

論文の内容の要旨

博士論文題目

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

古田島 浩子

[第1章：序論]

小脳は運動の制御や学習に重要であるが自律神経系の活動調節に関与することが報告されてきた。自律神経系の中でも、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により条件刺激に対する漸進的な心拍数の減少(条件付け徐脈)を学習する恐怖条件付け徐脈課題を用いて調べられてきた。小脳虫部を破壊し恐怖条件付け徐脈課題を行うと条件付け徐脈が障害されることがラットやウサギを用いて報告されている。小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は2つのニューロンから興奮性のシナプス入力を受ける。一つは顆粒細胞軸索の平行線維、もう一つは下オリーブ核を起始核とする登上線維である。瞬目条件付け学習において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条件刺激をプルキンエ細胞へ伝送し登上線維が無条件刺激を伝送することが示唆されている。平行線維と登上線維を同時頻回刺激すると平行線維－プルキンエ細胞間のシナプス伝達効率が減少する。これは長期抑圧と称され細胞レベルでの学習の基礎過程と考えられている。一方、平行線維－プルキンエ細胞間では長期増強も生じることが報告されており、平行線維－プルキンエ細胞間の長期抑圧や長期増強の誘導には Ca^{2+} の流入が必要であるが、 Ca^{2+} の流入は登上

線維の活動により生じる。平行線維-プルキンエ細胞間には、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor (AMPA)、metabotropic glutamate receptor type 1 や $\delta 2$ glutamate receptor (GluD2) が存在する。中でも GluD2 は平行線維-プルキンエ細胞間に選択的に発現するという特徴を有している。GluD2 のノックアウトや自然発生変異を有するマウスは平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの減少、登上線維のプルキンエ細胞への多重支配や平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧の障害を呈する。また成熟した正常な神経回路を形成した小脳切片のプルキンエ細胞に GluD2 の阻害抗体を投与すると平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧が生じないことや未成熟なラットやマウスから培養した小脳のプルキンエ細胞に GluD2 の阻害抗体を投与しシナプス後膜における AMPAR の数を調べると阻害抗体を投与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ことが示された。これまで恐怖条件付け徐脈における研究は小脳虫部の外科的除去や電気刺激を用いて調べられてきたが小脳皮質神経回路について調べたものはない。そこで下オリーブ核-登上線維から小脳への入力役割を調べるために薬理的に下オリーブ核を破壊し恐怖条件付け徐脈を行った。また GluD2 を自然発生変異している *ho15J* マウスを用いて恐怖条件付け徐脈における GluD2 変異の影響(平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの減少、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)を調べた。さらに *ho15J* マウスにおいて生じた条件付け徐脈に小脳皮質の興奮性シナプス伝達が寄与しているのかについて調べた。

[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]

3-acetylpyridine (3-AP)を用いてマウス (C57BL/6)の下オリーブ核を薬理的に破壊し、恐怖条件付け徐脈における下オリーブ核-登上線維を介した小脳への入力役割を調べた。マウスに 3-AP を腹腔内投与し下オリーブ核の細胞死を誘導した。下オリーブ核の細胞を計数したところ control マウスに対して 3-AP を注入したマウス (IO マウス)の細胞数が減少していた。恐怖条件付け徐脈は環境に馴化する Habituation、音刺激に馴化する CS-alone、音刺激と電気刺激を組み合わせ、条件付けをする CS-US (3 日間、50 試行/日)で構成した。条件付け後、無条件刺激としての電気刺激に対する心拍応答を確認するために US-alone を行い、さらに痛み刺激に対する応答の確認として tail-flick test を行った。Habituation、CS-alone において両群に差はみられなかった。しかし CS-US において、control マウスが条件付け徐脈を示すのに対し IO マウスは条件付け徐脈が障害されていた。US-alone では、control マウスが US として用いた電気刺激に対して頻脈応答を示すのに対し IO マウスの頻脈応答は減弱していた。tail-flick test においては両群に

差はみられなかった。これらの結果から恐怖条件付け徐脈において下オリーブ核一登上線維は小脳へ無条件刺激を伝送することが示唆され、恐怖条件付け徐脈の獲得及び発現に必要なことが示された。

[第3章： $\delta 2$ 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]

恐怖条件付け徐脈における小脳の平行線維—プルキンエ細胞間に選択的に発現する GluD2 変異の影響を調べるために GluD2 の自然発生変異を有する *ho15J* マウスを用いた。wild-type には C3H/HeJc1 マウスを用いた。Habituation、CS-alone は第2章と同様に行った。CS-US は5日間、50試行/日で行った。CS-US 5日間の後、条件付け徐脈を消去する Extinction を行った。US-alone、tail-flick test は第2章と同様に行った。Habituation、CS-alone において両群に差はみられなかった。CS-US 1日目において *ho15J* マウスは wild-type マウスと同様に条件付け徐脈を獲得した。また CS-US 5日間における条件付け徐脈の発現率は wild-type マウスと同様に約 80% を示した。しかし条件付け徐脈を獲得した2日目以降 wild-type マウスは4日間 (CS-US 2-5日) 安定して条件付け徐脈を呈したが *ho15J* マウスは前日に呈した条件付け徐脈の値を最初の10試行で亢進し、10試行目以降は wild-type マウスの条件付け徐脈の値に近づくことが観察された。Extinction においては両群共に条件付け徐脈を消去し、US-alone、tail-flick test においては両群ともに差はみられなかった。これらの結果から *ho15J* マウスにおける GluD2 の変異は CS 及び US の各々に対する心拍応答には影響せず、GluD2 を介した長期抑圧は恐怖条件付け徐脈の獲得に本質的ではないこと、GluD2 の変異は保持相 (CS-US 2-5日) に影響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]

ho15J マウスは生来から GluD2 の変異を持つことから小脳以外の脳部位による代償作用が考えられた。そこで *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、あるいは小脳以外の脳部位を介して生じたのかを調べるために CS-US 3日目に wild-type マウスと *ho15J* マウスに AMPAR の阻害薬である 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) を小脳皮質に注入し恐怖条件付け徐脈への影響を調べた。比較として wild-type マウスに saline を注入した群を設けた。Habituation、CS-alone、CS-US は第3章と同様に行った。CS-US 2日目において wild-type (NBQX) マウスと *ho15J* (NBQX) マウス、wild-type (saline) マウスの条件付け徐脈に差はなかった。しかし注入日において wild-type (saline) マウスは条件付け徐脈を呈するのに対して wild-type (NBQX) マウスと *ho15J* (NBQX) マウス共に条件付け徐脈が減弱した。翌日には両群の条件付け徐脈の値と wild-type (saline) マウスの値に差はなかった。これら

の結果から *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た応答であることが示唆された。

[まとめ]

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、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、下オリーブ核-登上線維からの小脳への入力に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本質的でないことが示唆された。また **GluD2** の変異は条件付け徐脈の保持相に影響することが示された。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唆された。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。