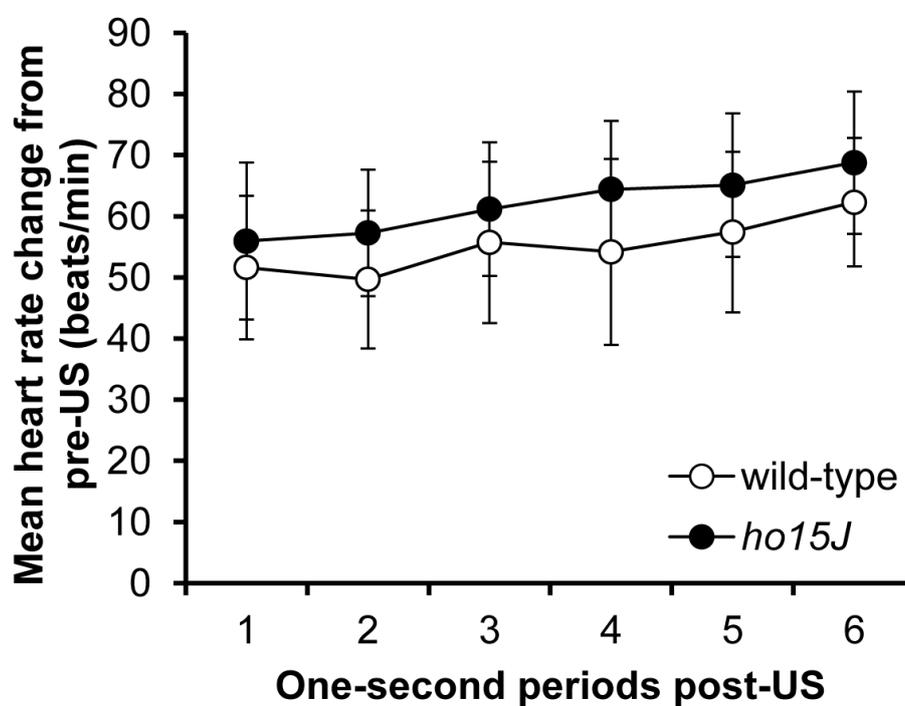


図 3-8. US に対する心拍応答

US 呈示後の 6 秒間の心拍数の応答を wild-type マウスと *ho15J* マウスにおいて 20 試行を平均して示した。マウスは US を与えられると頻脈応答を示す。図中の各プロットは平均値 $\pm$ SEM を示す。

### 3.3.9 痛み刺激への応答

US-alone phase が終了した後、尾部への痛み刺激に対する応答を調べるために、tail-flick test を行った。このテストでは、マウスの尾部に2種類の輻射熱を与え、尾を振るまでの潜時時間を測定した。輻射熱はそれぞれ、80°C と 110°C であった[80°C: wild-type;  $7.6 \pm 0.2$ , *ho15J*;  $7.3 \pm 0.2$ , 110°C: wild-type;  $4.1 \pm 0.1$ , *ho15J*;  $3.9 \pm 0.1$ , temperature  $\times$  mouse;  $F(1,17) = 0.181$ ,  $p = 0.675$ , mouse;  $F(1,17) = 1.702$ ,  $p = 0.209$ ]。

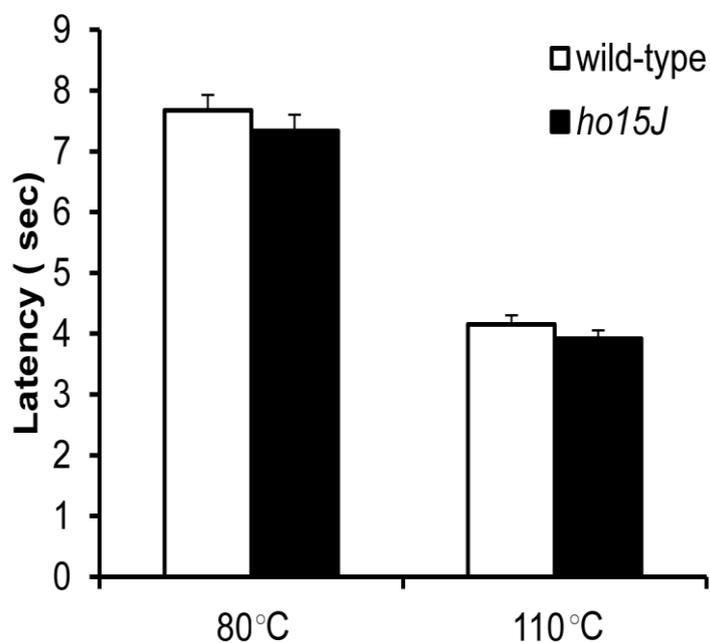


図 3-9. Tail-flick test

wild-type マウスと *ho15J* マウスの尾部に2種類の輻射熱(80°C、110°C)を与え、尾を振るまでの潜時を示した。図中の各バーは平均値 $\pm$ SEMを示す。

### 3.4 考察

第3章においては、GluD2を生来から変異している *ho15J* マウスにおける恐怖条件付け徐脈を調べた。*ho15J* マウスは、wild-type マウスと同様に条件付けのための防音遮光装置の環境に馴化し(Habituation phase)、条件刺激として用いた音刺激に対しても馴化(CS-alone phase)を示した[図 3-1, 3-2]。CS-US phase 1 日目においては、*ho15J* マウスは wild-type マウスと同様に条件付け徐脈応答の獲得を示した[図 3-3]。CS-US phase 5 日間における条件付け徐脈の応答率にも有意な差は見られなかった[図 3-4]。また CS-US phase 5 日間における平均心拍数は両群において有意な差は見られなかった[図 3-5]。CS-US phase 2 - 5 日目において *ho15J* マウスは前日に呈した条件付け徐脈を翌日の最初の10試行で充進し、日内においては wild-type マウスの値に近づくという応答を示した[表 3-1, 図 3-6]。Extinction phase においては、*ho15J* マウスと wild-type マウスは獲得した条件付け徐脈を同様に消去した[図 3-7]。US-alone phase においては、無条件刺激としての電気刺激に対する心拍応答において、両群に有意な差は示されず[図 3-8]、Tail-flick test においても両群に有意な差は認められなかった[図 3-9]。これらの結果から、*ho15J* マウスは CS-US phase 1 日目において条件付け徐脈を獲得するが、CS-US phase 2 - 5 日目における条件付け徐脈において、異常な発現パターンを呈することが示された。

小脳のプルキンエ細胞は平行線維と登上線維から興奮性のシナプス入力を受けている(Ito, 2001)。平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧、長期増強はプルキンエ細胞における  $Ca^{2+}$  濃度に依存して生じることが示されている(Coesmans et al., 2004)。瞬目条件付け学習においては、条件刺激(CS)は苔状線維により小脳核と、小脳皮質顆粒細胞及び平行線維を介してプルキンエ細胞へと伝送し、また無条件刺激(US)は下オリーブ核を起始核とする登上線維がプルキンエ細胞に伝送することが示唆されている(Thompson and Steinmetz, 2009)。また、恐怖条件付け徐脈においても、下オリーブ核-登上線維からの小脳への入力が US の伝送の役割を担うことを第2章において示唆した。条件付け

徐脈の獲得中、プルキンエ細胞は、CS に対して simple spike を、US に対して complex spike を示すことが報告されている(Yoshida and Kondo, 2012)。*ho15J* マウスは、平行線維—プルキンエ細胞間におけるシナプスの減少や、登上線維によるプルキンエ細胞の多重支配を有している(Motohashi et al., 2007, Takeuchi et al., 2012)。しかし、条件付けの環境や CS としての音刺激に対して、*ho15J* マウスは wild-type マウスと同様に馴化したことが示された。これらのことから、GluD2 の変異は環境や条件刺激としての音刺激に対する心拍応答には影響しないことが示された。また US として用いた電気刺激に対して、さらに tail-flick test における痛み刺激への潜時にも GluD2 の変異は影響しないことが示された。これらの結果から、*ho15J* マウスにおいては GluD2 の変異による平行線維—プルキンエ細胞間シナプスの減少や、登上線維によるプルキンエ細胞への多重支配が残存するが、CS 及び US の各々に対する心拍応答には影響しないことが示唆された。

*ho15J* マウスは平行線維—プルキンエ細胞間のシナプス数が約 60 %減少しており(Takeuchi et al., 2012)、なおかつ学習の基礎過程と考えられている長期抑圧が障害されている(Motohashi et al., 2007)が、wild-type マウスと同様に CS-US phase 1 日目において条件付け徐脈の獲得を示した。これまで、GluD2 ノックアウトマウスにおいては、条件付け瞬目応答の獲得の障害が報告されていた(Kishimoto et al., 2001, Kakegawa et al., 2008)。しかし、これらの先行研究においては、瞬目応答の獲得は応答の発現率で評価されていた。このため、本研究においても CS-US phase 5 日間における条件付け徐脈応答の発現率を解析したところ、*ho15J* マウスは wild-type マウスと同様に条件付け徐脈を CS-US phase 5 日間全てにわたって、約 80 %近く呈していることが示された。すなわち条件付け徐脈の発現率からは *ho15J* マウスの条件付け徐脈が障害されていたとは言えない。*ho15J* マウスと同じ様な *hotfoot* マウスである *ho4J* マウスにおいて、恐怖条件付けのすくみ応答を調べると、野生型マウスと同様に条件付けすくみ応答の獲得が起こることが報告されている(Sacchetti et al., 2004)。本研究における条件付け徐脈の獲得が生じたこと、先行研究において条件付けすくみ応答の獲得が生じたことを合わせて考えると、

平行線維－プルキンエ細胞間におけるシナプス数の減少やプルキンエ細胞への登上線維の多重支配は恐怖条件付け応答の獲得に影響しないのかもしれない。これまで、小脳と学習に関しては長期抑圧が中心に調べられてきた。例えば、長期抑圧を障害した *mGluR1* ノックアウトマウスや *phospholipase Cb 4(PLCβ4)*変異マウスにおいて瞬目条件付け学習の獲得の障害が報告されてきた (Aiba et al., 1994, Miyata et al., 2001)。また *GluD2* ノックアウトマウスにおいても、条件付け瞬目応答の獲得の障害が報告されてきた(Kishimoto et al., 2001, Kakegawa et al., 2008)。一方、近年ではプルキンエ細胞における長期増強を障害した *PP2B* ノックアウトマウスにおいても瞬目条件付け学習の獲得や前庭動眼反射の適応が障害されていることが報告されている(Schonewille et al., 2010)。さらに、平行線維－プルキンエ細胞間の長期抑圧が障害されているが、長期増強を正常に生じるマウス(*PICK1* ノックアウトマウス、*GluR2 Δ7* ノックインマウス、*GluR2K882A* ノックインマウス)において、条件付け瞬目応答の獲得が生じることが示されている (Schonewille et al., 2011)。恐怖条件付けすくみ応答においては、条件付けすくみ応答獲得後、ラットの小脳虫部第 VI－VII 葉において、10 分後と 24 時間後双方の時間において長期増強が生じることが報告されている(Sacchetti et al., 2004)。本研究においては、*ho15J* マウスにおいて平行線維－プルキンエ細胞間における長期抑圧は障害されているが、残存する約 40 %の平行線維－プルキンエ細胞間のシナプスにおいて長期増強が生じ、恐怖条件付け徐脈の獲得が起こったのではないかと考えられる。また、長期抑圧が障害されている *ho15J* マウスにおいて条件付け徐脈の獲得が生じたことから、平行線維－プルキンエ細胞間における *GluD2* を介した長期抑圧は、条件付け徐脈の獲得に本質的ではないことが示唆された。

