

学位授与番号：甲1008号

氏名：佐藤 優

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成28年3月9日

学位論文名：

マウス恐怖記憶獲得における外側腕傍核の能動的な関与

主論文名：

The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice.

（マウス恐怖記憶獲得における外側腕傍核の能動的な関与）

学位審査委員長：教授 安保雅博

学位審査委員：教授 河合良訓 教授 宮田久嗣

論文要旨

論文提出者名

佐藤 優

指導教授名 上園 晶一

The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice.

(マウス恐怖記憶獲得における外側腕傍核の能動的関与)

Sato Masaru, Ito Mariko, Nagase Masashi, Sugimura K Yae,

Takahashi Yukari, Watabe M Ayako, Kato Fusao.

Molecular Brain, 2015; Volume 8: 22

痛みの適正な管理は、外傷後や術後の生活の質に大きな影響を及ぼす重要な課題である。単なる侵害受容だけではなく、痛みやその記憶によって生じる苦痛や恐怖から患者を解放することも疼痛管理の重要なゴールである。痛みの恐怖はしばしば記憶され患者を苦しめ続けるが、そこには侵害受容情報や恐怖学習に関与する脳内神経機構の可塑的变化が関与していると考えられており、その機構の解明は、痛みや恐怖の記憶の理解に必須である。パブロフ型恐怖条件付けは、条件刺激 (conditioned stimulus, CS) と無条件刺激 (unconditioned stimulus, US) の連合によって成立する学習である。大脳辺縁系の一部である扁桃体がその連合の座であることがほぼ確定しているが、US を媒介する経路については未解明の部分が多い。近年、扁桃体中心核が恐怖記憶の獲得や慢性痛の成立においても中心的な役割を果たすことが明らかにされており、脊髄後角に起始する US 情報をこの扁桃体中心核に中継する最外側腕傍核 (external part of the lateral parabrachial nucleus, elPB) が、侵害刺激による恐怖記憶形成において担う役割の解明を目的とした。

まず、侵害刺激による elPB の活性化が恐怖記憶獲得に及ぼす影響を検討した。純音聴覚刺激の CS と足底電気刺激による US の同時提示による恐怖記憶の獲得中に、GABA_A 受容体作動薬ムシモールを両側 elPB に微量注入した群では、溶媒注入群および elPB 外注入群に比し、恐怖学習の程度を反映する 24 時間後 CS 提示下すくみ反応が有意に減弱した。この結果から、恐怖記憶の獲得に elPB を介した侵害受容経路の活性化が必要である事実が示された。このとき侵害受容行動には変化がなかった。次に、elPB の活性化による恐怖学習の形成を検討した。マウス elPB に光活性化チャンネル (チャンネルロドプシン) を発現させ、扁桃体中心核への選択的光刺激と CS の同時提示を行ったところ、24 時間後の CS 提示下すくみ反応が有意に増加した。この結果から、腕傍核—扁桃体路の選択的な活性化が、US の代替として恐怖学習を誘発しうることを示された。

以上の実験成績から、elPB—扁桃体中心核路の活性化は恐怖学習の誘発に必要なおよび十分であり、脊髄後角—腕傍核—扁桃体路が、有害情報を扁桃体中心核へ伝達して、痛みの恐怖の記憶を引き起こす経路の主要な一部である可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

佐藤優氏提出の学位申請論文は、主論文 1 編 1 冊より成る。主論文は、『The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice (マウスの恐怖記憶獲得における外側腕傍核の役割)』と題する *Molecular Brain*. 2015:8-22 に掲載された英文論文で、東京慈恵会医科大学大学院医学研究科医学系 細胞・統合神経科学専攻博士課程 総合医科学研究センター 神経科学研究部の加藤総夫教授の研究指導により作成されたものである。以下に、主論文の要旨と論文審査委員会の結果を報告する。

