

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 齊藤 奈英
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1021 号
学位授与の日付 令和3年9月21日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Neurotransmission through dopamine D1 receptors is required for aversive memory formation and Arc activation in the cerebral cortex.
(ドーパミンD1受容体を介した神経伝達は、嫌悪記憶形成と大脳皮質におけるArc活性化に必要である。)

論文審査委員 主査 教授 五十嵐 博中
副査 教授 柿田 明美
副査 准教授 阿部 学

博士論文の要旨

背景と目的

ドーパミン受容体を介する神経伝達は、運動機能制御だけでなく、記憶学習機能に関与していると報告されている。ドーパミン受容体は、D1受容体(D1R)とD5Rを含むD1様受容体とD2R、D3R、D4Rを含むD2様受容体に分類される。中でもD1Rを介する情報伝達は、報酬学習に関与していると報告されてきたが、嫌悪記憶形成にも関与していることが報告されている。しかし、報告される解析結果には一貫性がなく、解析に使用されたマウスの遺伝的背景やD1Rを欠損させた時期が影響した可能性が示唆されている。多くの報告で用いられているD1Rノックアウト(KO)マウスは、発生初期からのD1R欠損の影響により、D1Rを介するドーパミン作動性神経伝達回路が変化した可能性が考えられる。さらに、D1RKOマウスは、D2Rの発現様式が変化することや、D2Rが発現している神経細胞が影響を受け、D2Rを介した神経伝達が増強した可能性も示唆されている。また、D1Rを介する神経伝達機能の薬理的な検証においては、D1RアンタゴニストはD5Rにも影響を与える。そこで、本研究では、D1R特異的機能を理解するため、マウスが成熟期になってから可逆的にD1R発現を欠損できるD1Rノックダウン(KD)マウスを用いて、D1Rを介する神経伝達と嫌悪記憶形成の関連に着目しD1R欠損状態で受動的回避試験を実施し、D1Rが記憶学習に及ぼす影響を検討した。このコンディショナルD1RKDマウスは、TET-OFFシステムを用いており、ドキシサイクリン(Dox)を4週間飲水投与することにより、D1R発現が欠損し、投与を中止すると1週間程度でD1R発現が回復するように制御可能である。

方法

実験には、D1Rの発現を可逆的に制御できるコンディショナルD1RKDマウスを用い、受動的回避試験を行った。受動的回避試験は、1日目に学習セッションとしてフットショックを与え、2、4、8、15日目に試験セッションとして暗箱に入るまでの時間を計測した。第1段階として、Doxを4週間飲水投与してD1R発現が欠損したD1RKDマウスの嫌悪記憶の学習成績を解析した。Dox投与は学習セッション終了後に中止し

た。さらに、第2段階として同個体へのDox投与を中止してD1R発現が回復したD1RKDマウスに対して、再び受動的回避試験を行い、D1R発現が受動的回避試験に及ぼす影響を検討した。対照群として、野生型マウスとDox非投与のD1RKDマウスを用いた。

次に、D1Rを介する情報伝達の影響を検討するため、全脳透明化による網羅的な観察法で最初期遺伝子Arcの発現を解析した。用いたマウスは、Arc遺伝子発現制御下で蛍光タンパクdVenusを発現するマウスとD1RKDマウスの複合マウスである。受動的回避試験と同じフットショックを与え、Arcの発現様式をライトシート顕微鏡で三次元イメージング解析を行った。

結果

受動的回避試験の第1段階である嫌悪記憶形成時にD1R発現が欠損したマウスは、成績が低下した。さらにD1R発現が回復した同個体による第2段階では、試験セッションの後半において若干の成績低下は見られるものの野生型マウスとの有意差は認められなかった。また、D1R発現が欠損したマウスの成績の低下は、嫌悪記憶形成の低下ではなく、痛みの受容の異常による可能性を検討するため、痛み感受性試験を行ったところ、対照群の野生型マウスとDox非投与のD1RKDマウスの成績との有意差は認められず、痛みの受容の異常ではないことが認められた。

さらに、全脳透明化によるArcの発現様式を三次元イメージング解析したところ、海馬でのD1Rの発現によるArcの発現様式に有意差は認められなかった。一方、体性感覚野や運動野を含む大脳皮質、視覚野を含む大脳皮質では、Arcの発現低下が認められた。

考察

受動的回避試験により、嫌悪記憶形成時にD1R発現が欠損した場合とD1R発現がある場合で試験成績に大きな差が認められたことから、嫌悪記憶形成にはD1Rを介する神経伝達機能が重要な役割を果していることが示唆された。この嫌悪学習試験の有意差が、痛み感受性ではなく、記憶学習の機能低下によるものであることも明らかとなった。また、Arc発現の三次元イメージング解析により、Dox非投与でD1Rが発現しているD1RKDマウスでは海馬及び大脳皮質でdVenusシグナルが高いことに対し、Dox投与後のD1R発現が欠損したD1RKDマウスでは大脳皮質におけるdVenusシグナルの低下が認められた。これらの結果からも、D1Rを介したドーパミン作動性神経伝達が、特に大脳皮質におけるArc発現への影響を通して、嫌悪記憶形成に重要な役割を果していることを示唆している。

結論

フットショックによる嫌悪記憶形成において、大脳皮質におけるArcの発現上昇がD1Rを介したドーパミン作動性伝達であるという確かな証拠は得られておらず、大脳皮質で発現するD1Rを介するドーパミン情報伝達が直接的にArcの発現に影響したのか、それとも、海馬を含む他の脳領域で発現されたD1Rを介するドーパミン情報伝達が間接的にArcの発現に影響したのかは、本研究では明らかにすることはできなかった。しかし、D1Rを介したドーパミン作動性伝達が嫌悪記憶形成に重要であり、D1R発現の欠損が大脳皮質におけるArc発現の低下に影響し、D1Rを介したドーパミン作動性神経伝達が大脳皮質ネットワーク内の神経活動を増加させ、嫌悪記憶形成を促進する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

ドーパミン神経伝達は、報酬に基づく学習だけでなく、回避学習においても重要な役割を果たしていると考えられている。ドーパミンD1受容体(D1R)及びD1R様受容体は、回避学習における海馬CA1領域のシナプス可塑性および長期記憶の形成に関連すると考えられている。本研究では、ドキシサイクリン(Dox)投与によりD1R発現を可逆的に制御できるD1Rノックダウン(KD)マウスを用いて、受動的回避試験による回避記憶形成におけるD1Rを介した神経伝達の役割を検討した。また、神経活動の指標としてよく用い

られる最初期遺伝子 Arc (activity-regulated cytoskeleton protein) の発現に着目し、Arc 遺伝子プロモーターにより蛍光タンパク質 dVenus が発現する Arc-dVenus トランスジェニックマウスと DIRKD マウスを交配した Arc-dVenus DIRKD マウスを用いて、回避性フットショック刺激後の全脳イメージングを行い、回避記憶形成時において Arc に発現誘導された dVenus の海馬と大脳皮質における発現分布を調べた。その結果、Dox 投与により DIR 発現を抑制すると、受動的回避試験の成績が低下し、また Dox 投与をしていない対照マウスと比較して、大脳皮質（視覚野、体性感覚野、運動野）で dVenus の発現低下が見られたが、一方、海馬では dVenus の発現低下は見られなかった。これらの結果は、DIR を介したドーパミン神経伝達が、特に大脳皮質における Arc の発現に影響を与えることで、回避記憶の形成に重要であることを示している。

本研究は、DIR を介したドーパミン神経伝達の新たな役割を明らかにしたものであり、博士論文としての価値を認めるものである。