CS-US phase 2 - 5 日において、*ho15J* マウスは前日に呈した条件付け徐脈を翌日の最初の 10 試行で亢進し、日内においては *wild-type* の値に近づくという特徴的な応答を連続的に示した。成熟した野生型マウスの小脳クモ膜下腔に *GluD2* の阻害抗体を注入すると、*control* マウスと同様に回転棒課題において回転棒上を歩行できるようになる

が、薬効の切れる 24 時間後には control マウスよりも著しく成績の低下を示し、日内においては再び control マウスの成績に追いつくことが報告されている(Hirai et al., 2003)。また生後 11 日の未成熟な GluD2-null TgR/K マウス(グリア細胞から分泌される D-セリンの GluD2 における結合部位を欠損したマウス)において回転棒課題を行うと、前日に獲得したパフォーマンスが翌日には保持されないが、日内では成績が wild-type マウスの値に近づくことが、連続 5 日間示された(Kakegawa et al, 2011)。また、恐怖条件付けすくみ応答において、条件付けすくみ応答獲得の、10 分後と 24 時間後に再び音刺激を与えると、control マウスはすくみ応答を呈したのに対して、*ho4J* マウスは獲得した条件付けすくみ応答を示さなかった(Sacchetti et al, 2004)。これらの先行研究における結果は、本研究結果と類似しており、GluD2 が獲得したパフォーマンスや条件付け応答の保持に関与していることが考えられる。本研究結果は、条件付け徐脈が前日の最後の 10 試行から翌日の最初の 10 試行に亢進し、日内では wild-type マウスの値に近づくことが特徴的であった。このため先行研究の結果と比較すると、条件付け徐脈の保持そのものはできるが、wild-type マウスのように保持することができなかつたのではないかと考え、条件付け徐脈獲得以降の異常な変動パターンを示した CS-US phase 2 - 5 日を獲得した条件付け徐脈の保持相とした。

本研究においては、*ho15J* マウスは条件付け徐脈を獲得し、その保持相に異常はみられたが、Extinction phase においては、*ho15J* マウスと wild-type マウスの条件付け徐脈は同様に消去された。扁桃体の基底外側核においては、条件付けすくみ応答の獲得後には、長期増強が生じるが、条件付けすくみ応答の消去後には mGluR1 や N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA 受容体)に依存した脱増強が生じることが報告されている(Kim et al., 2007)。恐怖条件付け徐脈の獲得や保持に平行線維—プルキンエ細胞間の長期増強が関与するのであれば、脱増強が Extinction phase におけるメカニズムの一つの可能性として考えられる。

### 第3章の結論

第3章において *ho15J* マウスを用いて恐怖条件付け徐脈を調べた。GluD2 の自然発生変異を有する *ho15J* マウスは、CS-US phase 1 日目において条件付け徐脈を獲得し、獲得以降の保持相(CS-US phase 2-5 日)において *wild-type* マウスと異なる条件付け徐脈の変動パターンを示した。このため、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの減少し、長期抑圧を障害されていても、条件付け徐脈の獲得が生じることから、条件付け徐脈の獲得には平行線維-プルキンエ細胞間における GluD2 を介した長期抑圧が本質的ではないことが示唆された。GluD2 変異の影響は、条件付け徐脈の保持相において、前日の最後の10 試行における条件付け徐脈から翌日の最初の10 試行における条件付け徐脈において亢進され、日内においては *wild-type* マウスの値に近づくという現象を示した。このことから、*ho15J* マウスにおける小脳のプルキンエ細胞-平行線維間に選択的に発現する GluD2 の変異は、条件付け徐脈の保持相に関与することが示唆された。

## 第 4 章 小脳皮質へのグルタミン酸受容体阻害薬注入による条件付け徐脈への影響

### 4.1 諸言

第 3 章における実験において、平行線維—プルキンエ細胞間に選択的に発現する GluD2 の自然発生変異を有する *ho15J* マウスが、条件付け徐脈を獲得し、その一方で保持相(CS-US phase 2-5 日)においては条件付け徐脈の異常な変動パターンを示すことを見出した。*ho15J* マウスは生まれながらにして、GluD2 をコードする *grid2* 遺伝子に変異を有するが、その発育・発達において、小脳皮質の機能の障害を他の脳の領域が補償する方向で働いているのではないかと推測される。シナプス可塑性は小脳皮質の平行線維—プルキンエ細胞間以外にも生じており、実際に小脳以外の部位も恐怖条件付け学習に関与する(Gilmartin et al., 2014)。このため、*ho15J* マウスにおける条件付け徐脈の発現に小脳皮質以外の脳領域が関与していた可能性がある。そこで、*ho15J* マウスにおける条件付け徐脈の発現が小脳皮質に由来して生じたのか、あるいは小脳皮質以外の脳領域の関与の可能性のあるのかについて調べる必要があると考えた。

小脳皮質においてグルタミン酸は主要な興奮性の神経伝達物質であり、平行線維—プルキンエ細胞間と登上線維—プルキンエ細胞間における AMPAR はこのグルタミン酸と結合することにより、興奮性のシナプス伝達を担っている(Llano et al., 1991, Hartmann and Konnerth, 2005)。瞬目条件付け学習においては、条件刺激は苔状線維が小脳核と、小脳皮質顆粒細胞及び平行線維を介してプルキンエ細胞へと伝送し、また無条件刺激は登上線維が伝送することが考えられている(Thompson and Steinmetz, 2009)。さらに、ウサギに条件付け瞬目応答を獲得させた後、小脳皮質に AMPAR の阻害薬である CNQX を注入し、平行線維と登上線維からプルキンエ細胞への興奮性の入力を可逆的に不活化すると、獲得した条件付け瞬目応答の発現が一時的に阻害され、薬効が切れると、

再び条件付け瞬目応答を呈することが報告されている(Attwell et al., 1999)。これらの研究から、瞬目条件付け学習において、小脳皮質プルキンエ細胞への平行線維と登上線維による興奮性の入力条件付け瞬目応答の発現に必要なことが示されている。

第3章において見られた *ho15J* マウスにおける条件付け徐脈が、小脳皮質を介した応答なら、AMPA を可逆的に不活化し、小脳皮質内の興奮性シナプス伝達を阻害すれば、条件付け徐脈の発現が一時的に阻害されるが、薬効が切れると再び条件付け徐脈を呈するのではないかと考えた。そこで、wild-type マウスと *ho15J* マウスの CS-US phase 3 日目に AMPAR の可逆的な阻害薬である NBQX を注入し、小脳皮質内の興奮性シナプス伝達を可逆的に不活化する実験を行った。CS-US phase 3 日目に注入した理由は、*ho15J* マウスにおける条件付け徐脈への影響を注入の前後日を含む3日間において観察するためである。また、本研究で NBQX を用いたのは、CNQX より、AMPA への選択制が高いためである(Sheardown et al., 1990)。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 実験動物

本実験は東京大学動物実験倫理委員会によって承認され、東京大学動物実験実施マニュアルおよびNIH(National Institutes of Health)動物実験ガイドラインに従って行った。実験動物の使用数は必要最小限にとどめ、実験中は動物へのストレスや痛みが最小限になるように努めた。

*ho15J* ホモ変異体(n= 5, 8-10 週齢, オス)および比較対照群として正常野生型 C3H/HeJcl マウス(n= 13, 8-10 週齢, オス)を用いて行った。シングルケージにて飼育し、餌と水は24時間自由に摂取できるようにした。明暗サイクルは12時間(明期8 - 20時、暗期20 - 8時)に設定した。

### 4.2.2 心電図導出用電極埋め込み手術

マウスの心拍数を記録するために、心電図導出用の電極を作成し、外科的な手術を行い経日的に心拍数を記録できるよう、マウスの皮下に埋め込んだ。マウスを Isoflurane (Abbott Japan, Tokyo, Japan)で吸入麻酔し(導入時: 0.3%, 維持時: 0.15%)、脳定位固定装置 (Narishige, Tokyo, Japan)に設置した。マウスの頭頂部正中の頭皮を切開し、頭蓋を露出し、アース用ボルト電極を固定した。さらに心電図導出としてシリコンで被膜されたステンレススチールワイヤを胸部の皮下に留置した。心電図導出用の電極と頭蓋の接着部位を歯科用セメントで固定し、切開した頭皮を縫合、接着した。術後回復のため、脱水に注意しながらマウスの体温を維持した。マウスの術後の回復期間として2-3日を設けた。

### 4.2.3 実験装置

#### マウスの保定

実験は、防音遮光室 (196 × 84 × 86.5 cm; 高さ×縦×横) 内に 2 段組のラックを設置し、同時に 2 匹ずつ実験を行うことができるように設定した。マウスはアクリル製のホルダー内に拘束された。

#### 刺激装置

音刺激と電気刺激を時間的に組み合わせた刺激パラダイム作成のためにパルス発生器 (Master 8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel)にてプログラムを作成した。音刺激はパルス発生器からの 5 秒間の矩形波パルス出力をマルチシンセサイザ(1941-Wave-Factory, NF Corporation, Yokohama, Japan) により 2.5 kHz のサイン波に変換後、パワーアンプ (SRP-P150, SONY, Tokyo, Japan) で増幅し、スピーカーを通してマウスに呈示した。マウスに呈示する音刺激の大きさは騒音計 (SL-1250, CUSTOM, Ibaraki, Japan)を用いて、80 dB に調節した。尾部への電気刺激は電気刺激装置 (SEN-2201, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)にて 50 Hz、0.5 秒間、0.3 mA に設定し、マウスの尾部への刺激電極に接続した。

#### 心拍記録装置

マウスに埋め込んだ心電図導出用電極からの出力は入力ボックスを介して、電気生理学用実験アンプ(MEG-2100, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) で増幅した。アンプからの出力を 2 つに分け、一方をオシロスコープ (VC-6725, Hitachi, Tokyo, Japan) に入力してモニターし、もう一方は AD 変換ボード (MacLab 8s, AD Instruments, Dunedin, New Zealand) によって、サンプリング周波数 1kHz で試行ごとにコンピュータのハードディ

スクへ記録した。心電図の解析にはソフトウェア (LabChart software v.3.6.1/s AD Instruments, Dunedin, New Zealand) を用いた。

#### 4.2.4 恐怖条件付け手順

本研究における恐怖条件付けにおいて、条件刺激(conditioning stimulus: CS) として 2.5 kHz、80 dB、5 秒間の音刺激を用いた。また無条件刺激(unconditioned stimulus: US) として 50 Hz、0.3 mA、0.5 秒間の尾部への電気刺激を用いた。

① Habituation phase、② CS-alone phase、③ CS-US phase の順に実施した。各 phase は 1 日から 2 日のインターバルで行った。