パブロフ型の恐怖条件付けは、条件刺激 (conditioned stimulus, CS) と無条件刺激 (unconditioned stimulus, US) を連合させることによって成立する学習である。CS と US の連合は扁桃体で行われると一般には考えられているが、US を媒介する経路については、その一部しか確認されていない。近年、扁桃体中心核 (central amygdala, CeA) が恐怖記憶の獲得において中心的な役割を果たすことが明らかにされた。脳橋の最外側腕傍核 (external part of the lateral parabrachial nucleus, eIPB) は US をこの CeA に中継する神経核である。特に中心外包核 (central amygdala, capsular part, CeC) は、このような有害情報の受容という観点から良い条件を備えている。すなわち CeC 神経細胞の大部分は、eIPB から侵害受容関連情報を直接単シナプス性経路で受容する。そこで本研究では、eIPB の活性を操作し、恐怖学習の制御において eIPB が担う役割を検討した。

まず、恐怖記憶の獲得中に eIPB を一過性に不活性化した。両側 eIPB に GABA_A 受容体作動薬ムシモールを注入したマウス (MUS 群) または PBS を注入したマウス (薬剤コントロール群) と、両側 eIPB の外にムシモールを注入したマウス (部位コントロール群) を検討した。注入後のマウスに、純音と足底刺激を用いて条件付けをした。2 日目の想起実験において、MUS 群のすくみ反応率は、薬剤コントロール群および部位コントロール群よりも有意に低かった。3 日目にピップ音を用いた条件付けを行い、4 日目に行った 2 回目の想起実験においては、群間差なく有意なすくみ反応がみられた。このことにより、全ての群において恐怖学習に一貫性があること、およびムシモールの効果が一過性に限定されていることが示された。

次に、eIPB \rightarrow CeC 路の選択的活性化と CS を連合させることで恐怖学習が十分に誘発されるかを検討した。eIPB に ChR2 を発現させたマウスに、CeA への LED 光刺激と純音刺激 (CS) を同期させて与えた (CS-LED ペアリング群)。想起実験において、CS 提示により引き起こされるすくみ反応率は、ショックチャンバーに入れた直後に光刺激を受け、しばらく間をおいてから CS に暴露させた対照群 (直後ショック群) と、GFP のみを発現させた対照群 (GFP 群) と比較して、

CS-LED ペアリング群のマウスにおいて有意に高かった。

これらの結果から、eIPB δ CeC 路の選択的な刺激は、US の代替として恐怖学習を誘発することが示唆された。

以上の結果から、eIPB の活性は恐怖学習を引き起こすのに必要および十分であり、CeA へ有害情報を伝達する経路の一部である可能性が示された。

以上の論文に対して、平成 28 年 2 月 25 日に、河合良訓 教授、宮田久嗣 教授のご出席を得て、公開で学位論文審査会を開催した。佐藤氏の研究概要の発表に引き続いて口頭試験を行った。

席上、

1. ムシモールによる恐怖学習中の不動性について
2. 部位コントロール群の分類の仕方
3. 恐怖条件付け学習の δ 痛みと条件刺激の連合 δ を δ 脊髄後角 腕傍核 扁桃体路の活性化と条件刺激の連合 δ によって再現できたことをどう解釈するか
4. 脊髄後角 腕傍核 扁桃体路は侵害受容のみの経路か
5. 匂いなど他の不快な刺激に関して
6. ムシモールは GABA 受容体のどのサブタイプに作用しているのか
7. どの GABA ニューロンを想定してムシモールによる活性化をさせたのか。
8. ムシモールの脳内投与による聴覚への影響は検討したか。 δ external δ lateral parabrachial nucleus
9. この研究から臨床に応用できることは何か

など多くの質問がなされた。

これに対して、佐藤氏は、研究室での論文結果を踏まえて適切に回答した。その後、両教授と慎重に審議した結果、佐藤 優氏の提出論文は、最外側腕傍核の活性は恐怖学習を引き起こすのに必要および十分であり、扁桃体中心核へ有害情報を伝達する経路の一部である可能性を示したことは、臨床的にも学術的にも意義深い点で、有意義な論文であり、学位申請論文として十分価値のあるものと判断された。