##### ① Habituation phase

恐怖条件付け手順の最初の 2 日間は、防音遮光室内におけるアクリル製のホルダーによる拘束、尾部への電気刺激装着という環境に馴化させるために Habituation phase を行った。この phase においては CS や US はマウスに対して呈示しなかった。Habituation phase においては、心拍の記録は 90 秒毎に 10 秒間の記録を 50 回行い、その平均心拍数を安静時の心拍とした。

##### ② CS-alone phase

マウスを音刺激に馴化させるために、アクリル製のホルダーに拘束し、心拍数が安定した後 (2 分ごとに計 5 回心拍数を記録し、心拍数の変動が  $\pm 100$  bpm 以内の場合には安定とした)、1 日 50 試行を行った。試行間のインターバルは 180 秒で、この phase は 2 日間行った。

### ③ CS-US phase

マウスが実験環境と音刺激に馴化した後、CS-US phase を行った。マウスをアクリル製のホルダー内に拘束し、心拍数が安定した後（2分ごとに計5回心拍数を記録し、心拍数の変動が±100 bpm 以内の場合には安定とした）、1日50試行連続5日間行った。試行間のインターバルは180秒であった。

#### 4.2.5 条件付け徐脈の評価

マウスの心拍数は記録した心電図の連続したR波を指標として、R-R間隔をbeats/minに換算した。CSに対する心拍数の変化は、CS呈示直前の1秒間の心拍数(pre-CS baseline)と、CS5秒間を1秒間ずつに区分し、pre-CS baseline からの変化として評価した。US呈示後の心拍数変化は、US呈示の開始から1秒後の6秒間を1秒ずつに区分し、それぞれの区間の心拍数とpre-US baseline からの変化として評価した。US呈示後1秒間以降を評価した理由は、US呈示直後の1秒間は心電図に筋電図活動が混入するためR波の検出が不可能なためである。

#### 4.2.6 NBQX 注入

CS-US phase 3日目にAMPAの阻害薬であるNBQXをwild-typeマウス7匹と*ho15J*マウス5匹の小脳虫部IV-V葉に注入した。マウスの頭頂部正中の頭皮を切開し、頭蓋を露出させ、ラムダ縫合と正中線の交差が中心になるように円形のチャンバー(直径5mm)を頭蓋に歯科用セメントにて固定した。交差を中心にドリル(URAWA, Tokyo, Japan)でチャンバー内の頭蓋を削り、小脳の虫部IV-V葉を露出し、硬膜を取り除いた。

マイクロシリンジの針(31G)をマウスの小脳虫部 IV-V 葉の表面に留置し、NBQX 溶液 (100  $\mu$ M、0.5% pontamine sky blue)を注入速度 0.1  $\mu$ l/min で 5 $\mu$ l 注入した。NBQX 溶液注入後にチャンバーに蓋をし、頭皮を歯科用セメントに接着させ、頭蓋の露出部位を閉じた。同様の方法で wild-type マウス 6 匹には saline (5 $\mu$ l)を注入した。

#### 4.2.7 NBQX 注入部位の組織化学的解析

NBQX の注入部位および拡散状態を確認するために、注入後から約 15 分後にマウスに Urethane 麻酔を施し(250mg/ml, 0.2 ml)、最初に血液凝固防止剤を含んだ saline、次いで formalin 液(4 % paraformaldehyde in 0.1M Phosphate Buffer, pH 7.4)を用いて心臓経路で還流固定した。頭蓋より取り出した脳組織は、4 % paraformaldehyde in 0.1M Phosphate Buffer にて 24 時間後固定した。その後 1 日おきに 5 %、10 %、20 % の順に sucrose 置換を行った。

マイクロトーム(REM-700, Yamato Kohki Industrial, Saitama, Japan)を用いて、小脳の矢状断のマイクロスライス切片(50  $\mu$ m)を作成した。切片はエタノールを用いて脱脂(70%  $\rightarrow$  50%)を行った後、水洗し、neutral red 染色液にて染色し、水洗後、低濃度から高濃度のエタノール(50%  $\rightarrow$  70%  $\rightarrow$  80%  $\rightarrow$  90%  $\rightarrow$  100%  $\rightarrow$  100%)へと浸けていき、アルコール脱水を行った。その後、キシレンにて透徹し、封入剤にて封入した。光学顕微鏡(CX41, OLYMPUS, Tokyo, Japan)を用いて切片に残存する pontamine sky blue の粒子を確認した。

#### 4.2.8 回転棒課題

マウスを着地面から 180 mm 上方の回転する棒の上を歩かせ、棒から落下するまでの滞在時間を測定した。回転速度は 8 rpm で、カットオフタイムを 120 秒に設定し、

10 試行を行った。回転棒課題を行う前に、静止した状態の棒に 120 秒間乗せ、回転棒課題の装置に馴化させた。これを static rod という。回転棒課題は、NBQX を注入した wild-type マウスと saline を注入した wild-type マウスにおいて、CS-alone phase の 2 日目(回転棒課題の学習日)、CS-US phase の 2 日目(NBQX 注入前日)、CS-US phase の 3 日目(NBQX 注入日)、CS-US phase 4 日目(NBQX 注入翌日)に行った。CS-US phase 2 日目のみ、5 試行で行った。

#### 4.2.9 統計的解析

各項目の解析結果は平均値±標準誤差(SEM)で示した。統計処理には統計解析ソフトウェア SPSS version 16.0(SPSS Japan. Inc., Tokyo, Japan)を用いた。解析によって求められた平均値の差は、Levene 検定において等分散性が認められた場合は Student-*t* 検定を、等分散性が認められなかった場合は Welch 検定を行った(図 4-1, 4-2)。マウス要因×試行要因を独立変数とする繰り返しのない 2 要因の分散分析を行い、post hoc test として Tukey HSD を行った(図 4-3)。有意水準は 5%未満とした。

## 4.3 結果

### 4.3.1 NBQX 注入による条件付け徐脈への影響

CS-US phase 3 日目にマウスの小脳皮質に NBQX を注入し、条件付け徐脈への影響を確認した。音刺激 5 秒間のうち、最後の 5 秒目を 50 試行平均して日ごと (CS-US phase 2、3、4 日) に示した。CS-US phase 2 日目 (注入日前日) において、wild-type (saline) と wild-type (NBQX) マウスは両群ともに同様に条件付け徐脈を呈した [wild-type (saline):  $-66 \pm 11$  beats/min, wild-type (NBQX):  $-69 \pm 10$  beats/min,  $t(11) = -0.195$ ,  $p = 0.848$ ]。 *ho15J* (NBQX) マウスにおいても、wild-type (NBQX) マウスと同様に条件付け徐脈を呈した [wild-type (NBQX):  $-69 \pm 10$  beats/min, *ho15J* (NBQX):  $-89 \pm 8$  beats/min,  $t(10) = 1.474$ ,  $p = 0.171$ ]。 NBQX を注入した CS-US phase 3 日目においては、wild-type (saline) マウスの条件付け徐脈に比べて wild-type (NBQX) マウスの条件付け徐脈は有意に減弱を示した [wild-type (saline):  $-24 \pm 10$  beats/min, wild-type (NBQX):  $-87 \pm 8$  beats/min,  $t(11) = 4.808$ ,  $p = 0.0005$ ]。 また *ho15J* マウスにおける条件付け徐脈は wild-type (NBQX) の条件付け徐脈と差はなかった [wild-type (NBQX):  $-87 \pm 8$  beats/min, *ho15J* (NBQX):  $-48 \pm 9$  beats/min,  $t(10) = 1.888$ ,  $p = 0.088$ ]。 CS-US phase 4 日目においては、wild-type (saline) と wild-type (NBQX) マウスは両群ともに同様に条件付け徐脈を呈した [wild-type (saline):  $-101 \pm 10$  beats/min, wild-type (NBQX):  $-73 \pm 11$  beats/min,  $t(11) = 1.798$ ,  $p = 0.099$ ]。 *ho15J* マウスにおいても、wild-type (NBQX) マウスの条件付け徐脈と有意な差はなかった [wild-type (NBQX):  $-73 \pm 11$  beats/min, *ho15J* (NBQX):  $-48 \pm 9$  beats/min,  $t(10) = 1.988$ ,  $p = 0.074$ ]。

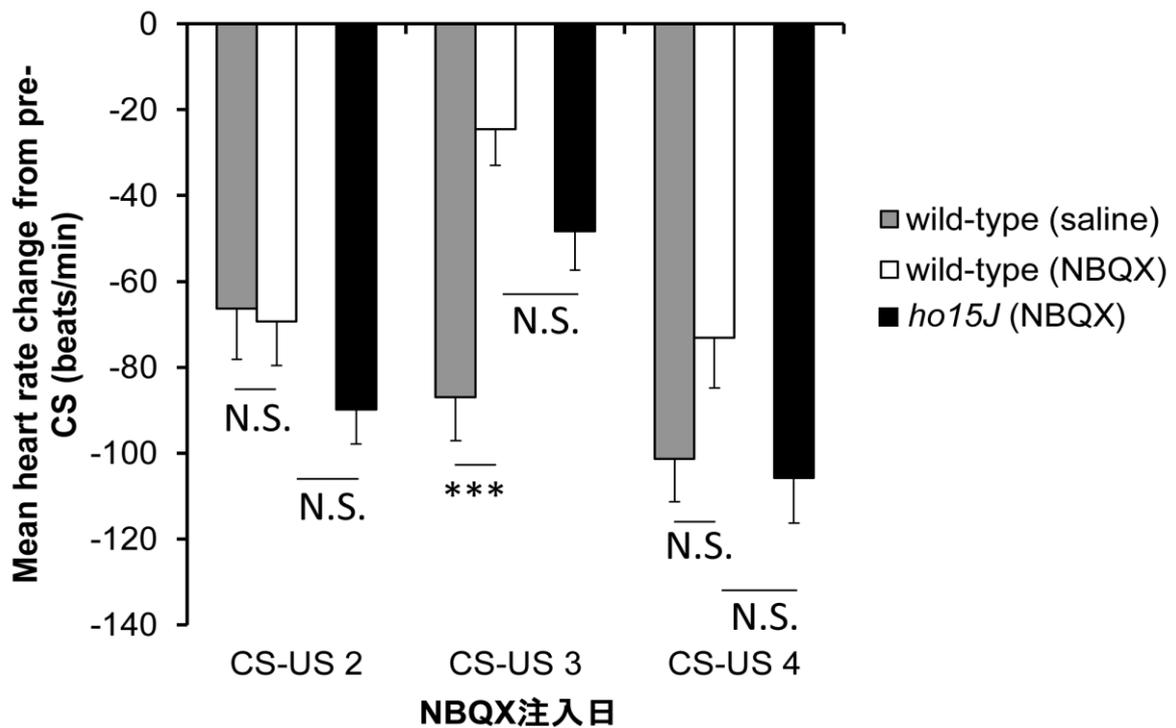


図 4-1. CS-US phase 2, 3, 4 日目における条件付け徐脈

図中の0のライン(pre-CS baseline)はCS呈示前の平均心拍数を表す。CS-US phase 3 日目は NBQX 注入日である。注入日前 (CS-US 2)、注入日(CS-US 3)、注入日後(CS-US 4)における音刺激 5 秒間の 5 秒目の条件付け徐脈の値を示した。図中の各バーは平均値±SEM を示す。 \*\*\* $p < 0.001$

#### 4.3.2 NBQX 注入による条件付け徐脈発現率への影響

NBQX 注入日前日(CS-US phase 2 日目)、当日(CS-US phase 3 日目)、翌日(CS-US phase 4 日目)における条件付け徐脈の発現率を示した。CS-US phase 2 日目において、wild-type (saline)マウスと wild-type (NBQX)マウスは同様の条件付け徐脈の発現率を示した[wild-type (saline):  $85 \pm 6$  %, wild-type (NBQX):  $85 \pm 5$  %,  $t(11) = -0.058$ ,  $p = 0.954$ ]。ho15J (NBQX)マウスも、wild-type (NBQX)マウスと同様に条件付け徐脈の発現率を呈した[wild-type (NBQX):  $85 \pm 5$  %, ho15J (NBQX):  $78 \pm 3$  %,  $t(10) = 0.794$ ,  $p = 0.445$ ]。NBQX を注入した CS-US phase 3 日目においては、wild-type (saline)マウスの条件付け徐脈の発現率に比べて wild-type (NBQX)マウスの条件付け徐脈は有意に低下した[wild-type (saline):  $91 \pm 3$  %, wild-type (NBQX):  $37 \pm 6$  %,  $t(11) = -7.304$ ,  $p < 0.0001$ ]。また ho15J (NBQX)マウスにおける条件付け徐脈の発現率は wild-type (NBQX)マウスの値と有意な差は認められなかった[wild-type (NBQX):  $37 \pm 6$  %, ho15J (NBQX):  $52 \pm 7$  %,  $t(10) = 0.07$ ,  $p = 0.151$ ]。CS-US phase 4 日目においては、wild-type (saline)と wild-type (NBQX)マウスは両群ともに同様の条件付け徐脈の発現率を呈した[wild-type (saline):  $95 \pm 2$  %, wild-type (NBQX):  $86 \pm 6$  %,  $t(8) = -1.106$ ,  $p = 0.300$ ]。ho15J マウスにおいても、wild-type(NBQX)と同様の条件付け徐脈の発現率を呈した[wild-type (NBQX):  $86 \pm 6$  %, ho15J (NBQX):  $79 \pm 5$  %,  $t(10) = 0.778$ ,  $p = 0.454$ ]。

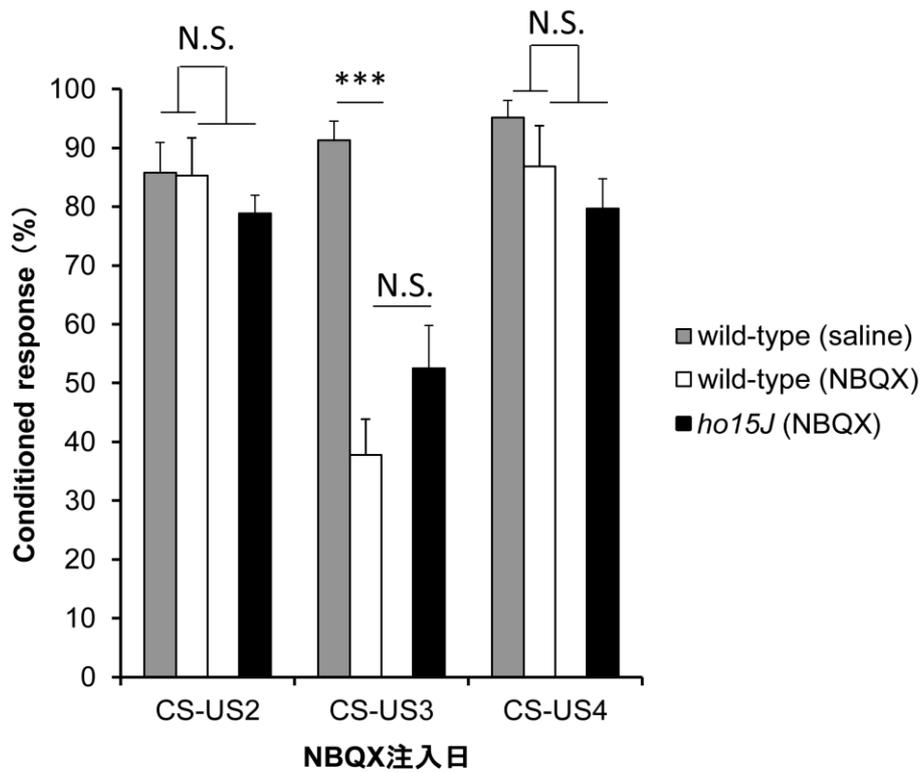


図 4-2. CS-US phase 2, 3, 4 日目における条件付け徐脈の発現率

NBQX 注入日前(CS-US 2)、当日(CS-US 3)、後日(CS-US 4)における条件付け徐脈の発現率を示した。CS-US phase 3 日目は NBQX 注入日である。図中の各バーは平均値±SEM を示す。

\*\*\* $p < 0.001$

#### 4.3.3 NBQX 注入による回転棒課題への影響

NBQX 注入の影響を回転棒課題にて確認した。各 phase の最初の値は回転しない棒上に 120 秒間安定して乗れるかを示す。CS-alone2 日目において両群は同様に回転棒上で 120 秒間歩行を呈するようになった[mouse×trial interaction,  $F(9,63) = 1.335$ ,  $p = 0.237$ ]。注入日前日の CS-US2 日目においては、両群ともに回転棒上を 120 秒歩行することを示した。しかし投与日においては、wild-type (saline)マウスが回転しない棒上に 120 秒間歩行することができたのに対して wild-type (NBQX)マウスの棒上における時間は約 40 秒であった。wild-type (NBQX)マウスは wild-type (saline)マウスに対して、回転しない棒上に乗る時間において有意に低下を示した[ $t(5) = -3.132$ ,  $p = 0.026$ ]。さらに、wild-type (saline)マウスが 10 試行中全ての試行で 120 秒歩行できたのに対して、wild-type (NBQX)マウスは有意に成績の低下を示した[mouse,  $F(1,7) = 6.912$ ,  $p = 0.034$ , static rod  $t(5) = -3.132$ ,  $p = 0.026$ ]。注入日翌日(CS-US4 日目)においては、両群ともに回転棒上を 120 秒間歩行することが示された。

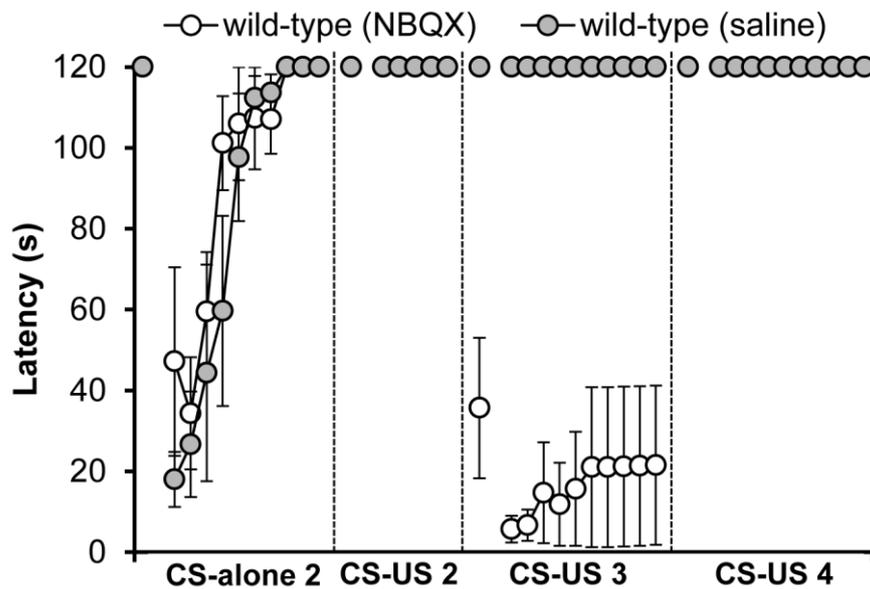


図 4-3. CS-alone 2 日目と CS-US phase 2, 3, 4 日目における回転棒課題の成績

wild-type (saline)マウスと wild-type (NBQX)マウスにおける回転棒課題の成績を示した。CS-US phase 2 日目のみ 5 試行行った。各日の最初のプロットは static rod を表している。

各プロットは平均値±SEM を示す。

#### 4.3.4 NBQX 注入による薬液拡散の組織化学的解析

NBQX 溶液に pontamine sky blue を溶解し、注入液の拡散を組織化学的に確認した。マウスの矢状断面において虫部の小脳皮質 II-V 葉に溶液が残存していることを確認した。

## 4.4 考察

第4章においては、第3章にて示された *ho15J* マウスの条件付け徐脈が小脳皮質を介して生じたのかについて調べるために、*ho15J* マウスと *wild-type* マウスの小脳皮質の AMPAR を可逆的に阻害した。AMPA を可逆的に不活化する NBQX を CS-US phase 3 日目に注入すると *ho15J* (NBQX) マウスは *wild-type* (NBQX) マウスと同様に条件付け徐脈の減弱を示し、翌日には条件付け徐脈を示した[図 4-1]。各マウスにおける条件付け徐脈の発現率を解析したところ、*ho15J* (NBQX) マウスと *wild-type* (NBQX) マウスの条件付け徐脈の発現率は、NBQX 注入日のみ低下した[図 4-2]。薬効について回転棒課題において確認したところ *wild-type* (*sakine*) マウスは、注入日前日、当日、翌日に安定して回転棒上を歩行できたが *wild-type* (NBQX) マウスは注入日当日のみ回転棒上を歩く時間が減少した[図 4-3]。さらに注入した NBQX 溶液の拡散を確認したところ、小脳皮質の前葉(II-V 葉)に拡散していることを確認した。これらの結果から、*ho15J* マウスは *wild-type* マウスと同様に、NBQX 注入日のみ条件付け徐脈を減弱し、その発現率の低下を示した。

*wild-type* マウスの海馬を傷害しても条件付け瞬目応答の獲得は影響されないが、GluD2 ノックアウトマウスで海馬を傷害すると、瞬目条件付け学習の減弱が生じた (Takatsuki et al., 2003)。また、海馬における N-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDAR) を MK801 にて阻害すると、*wild-type* マウスの条件付け瞬目応答の獲得は影響されないが、GluD2 ノックアウトマウスにおいては、瞬目条件付け学習の減弱が生じた (Kato et al., 2005)。このため、GluD2 ノックアウトマウスにおいては、小脳が中心的な役割を担う瞬目条件付け学習において、海馬による代償の影響があることが示唆されている。また恐怖条件付け学習(すくみ応答を指標にしたもの)においては、予め扁桃体の外側核に GABA のアゴニストである muscimol を投与すると、条件付けすくみ応答獲得後の小脳における長期増強は障害されることが示されている (Zhu et al., 2011)。これらの研究から、

*ho15J* マウスにおいても、小脳以外の部位による代償作用によって、条件付け徐脈の獲得及び発現が生じた可能性が考えられた。しかしながら、本研究において、小脳皮質の AMPAR を可逆的に阻害すると、条件付け徐脈の発現が一時的に減弱し、再び応答を呈することが示された。先行研究においては、ウサギに条件付け瞬目応答を獲得させた後、小脳皮質に AMPAR の阻害薬である CNQX を注入し、小脳皮質への興奮性の入力を可逆的に不活化すると、獲得した条件付け瞬目応答の発現が一時的に阻害され、薬効が切れると、再び条件付け瞬目応答を呈することが報告されている (Attwell et al., 1999)。これらのことから、本研究においても、*ho15J* マウスの条件付け徐脈応答は小脳皮質を介して、生じていたことが示された。なおかつ小脳矢状断面において NBQX 溶液は、小脳皮質の前葉に拡散していた。小脳の後葉第 9 葉を障害しても、条件付け徐脈の獲得に影響はないが (Bradley et al., 1991)、前葉の障害は条件付け徐脈の獲得及び発現が障害されることが報告されている (Supple and Kapp, 1993)。本研究で用いた pontamine sky blue は、NBQX 溶液に溶解し、拡散の領域を確認するのに用いられてきた (Guo et al., 2009, Fu et al., 2012)。分子量としては pontamine sky blue が 992.79 MW、NBQX が 336.28 MW であり、NBQX は pontamine sky blue の残存より拡散していた可能性が考えられる。

これらの結果から、NBQX が可逆的に小脳の AMPAR を阻害したこと、なおかつ、*ho15J* マウスにおける条件付け徐脈は、wild-type マウスと同様に小脳皮質を介した応答であることが示された。これらのことから *ho15J* マウスは保持相において wild-type マウスと異なる変動パターンを呈していたが、*ho15J* マウスにおける異常な条件付け徐脈は小脳皮質内の神経回路に原因があることが考えられる。

## 第4章の結論

第4章において、CS-US phase 3 日目にマウスにNBQXを注入して、小脳皮質への興奮性シナプス入力を可逆的に阻害した。*ho15J* (NBQX)マウスと *wild-type* (NBQX)マウスの双方において、NBQX 注入日のみ条件付け徐脈が減弱し、条件付け徐脈の発現率が低下した。このことから、*ho15J* マウスの条件付け徐脈は、*wild-type* マウスと同様に、小脳皮質を介して生じることが示された。このため、第3章において見られた保持相における *ho15J* マウスの条件付け徐脈の異常な変動パターンは小脳皮質を介して生じることが示唆された。

## 第5章 総合論議

本研究は、恐怖条件付け徐脈における小脳皮質神経回路の役割を調べるために、登上線維の起始核である延髄の下オリーブ核を薬理的に破壊し、下オリーブ核ー登上線維の小脳への入力の影響を調べた。また、小脳の平行線維ープルキンエ細胞間に選択的に存在する GluD2 の変異を生来から有する *ho15J* マウスを用いて、恐怖条件付け徐脈における平行線維ープルキンエ細胞間シナプスの減少とプルキンエ細胞への登上線維の多重支配、平行線維ープルキンエ細胞間における長期抑圧の障害による影響を調べた。さらに、*ho15J* マウスにおける条件付け徐脈が小脳皮質を介して生じたのかを調べるために、小脳皮質に AMPAR の可逆的な阻害薬を注入し、条件付け徐脈における影響を調べた。

第2章では、下オリーブ核の薬理的破壊による恐怖条件付け徐脈における影響を調べた。3-AP を処置されたマウスは control マウスに比べて、下オリーブ核の細胞数が減少し、回転棒上を歩行する時間が減少した。下オリーブ核破壊を行ったマウスは条件付けの環境や音刺激に馴化し、control マウスと同様の心拍応答を示したが、音刺激と電気刺激を組み合わせた条件付け(CS-US)においては、条件付け徐脈の獲得及び発現が障害された。また tail-flick test における潜時においては差が見られなかったが、条件付け時に用いた電気刺激に対する頻脈応答においては、control マウスと比べて下オリーブ核破壊を行ったマウスが頻脈応答の減弱を示した。

第3章では、小脳の平行線維ープルキンエ細胞間に選択的に発現する GluD2 を生来から変異している *ho15J* マウスを用いて、GluD2 変異による恐怖条件付け徐脈への影響を調べた。*ho15J* マウスは wild-type マウスと同様に条件付けの環境や音刺激に馴化を示した。さらに、*ho15J* マウスは wild-type マウスと同様に条件付け徐脈の獲得を示した。条件付け徐脈獲得以降も同様の音刺激と電気刺激を与えると条件付け徐脈は翌日の最初の10試行において亢進され、日内においては wild-type マウスの値に近づくことが

連続 4 日間見られた。このことから GluD2 の変異は条件付け徐脈の獲得には関与しないが、獲得した条件付け徐脈の保持相に影響することが示された。条件付け徐脈の消去においては両群ともに有意な差はみられなかった。また US-alone と tail-flick test においても有意な差は認められなかった。

第 4 章においては、*ho15J* マウスが生来から GluD2 を変異しているため、発達に伴う代償作用の影響を考慮し、条件付け徐脈が小脳皮質に由来するのかを調べるために、AMPA の阻害薬である NBQX を *ho15J* マウスと *wild-type* マウスの小脳皮質に注入した。*ho15J* マウスと *wild-type* マウス双方の条件付け徐脈の発現が注入日においてのみ減弱し、注入日翌日には注入日前日と同様に条件付け徐脈を呈した。このことから、条件付け徐脈は *ho15J* マウスにおいても、*wild-type* マウスと同様に小脳皮質を介して生じていることが考えられ、保持相において見られた条件付け徐脈の異常な変動パターンは小脳皮質に由来することが示された。

## 5.1 条件付け徐脈における小脳皮質神経回路

これまで、小脳は運動の制御や学習について詳細に調べられてきたが、小脳虫部を破壊されたラットはネコに近づくなど情動に関する応答に異常が見られることも報告されてきた(Supple et al., 1987)。また小脳虫部前葉の電気刺激により、腎交感神経系の活動が減少することや(Nisimaru et al., 1984)、麻酔下で小脳虫部後葉に、電気刺激を行うと、動脈圧の減少や、腎交感神経活動の一時的な抑制、大腿動脈のコンダクタンスの増加を示すことが示されていた(Bradley et al., 1987)。このため、小脳は情動の表出に伴う自律神経系応答に関与するのではないかと考えられた。さらに、恐怖条件付けすくみ応答においては、小脳虫部にテトロドトキシンを用いて電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルを可逆的に阻害すると、条件付けすくみ応答の保持に関与することが報告されていた(Sacchetti et al., 2002)。小脳の心拍数の制御に関しては、恐怖条件付け徐脈を用いて、小脳虫部の条件付け徐脈への獲得や発現、保持への関与が破壊実験を用いて調べられてきた(Supple et

al., 1990, 1993, Bradley et al., 1991)。これまで条件付け瞬目学習についての小脳皮質神経回路の役割は検討されてきたが、恐怖条件付け徐脈においては、小脳虫部の破壊実験や刺激実験に留まっていた。本博士論文の第2章、第3章、第4章より、小脳への下オリーブ核-登上線維系の入力恐怖条件付け徐脈において、無条件刺激(US)を伝送し、条件付け徐脈の獲得及び発現に必要であること、小脳の平行線維-プルキンエ細胞間に選択的に発現する *GluD2* の変異が保持相に関与することが示された。これらは、破壊や刺激実験を用いて条件付け徐脈への小脳の関与を示してきた先行研究を支持し、なおかつ、恐怖条件付け徐脈において、小脳皮質神経回路が重要なことを示した。

#### 5.1.1 恐怖条件付け徐脈において徐脈応答が生じるメカニズム

瞬目条件付け学習においては、苔上線維が小脳核へ、また平行線維を介して小脳皮質へCSを、登上線維がUSを小脳へ伝送することが考えられ(Thompson and Steinmetz, 2009)、近年の研究から条件付け徐脈において、プルキンエ細胞がCSに対して、*simple spike*を、USに対して*complex spike*を生じることが報告されてきた(Yoshida and Kondo, 2012)。本研究における恐怖条件付け徐脈においても、下オリーブ核-登上線維から小脳への入力はUSを伝送し、条件付け徐脈の獲得及び発現に必要であることが示された。USに対する頻脈応答が減弱されたため、下オリーブ核-登上線維からの小脳核と小脳皮質プルキンエ細胞への入力が頻脈応答に関与していることが考えられた。下オリーブ核-登上線維は小脳核へ直接投射する経路と、プルキンエ細胞-小脳核の経路が存在する(図5)。先行研究より、中位核や歯状核の電気刺激では、自律神経系応答は生じないが、虫部から投射される室頂核においては電気刺激により、心拍数が増加することが報告されている(Acchari and Downman, 1986)。このため、USに対する頻脈応答を発現するには、室頂核の活動が増加していることが考えられる。頻脈応答を生じるには、2つの経路が考えられる。一つは、下オリーブ核-小脳核、もう一つは、下オリーブ核-プルキンエ細胞-小脳核である。下オリーブ核-小脳核の経路においては、USによって

下オリーブ核の活動が増加し、興奮性に結合する小脳核の活動を増加させることが考えられる。また下オリーブ核－プルキンエ細胞－小脳核における経路においては、US によって下オリーブ核の活動が増加すると、プルキンエ細胞において CS によって生じる **simple spike** の活動を抑制し、プルキンエ細胞の活動を減少させる。その結果としてプルキンエ細胞からの抑制性の出力が減少し、小脳核の活動が増加することが考えられる。このように頻脈応答の発現に室頂核の増加が必要なら、CS-US において、CS に対して条件付け徐脈を呈するには、室頂核の活動が減少することが考えられる。このため、条件付け徐脈を生じるためには、条件刺激中(音刺激呈示中)、プルキンエ細胞の活動が増加し、室頂核への抑制性の出力が増加することで、小脳核の活動を減少させることが考えられる。恐怖条件付け徐脈においては、プルキンエ細胞の活動を増加させるメカニズムとして、平行線維－プルキンエ細胞間において、長期増強が生じているのではないかと考えられる。

#### 5.1.2 平行線維－プルキンエ細胞間シナプス

条件付け学習は、CS と US の連合を学習し、CS に対する条件付け応答を呈する。繰り返し呈示される CS と US の学習には、平行線維－プルキンエ細胞間のシナプス可塑性である長期抑圧、長期増強が重要なことが考えられている。これまで、小脳の学習に関する平行線維－プルキンエ細胞間のシナプス可塑性においては長期抑圧が中心に調べられており、GluD2 ノックアウトマウスにおいても、条件付け瞬目応答が障害されていることが示されていた(Kishimoto et al., 2001)。しかし、第3章において、平行線維－プルキンエ細胞間における長期抑圧を障害している *ho15J* マウスに関しては、条件付け徐脈は CS-US phase 1 日目において wild-type マウスと同様に獲得された。さらに、条件付け徐脈の応答率を解析しても、*ho15J* マウスは wild-type マウスと同様に約 80 % の応答率を CS-US phase において示していた。長期抑圧では、平行線維からプルキンエ細胞への入力(**simple spike**)が、登上線維からのプルキンエ細胞への入力(**complex spike**)に

よって抑圧されるため、プルキンエ細胞の活動は減少してしまい、抑制性の出力が減少することで、小脳核の活動が増加する。このため、長期抑圧は条件付け徐脈を呈するメカニズムとしては考えにくい。なおかつ、第3章、第4章において用いた *ho15J* マウスは平行線維－プルキンエ細胞間における長期抑圧が障害されている(Motohashi et al., 2007)。このため、第2章と第3章、第4章の結果を統合して考えると、条件付け徐脈が生じるためには、平行線維－プルキンエ細胞間における長期増強が必要だと考えられる。

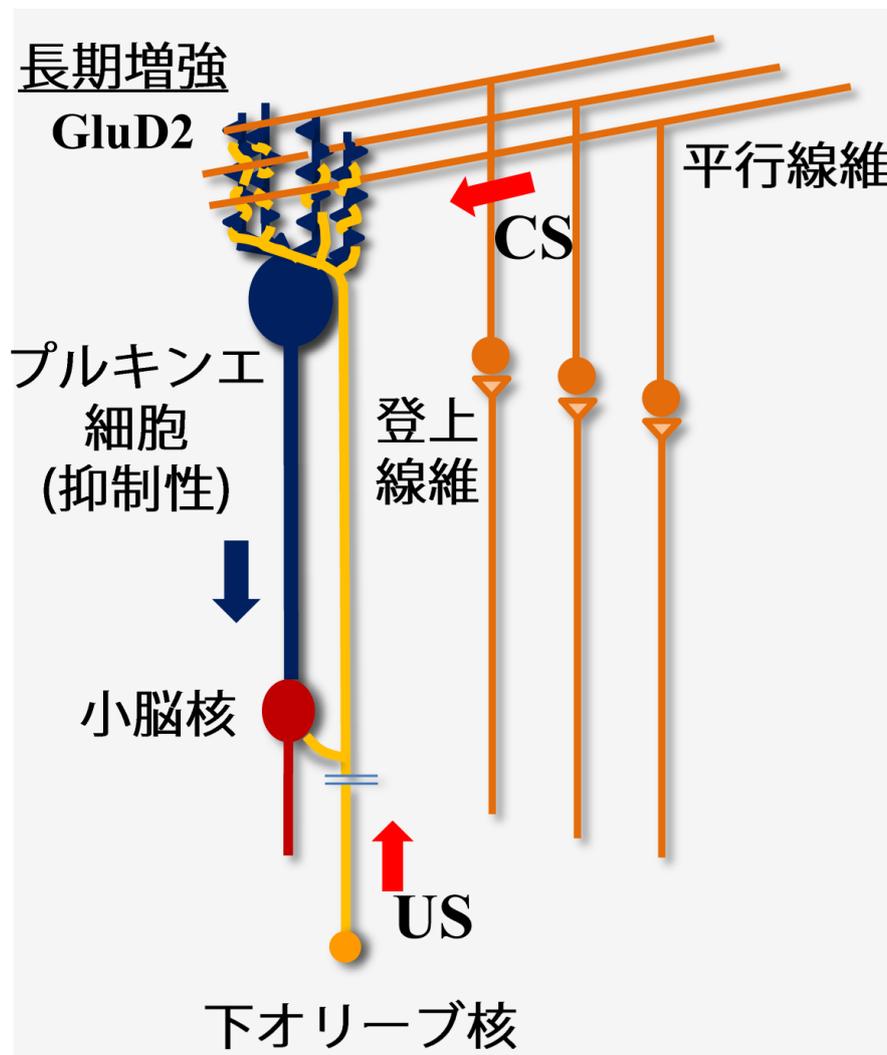


図5 条件付け徐脈における小脳皮質神経回路の概念図

## 5.2 自律神経系制御に対する小脳以外の脳領域の関与について

自律神経を制御する中枢神経系においては、てんかんや筋委縮性側索硬化症などの中中枢神経疾患の臨床報告より前頭前野、島皮質、扁桃体、視床下部、中脳水道灰白質、脚傍核、孤束核、延髄の腹外側野から構成される中枢自律神経線維網が交感神経及び副交感神経の出力を調整しているという考えが提案されている(Benarroch, 1993)。身体的ストレスと心理的なストレスによって中枢自律神経線維網において賦活される部位が異なることから、これらの線維網の反応様式がストレスによって異なることが示されている(McDougall, 2005)。また、覚醒しているラットの扁桃体の中心核に電気刺激を行うと、心拍数の増加を引き起こすことが報告されている(Iwata et al., 1987)。さらに、海馬への電気刺激やグルタミン酸の注入によって、心拍数や血圧の減少が見られることが、覚醒下のラットにおいて報告されている(Ruit and Neafsey, 1988)。これらの研究は中枢神経系の中でも、特に辺縁系に区分される部位が自律神経系の制御に関与していることを示している。

恐怖条件付け徐脈においては扁桃体の中心核の傷害により、条件付け徐脈の獲得が障害されることが報告されている(Kapp et al., 1979, McCabe et al., 1992)。扁桃体と小脳は解剖学的に、脚傍核や視床下部から求心性の投射を受けている(Cavdar et al., 2001)。小脳虫部が投射する小脳核の一つである室頂核は、扁桃体の中心核に連絡する脚傍核に線維連絡がある(Supple and Kapp, 1994)。また、恐怖条件付けすくみ応答獲得後に、扁桃体の外側基底核を可逆的に障害すると、小脳における長期増強が障害されることが報告されている(Zhu et al., 2011)。これらの報告から、扁桃体と小脳は解剖学的に間接的に線維連絡を有し、条件付け応答の産出に寄与していることが示されている。本研究においては、条件付け徐脈における小脳皮質神経回路の役割を調べたが、この成果から、恐怖条件付け徐脈に関与する扁桃体などの中中枢神経系の役割も解明していくことに貢献できると考えている。さらに、小脳の虫部は身体運動において姿勢や歩行に伴う骨格筋活動の制御に重要であり、心拍数の制御に関与することが示されている。これらの小脳の

機能を考慮すると、本研究は筋骨格系のみならず、運動に応じて自律神経系を並列的に調節する、小脳の統合的な役割の解明を行うための基礎的な知見となると期待される。

### 5.3 本研究の展望

日常生活や運動場面におけるパフォーマンスの発揮は、緊張や不安など自身の心理的状況や情動によって影響を受ける。緊張や不安を生じると、身体には自律神経系に関連した応答(発汗や心拍数の増加・減少など)が生じる。本論文は、恐怖条件付け徐脈を用いて、状況に依存した心拍数の制御における小脳皮質神経回路の役割について調べた。本論文の第3章、4章において用いた *ho15J* マウスは *GluD2* の変異を生来から有するが、*GluD2* をコードする *GRID2* 遺伝子の欠失変異がヒトのゲノム解析から報告されている(Hills et al., 2013, Maier et al., 2014)。これらの患者においては、小脳性の運動失調、粗大な運動スキルの遅延、身体発達の遅延、自発性眼振、また言語発達の障害を示す。さらに小児発達障害の一つである自閉症スペクトラム障害を有する患者の研究から *GRID2* 遺伝子が存在する 4q22.2 染色体においてコピー数の異常が見つけられている(He et al., 2012)。また *GluD2* と相同性の高い  $\delta 1$  glutamate receptor (*GluD1*)は精神疾患との関連が報告されていたが(Fallin et al., 2005)、*GluD1* ノックアウトマウスにおいては社会性行動の減少や情動に関連した行動の減弱を示す(Yadav et al., 2012)。これらの研究から、小脳における異常は運動機能のみならず、言語や情動の障害、精神疾患の病態の一つであることが示されてきた。

精神疾患の一つである自閉症においては、心拍数の増加と常同行動の発現が関連することが報告されている(武島, 1998)。また自閉症スペクトラム障害を有する児童においては、健常児に比べ副交感神経の活動レベルの減少が見られることも報告されている(Ming et al., 2005)。さらに、日常生活に関する視覚や聴覚刺激に対する心拍反応は健常児と比べ応答が遅いが(Palkovitz et al., 1980)、闘争か逃走を要する刺激に対しては、過度な応答を示すことが報告されている(Hirstein et al., 2001)。しかし、自閉症における自

自律神経系異常についての病態メカニズムや治療法については明らかになっていない。近年、結節性硬化症を発症している患者は自閉症スペクトラム障害を発症する確率が高いことが知られているが、結節性硬化症発症の原因遺伝子である *Tuberous sclerosis complex 1 (TSC1)* の小脳特異的なコンディショナルノックアウトマウスにおいて、社会性行動の減少や常同行動の指標である毛づくろいの増加が報告されている (Tsai et al., 2012)。このマウスを用いて、本研究で用いた恐怖条件付け徐脈を行えば、自閉症における自律神経系の病態メカニズムを調べる一つの戦略になると考えている。さらに、*Tsc1*<sup>+/c</sup>マウスにおいては、mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤である rapamycin 投与によって mTOR シグナル系の亢進を抑制することで自閉症様行動(社会性行動)の改善が示されている (Sato et al., 2012)。このため、薬物投与によって小脳が関与する状況依存的な心拍数の異常が改善されるのかも調べていく必要がある。今後は様々な病態モデルマウスなどを用いて、恐怖条件付け徐脈課題を行えば、状況依存的な心拍数制御における異常を検出し、病態解明や心拍数制御における薬物療法のための基礎的な知見を得ることに貢献できる可能性があると考えている。

#### 5.4 本研究の今後の研究課題

第2章においては、小脳虫部が投射し、自律神経系応答に関与することが示されている室頂核が、恐怖条件付け徐脈において、どのように関与するのかを調べる必要がある。また、第3章、第4章においては、*ho15J* マウスにおける平行線維-プルキンエ細胞間において長期増強が生じるのかを電気生理学的手法を用いて、確かめる必要がある。さらに、これまでの瞬目条件付け学習などの研究に使われてきた *GluD2* ノックアウトマウス、*Cbln1* ノックアウトマウスでも恐怖条件付け徐脈を調べ、本研究結果と比較する必要がある。また、恐怖条件付け徐脈における *GluD2* のより特異的な働きを明確にするためには *GluD2* の阻害抗体を使い、平行線維や登上線維における発達障害を除き、その機能のみを阻害する必要があると考えている。

## 5.5 本博士論文の研究の結論

これまで恐怖条件付け徐脈における小脳の関与を調べた研究は、小脳の局所的な破壊や刺激実験に留まり、小脳皮質神経回路の役割については調べられていなかった。本研究は、小脳皮質プルキンエ細胞に対する下オリーブ核-登上線維系と、さらに顆粒細胞-平行線維系のシナプス伝達及びそれらが担うシナプス伝達の可塑性に着目し、恐怖条件付け徐脈における小脳皮質神経回路の役割を詳細に調べた。第2章より、恐怖条件付け徐脈において下オリーブ核-登上線維は小脳へ無条件刺激を伝送する役割を担うことが示唆された。また、下オリーブ核-登上線維からの小脳への入力は、条件付け徐脈の獲得及び発現に必要であることが示された。第3章より、恐怖条件付け徐脈において小脳のプルキンエ細胞-平行線維間に選択的に発現する *GluD2* の変異は *CS* 及び *US* の各々に対する心拍応答には影響しないことが示され、*GluD2* を介した平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧は条件付け徐脈の獲得には本質的ではないことが示唆された。また *GluD2* の変異は条件付け徐脈の獲得以降の条件付け徐脈の保持相に影響することが示された。さらに第4章より、*GluD2* の自然発生変異を有する *ho15J* マウスにおける条件付け徐脈の保持相の異常な変動パターンは小脳皮質を介して生じることが示された。

以上のことから、本研究より小脳皮質神経回路が恐怖条件付け徐脈における心拍数の適応的な制御に関与することが明らかになった。

## 参考文献

### [A]

Achari NK, Downman CB. Autonomic effector responses to stimulation of nucleus fastigius. *J Physiol* 1970; 210:637-650.

Aiba A, Kano M, Chen C, Stanton ME, Fox GD, Herrup K, Zwingman TA, Tonegawa S. Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 1994; 79:377-388.

Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, Mishina M. Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197:1267-1276.

Attwell PJ, Rahman S, Ivarsson M, Yeo CH. Cerebellar cortical AMPA-kainate receptor blockade prevents performance of classically conditioned nictitating membrane responses. *J Neurosci* 1999;19:RC45.

### [B]

Badura A, Schonewille M, Voges K, Galliano E, Renier N, Gao Z, Witter L, Hoebeek FE, Chédotal A, De Zeeuw CI. Climbing fiber input shapes reciprocity of Purkinje cell firing. *Neuron* 2013; 78:700-713.

Barmack NH, Shojaku H. Vestibular and visual climbing fiber signals evoked in the uvula-nodulus of the rabbit cerebellum by natural stimulation. *J Neurophysiol* 1995; 74:2573-2589.

Benarroch EE. The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:988-1001.

Bradley DJ, Ghelarducci B, La Noce A, Spyer KM. Autonomic and somatic responses evoked by stimulation of the cerebellar uvula in the conscious rabbit. *Exp Physiol* 1990; 75:179-186.

Bradley DJ, Ghelarducci B, Paton JF, Spyer KM. The cardiovascular responses elicited from the posterior cerebellar cortex in the anaesthetized and decerebrate rabbit. *J Physiol* 1987; 383:537-550.

Bradley DJ, Ghelarducci B, Spyer KM. The role of the posterior cerebellar vermis in cardiovascular control. *Neurosci Res* 1991; 12:45-56.

[C]

Cavdar S, San T, Aker R, Sehirli U, Onat F. Cerebellar connections to the dorsomedial and posterior nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Anat* 2001; 198:37-45.

Cerminara NL, Apps R. Behavioural significance of cerebellar modules. *Cerebellum* 2011; 10: 484-494.

Coesmans M, Weber JT, De Zeeuw CI, Hansel C. Bidirectional parallel fiber plasticity in the cerebellum under climbing fiber control. *Neuron* 2004; 44:691-700.

Conquet F, Bashir ZI, Davies CH, Daniel H, Ferraguti F, Bordi F, Franz-Bacon K, Reggiani A, Matarese V, Condé F, Collingridge GL, Crépel F. Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* 1994; 372:237-243.

Crepel F, Jaillard D. Pairing of pre- and postsynaptic activities in cerebellar Purkinje cells induces long-term changes in synaptic efficacy in vitro. *J Physiol* 1991; 432:123-141.

Crepel, F. Regression of functional synapses in the immature mammalian cerebellum. *Trends Neurosci* 1982; 5, 266-269.

**[D]**

Desclin JC, Escubi J. Effects of 3-acetylpyridine on the central nervous system of the rat, as demonstrated by silver methods. *Brain Res* 1974; 77:349-364.

**[E]**

Ekerot CF, Kano M. Long-term depression of parallel fibre synapses following stimulation of climbing fibres. *Brain Res* 1985; 342:357-360.

**[F]**

Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, Nicodemus KK, Wolyniec PS, McGrath JA, Steel G, Nestadt G, Liang KY, Haganir RL, Valle D, Pulver AE. Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 918-936.

Freeman JH, Steinmetz AB. Neural circuitry and plasticity mechanisms underlying delay eyeblink conditioning. *Learn Mem* 2011; 18:666-677.

Fu LW, Guo ZL, Longhurst JC. Ionotropic glutamate receptors in the external lateral parabrachial nucleus participate in processing cardiac sympathoexcitatory reflexes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302: H1444-1453.

[G]

Ghelarducci B, Sebastiani L. Role of the medial prefrontal cortex in the development of conditioned bradycardia in rabbits with lesions of the cerebellar vermis. *Exp Brain Res* 1999; 129:185-190.

Gilmartin MR, Balderston NL, Helmstetter FJ. Prefrontal cortical regulation of fear learning. *Trends Neurosci* 2014; 14: pii: S0166-2236.

Guo ZL, Tjen-A-Looi SC, Fu LW, Longhurst JC. Nitric oxide in rostral ventrolateral medulla regulates cardiac-sympathetic reflexes: role of synthase isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H1478-1486.

[H]

Hartmann J, Konnerth A. Determinants of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> signaling in Purkinje neurons. *Cell Calcium* 2005; 37:459-466.

Hashimoto K, Ichikawa R, Kitamura K, Watanabe M, Kano M. Translocation of a "winner" climbing fiber to the Purkinje cell dendrite and subsequent elimination of "losers" from the soma in developing cerebellum. *Neuron* 2009 ; 63:106-118

He WZ, Liu WQ, Zhong XQ, Chen XL, Li SY, Zhang HM, Li Q, Cui QL, Sun XF. Analysis of de novo copy number variations in a family affected with autism spectrum disorders using high-resolution array-based comparative genomic hybridization. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2012; 29:266-269.

Hills LB, Masri A, Konno K, Kakegawa W, Lam AT, Lim-Melia E, Chandy N, Hill RS, Partlow JN, Al-Saffar M, Nasir R, Stoler JM, Barkovich AJ, Watanabe M, Yuzaki M, Mochida GH. Deletions in GRID2 lead to a recessive syndrome of cerebellar ataxia and tonic upgaze in humans. *Neurology* 2013; 81:1378-1386.

Hirai H, Launey T, Mikawa S, Torashima T, Yanagihara D, Kasaura T, Miyamoto A, Yuzaki M. New role of delta2-glutamate receptors in AMPA receptor trafficking and cerebellar function. *Nat Neurosci* 2003; 6:869-876.

Hirai H. Modification of AMPA receptor clustering regulates cerebellar synaptic plasticity. *Neurosci Res* 2001; 39:261-267.

Hirano T. Depression and potentiation of the synaptic transmission between a granule cell and a Purkinje cell in rat cerebellar culture. *Neurosci Lett* 1990; 119:141-144.

Hirstein W, Iversen P, Ramachandran VS. Autonomic responses of autistic children to people and objects. *Proc Biol Sci* 2001; 268:1883-1888.

[I]

Ichikawa R, Miyazaki T, Kano M, Hashikawa T, Tatsumi H, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y, Watanabe M. Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor delta 2. *J Neurosci* 2002; 22:8487-8503.

Ito-Ishida A, Miyazaki T, Miura E, Matsuda K, Watanabe M, Yuzaki M, Okabe S. Presynaptically released Cbln1 induces dynamic axonal structural changes by interacting with GluD2 during cerebellar synapse formation. *Neuron* 2012; 76:549-564.

Ito M. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiological Rev* 2001; 81:1143-1195.

Ito M. Error detection and representation in the olivo-cerebellar system. *Front Neural Circuits* 2013; 7:1.

Ito M, Kano M. Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neurosci Lett* 1982; 33:253-258.

Ito M. Long-term depression. *Annu Rev Neurosci* 1989; 12:85-102.

Ito M, Miyashita Y. The effects of chronic destruction of the inferior olive upon visual modification of the horizontal vestibulo-ocular reflex of rabbits. *Proc Japan Acad* 1975; 51:716-720.

Iwata J, Chida K, LeDoux JE. Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Res* 1987; 418:183-188.

**[K]**

Takegawa W, Miyazaki T, Emi K, Matsuda K, Kohda K, Motohashi J, Mishina M, Kawahara S, Watanabe M, Yuzaki M. Differential regulation of synaptic plasticity and cerebellar motor learning by the C-terminal PDZ-binding motif of GluRdelta2. *J Neurosci* 2008; 28:1460-1468.

Takegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitzu K, Yuzaki M. D-serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the  $\delta 2$  glutamate receptor. *Nat Neurosci* 2011; 14:603-611.

Kano M, Hashimoto K, Kurihara H, Watanabe M, Inoue Y, Aiba A, Tonegawa S. Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR1. *Neuron* 1997; 18:71-79.

Kapp BS, Frysiner RC, Gallagher M, Haselton JR. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. *Physiol Behav* 1979; 23:1109-1117.

Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y, Aizawa S, Mishina M. Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* 1995;81:245-252.

Kato Y, Takatsuki K, Kawahara S, Fukunaga S, Mori H, Mishina M, Kirino Y. N-methyl-D-aspartate receptors play important roles in acquisition and expression of the eyeblink conditioned response in glutamate receptor subunit delta2 mutant mice. *Neuroscience* 2005; 135: 1017-1023.

Kim J, Lee S, Park K, Hong I, Song B, Son G, Park H, Kim WR, Park E, Choe HK, Kim H, Lee C, Sun W, Kim K, Shin KS, Choi S. Amygdala depotentiation and fear extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:20955-20960.

Kishimoto Y, Kawahara S, Fujimichi R, Mori H, Mishina M, Kirino Y. Impairment of eyeblink conditioning in GluRdelta2-mutant mice depends on the temporal overlap between conditioned and unconditioned stimuli. *Eur J Neurosci* 2001; 14:1515-1521.

Kohda K, Kakegawa W, Matsuda S, Yamamoto T, Hirano H, Yuzaki M. The  $\delta 2$  glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:E948-957

Konnerth A, Dreessen J, Augustine GJ. Brief dendritic calcium signals initiate long-lasting synaptic depression in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:7051-7055.

Koyama Y, Asahina M, Honma K, Arai K, Hattori T. Altered heart rate control in response to postural change in patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Cerebellum* 2009; 8:130-136.

Kurihara H, Hashimoto K, Kano M, Takayama C, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y, Watanabe M. Impaired parallel fiber-->Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor delta2 subunit. *J Neurosci* 1997; 17:9613-9623.

## [L]

Lev-Ram V, Wong ST, Storm DR, Tsien RY. A new form of cerebellar long-term potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:8389-8393.

Llano I, Marty A, Armstrong CM, Konnerth A. Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J Physiol* 1991; 434:183-213.

Llinás R, Walton K, Hillman DE, Sotelo C. Inferior olive: its role in motor learning. *Science* 1975; 190:1230-1231.

Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Köhr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W. The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett* 1993; 315:318-322.

## [M]

Maier A, Klopocki E, Horn D, Tzschach A, Holm T, Meyer R, Meyer T. De novo partial deletion in GRID2 presenting with complicated spastic paraplegia. *Muscle Nerve*. 2014; 49: 289-292.

Maschke M, Schugens M, Kindsvater K, Drepper J, Kolb FP, Diener HC, Daum I, Timmann D. Fear conditioned changes of heart rate in patients with medial cerebellar lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72:116-118.

Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M. Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. *Science* 2010; 328:363-368.

Matsuda K, Yuzaki M. Cbln1 and the  $\delta 2$  glutamate receptor--an orphan ligand and an orphan receptor find their partners. *Cerebellum* 2012;11:78-84.

Matsuda S, Launey T, Mikawa S, Hirai H. Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *EMBO J* 2000; 19:2765-2774.

Matsuda S, Yuzaki M. Mutation in *hotfoot-4J* mice results in retention of delta2 glutamate receptors in ER. *Eur J Neurosci* 2002;16:1507-1516.

Mauk MD, Steinmetz JE, Thompson RF. Classical conditioning using stimulation of the inferior olive as the unconditioned stimulus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:5349-5353.

McCabe PM, Gentile CG, Markgraf CG, Teich AH, Schneiderman N. Ibotenic acid lesions in the amygdaloid central nucleus but not in the lateral subthalamic area prevent the acquisition of differential Pavlovian conditioning of bradycardia in rabbits. *Brain Res* 1992; 580:155-163.

McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ. Central autonomic integration of psychological stressors: focus on cardiovascular modulation. *Auton Neurosci* 2005; 123:1-11.

Medina JF, Repa JC, Mauk MD, LeDoux JE. Parallels between cerebellum-and amygdala-dependent conditioning. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3:122-131.

Ming X, Julu PO, Brimacombe M, Connor S, Daniels ML. Reduced cardiac parasympathetic activity in children with autism. *Brain Dev* 2005; 27:509-516.

Miyata M, Kim HT, Hashimoto K, Lee TK, Cho SY, Jiang H, Wu Y, Jun K, Wu D, Kano M, Shin HS. Deficient long-term synaptic depression in the rostral cerebellum correlated with impaired motor learning in phospholipase C beta4 mutant mice. *Eur J Neurosci* 2001;13:1945-1954.

Montarolo PG, Palestini M, Strata P. The inhibitory effect of the olivocerebellar input on the cerebellar Purkinje cells in the rat. *J Physiol* 1982; 332:187- 202.

Motohashi J, Kakegawa W, Yuzaki M. *Ho15J*: a new hotfoot allele in a hot spot in the gene encoding the delta2 glutamate receptor. *Brain Res* 2007; 1140:153-160.

[N]

Nisimaru N. Cardiovascular modules in the cerebellum. *Jpn J Physiol* 2004; 54:431- 448.

Nisimaru N, Yamamoto M, Shimoyama I. Inhibitory effects of cerebellar cortical stimulation on sympathetic nerve activity in rabbits. *Jpn J Physiol* 1984; 34: 539- 551.

**[O]**

Offermanns S, Hashimoto K, Watanabe M, Sun W, Kurihara H, Thompson RF, Inoue Y, Kano M, Simon MI. Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking Ggq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94, 14089–14094.

**[P]**

Palkovitz RJ, Wiesenfeld AR. Differential autonomic responses of autistic and normal children. *J Autism Dev Disord* 1980 ; 10:347-360.

Paxinos G and Franklin K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact Second edition. USA, *Elsevier Academic Press* 2003.

**[R]**

Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J, Caston J. Role of the inferior olivary complex in motor skills and motor learning in the adult rat. *Neuroscience* 1997; 77:955-963.

Ruit KG, Neafsey EJ. Cardiovascular and respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the hippocampus in anesthetized and awake rats. *Brain Res* 1988; 457:310-321.

[S]

Saadé NE, Jabbur SJ. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. *Prog Neurobiol* 2008; 86:22-47.

Sacchetti B, Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C. Cerebellar role in fear-conditioning consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; 99:8406-8411.

Sacchetti B, Scelfo B, Tempia F, Strata P. Long-term synaptic changes induced in the cerebellar cortex by fear conditioning. *Neuron* 2004; 42:973- 982.

Sakurai M. Calcium is an intracellular mediator of the climbing fiber in induction of cerebellar long-term depression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3383-3385.

Sakurai M. Synaptic modification of parallel fibre-Purkinje cell transmission in in vitro guinea-pig cerebellar slices. *J Physiol* 1987; 394:463-480.

Sato A, Kasai S, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nat Commun* 2012; 3: 1292.

Schonewille M, Belmeguenai A, Koekkoek SK, Houtman SH, Boele HJ, van Beugen BJ, Gao Z, Badura A, Ohtsuki G, Amerika WE, Hosy E, Hoebeek FE, Elgersma Y, Hansel C, De Zeeuw CI. Purkinje cell-specific knockout of the protein phosphatase PP2B impairs potentiation and cerebellar motor learning. *Neuron* 2010; 67:618-628.

Seoane A, Apps R, Balbuena E, Herrero L, Llorens J. Differential effects of trans-crotonitrile and 3-acetylpyridine on inferior olive integrity and behavioural performance in the rat. *Eur J Neurosci* 2005; 22:880-894.

Supple WF, Hypothalamic modulation of Purkinje cell activity in the anterior cerebellar vermis. *Neuroreport* 1993; 7:979-982

Supple WF, Kapp BS. Anatomical and physiological relationships between the anterior cerebellar vermis and the pontine parabrachial nucleus in the rabbit. *Brain Res Bull* 1994; 33:561-574.

Supple WF, Kapp BS. The anterior cerebellar vermis: essential involvement in classically conditioned bradycardia in the rabbit. *J Neurosci* 1993; 13:3705-3711.

Supple WF, Leaton RN. Cerebellar vermis: essential for classically conditioned bradycardia in the rat. *Brain Res* 1990; 509:17-23.

Supple WF, Leaton RN, Fanselow MS. Effects of cerebellar vermal lesions on species-specific fear responses, neophobia, and taste-aversion learning in rats. *Physiol Behav* 1987; 39:579-586.

[T]

Takatsuki K, Kawahara S, Kotani S, Fukunaga S, Mori H, Mishina M, Kirino Y. The hippocampus plays an important role in eyeblink conditioning with a short trace interval in glutamate receptor subunit delta 2 mutant mice. *J Neurosci* 2003; 23: 17-22.

Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. Developmental changes in expression and distribution of the glutamate receptor channel delta 2 subunit according to the Purkinje cell maturation. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; 92:147-155.

Takeuchi E, Sato Y, Miura E, Yamaura H, Yuzaki M, Yanagihara D. Characteristics of gait ataxia in  $\delta 2$  glutamate receptor mutant mice, *ho15J*. *PLoS One* 2012;7:e47553.

Thompson RF, Steinmetz JE. The role of the cerebellum in classical conditioning of discrete behavioral responses. *Neuroscience* 2009; 162:732- 755.

Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, Steinberg J, Crawley JN, Regehr WG, Sahin M. Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell *Tsc1* mutant mice. *Nature* 2012; 488:647-651.

Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K, Miyashita Y. Optogenetic inhibition of Purkinje cell activity reveals cerebellar control of blood pressure during postural alterations in anesthetized rats. *Neuroscience* 2012; 210:137-144.

## [W]

Wada N, Kishimoto Y, Watanabe D, Kano M, Hirano T, Funabiki K, Nakanishi S. Conditioned eyeblink learning is formed and stored without cerebellar granule cell transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:16690-16695.

Waldrop TG, Iwamoto GA. Cardiovascular responses to chemical stimulation of the inferior olive in the cat. *Brain Res Bull* 1991; 26:667-670.

Wang Y, Matsuda S, Drews V, Torashima T, Meisler MH, Yuzaki M. A hot spot for hotfoot mutations in the gene encoding the delta2 glutamate receptor. *Eur J Neurosci* 2003; 17:1581-1590.

Welsh JP, Harvey JA. Acute inactivation of the inferior olive blocks associative learning. *Eur J Neurosci* 1998; 10:3321- 3332.

[Y]

Yadav R, Gupta SC, Hillman BG, Bhatt JM, Stairs DJ, Dravid SM. Deletion of glutamate delta-1 receptor in mouse leads to aberrant emotional and social behaviors. *PLoS One* 2012; 7: e32969.

Yanagihara D, Mechanisms of locomotor control in the cerebellum. *Brain Nerve* 2010; 62:1149-1156.

Yoshida M, Hirano R. Effects of local anesthesia of the cerebellum on classical fear conditioning in goldfish. *Behav Brain Funct* 2010; 6:20.

Yoshida M, Kondo H. Fear conditioning-related changes in cerebellar Purkinje cell activities in goldfish. *Behav Brain Funct* 2012; 8:52.

Yoshida M, Okamura I, Uematsu K. Involvement of the cerebellum in classical fear conditioning in goldfish. *Behav Brain Res* 2004; 153:143-148.

Yuzaki M. The delta2 glutamate receptor: a key molecule controlling synaptic plasticity and structure in Purkinje cells. *Cerebellum* 2004; 3:89-93.

[Z]

Zbarska S, Holland EA, Bloedel JR, Bracha V. Inferior olivary inactivation abolishes conditioned eyeblinks: extinction or cerebellar malfunction? *Behav Brain Res* 2007; 178:128-138.

Zhu JN, Yung WH, Kwok-Chong Chow B, Chan YS, Wang JJ. The cerebellar-hypothalamic circuits: potential pathways underlying cerebellar involvement in somatic-visceral integration. *Brain Res Rev* 2006; 52:93-106.

Zhu L, Sacco T, Strata P, Sacchetti B. Basolateral amygdala inactivation impairs learning-induced long-term potentiation in the cerebellar cortex. *PLoS One* 2011; 6:e16673.

[た]

武島 あゆみ, 生和 秀敏. 自閉症にみられる行動と自律神経系の覚醒水準との対応についての検討(III) 安静時心拍数の日間変動と行動との関係. 広島大学総合科学部紀要 IV 理系編 1993; 19:151-158.

## 謝辞

本博士論文は、柳原大 准教授の御指導のもと執筆したものです。柳原大 准教授には、本研究の実験計画、実験方法、実験、論文執筆に至るまで丁寧な御指導を頂きました。この場を借りて深く感謝致します。

本研究の下オリーブ核実験における切片作成には理化学研究所脳科学総合センターの端川勉 先生、ならびに国立精神・神経医療研究センターの境和久 先生に多大な協力を頂きました。また *ho15J* マウスは、慶応義塾大学医学部の柚崎通介 教授、鳴海栄 先生に分与して頂きました。この場を借りて深く感謝いたします。

柳原研究室の皆様には、ゼミにおいて多くの御意見を頂きました。ゼミ以外でも、実験方法、解析方法および研究内容に至るまで有意義な議論をさせて頂いたことに、心より感謝致します。皆様の研究にも刺激を受け、私自身の研究を進め、本博士論文をまとめられました。

学会において、本研究の発表に対し貴重な御意見および御質問をして頂いた皆様には、この場を借りて深く御礼申し上げます。違う視点からの御意見および御質問は研究をまとめていく上で大変参考になりました。

本研究をまとめるにあたり、国立精神・神経医療研究センターにてご指導いただいた高坂新一 先生、現帝京大学理工学部バイオサイエンス学科の内野茂夫 教授、並びに国立精神・神経医療研究センター代謝研究部の皆様、東京都医学総合研究所の池田和隆 先生に心から感謝しております。研究所における数々の研究経験と多くの仲間との出会いがあり、本博士論文をまとめるにあたり、大変助けられました。最後に、ここまで見守り、応援し続けてくれた家族や友人に心から感謝します。

皆様、本当にありがとうございました。