## 博 士 論 文 の 要 旨 及 び 審 査 結 果 の 要 旨

| | |
|---|---|
| 氏名 | 飯島　友也 |
| 学位 | 博士（医学） |
| 学位記番号 | 新大院博（医）第 785 号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 博士論文名 | ドーパミン作動性細胞に発現する Otx2 の恐怖記憶における役割 |
| 論文審査委員 | 主査　教授　佐藤　昇 |
| | 副査　教授　竹林　浩秀 |
| | 副査　准教授　杉山　清佳 |

博士論文の要旨

【背景と目的】

外部からの刺激と連合した記憶は、神経細胞間のシナプス結合が可塑的に変化することによって形成される。特に、恐怖情動の記憶には扁桃体の可塑性が重要である。神経伝達物質の 1 つであるドーパミンは、シナプス結合の可塑性に影響を与え、記憶の形成と維持に関わると考えられている。一方、ドーパミンが恐怖記憶にどのように作用するのか、そのメカニズムには多くの疑問が残されている。扁桃体は、腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞による投射を受ける。腹側被蓋野ドーパミン作動性細胞の分化には、ホメオ蛋白質 Otx2 が寄与することが示唆されている。Otx2 は視覚経路において、外部刺激に応じた回路の可塑性に寄与する。これらの報告から、中脳辺縁系ドーパミン経路においても Otx2 が回路の可塑性に関与し、恐怖記憶に作用することが推測される。そこで本研究では、Otx2 を発現するドーパミン作動性細胞が恐怖記憶に与える影響について解析を行い、ドーパミン作動性細胞と Otx2 の記憶における作用を検討した。

【方法】

ドーパミン作動性細胞における Otx2 の発現は、Otx2 遺伝子座に lacZ 遺伝子が組み込まれたマウスを用いて確認した。また、ドーパミン作動性細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する DAT-Cre マウスと、loxP 配列で挟まれた Otx2 遺伝子座を持つ Otx2-flox マウスを掛け合わせることで、ドーパミン作動性細胞特異的な Otx2 欠損マウス(Otx2-flox/DAT-cre)を作成した。成体雄マウスを使用して、音と電気ショックを組み合わせた恐怖条件付けを行い、翌日からは音に対する恐怖行動の経時変化を解析した。さらに、腹側被蓋野と扁桃体においてチロシンヒドロキシラーゼ(TH)陽性のドーパミン作動性細胞、扁桃体において恐怖記憶に関与するコンドロイチン硫酸と Parvalbumin 陽性細胞を組織学的に検出した。行動解析および組織解析から得られた結果は、マウスグループ間で比較し統計解析を行った。

【結果】

申請者の解析から、Otx2 の発現は腹側被蓋野だけでなく、他領域のドーパミン作動性細胞にも広く発現された。ドーパミン作動性細胞特異的に Otx2 を欠損するマウス(Otx2-flox/DAT-cre)を作成すると、特に、腹側被蓋野を含む中脳領域に Cre が強く発現し、Otx2 の発現が抑制されることが確認された。腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞は、恐怖記憶に関与する脳領域に投射する。そこで、Otx2 の恐怖記憶に対する作用を検討するために、恐怖条件付け行動解析を行った。Otx2

欠損マウスは、コントロールマウスと同様に音に対して恐怖条件付けされ、恐怖行動(すくみ行動)を見せた。一方、24 時間後に音により恐怖記憶を想起させると、恐怖行動の割合が有意に低下した。さらに、恐怖記憶の消去学習から 1 週間後、コントロールマウスでは恐怖記憶の自発的回復が見られるが、欠損マウスでは回復しなかった。これらの結果から、ドーパミン作動性細胞における Otx2 の欠損により、恐怖記憶の想起及び、自発的回復が低下することが明らかになった。

これまでに、音と連合した恐怖記憶は、主に扁桃体基底外側核で統合されると考えられている。腹側被蓋野と扁桃体においてドーパミン作動性細胞を検出したところ、Otx2 欠損マウスでは扁桃体基底外側核の前側核へと投射するドーパミン線維が有意に減少することがわかった。さらに、恐怖記憶の自発的回復を促進するコンドロイチン硫酸、恐怖記憶の消去に関わる Parvalbumin も扁桃体基底外側核の前側核において減少した。一方、扁桃体基底外側核の後側核において一連の減少は検出されなかったことから、ドーパミン作動性細胞における Otx2 欠損は、扁桃体基底外側核の前側核に特異的な影響を与えることが示唆された。

【考察】

本研究ではドーパミン作動性細胞特異的な Otx2 の欠損により、扁桃体基底外側核の前側核においてドーパミン線維と機能分子の減少が見られた。近年、扁桃体基底外側核の前側核は恐怖記憶に関与する一方、後側核は報酬記憶に関わることが報告されている。前側核と後側核の応答のバランスにより恐怖記憶の強さが変化することから、Otx2 を発現するドーパミン作動性細胞は前側核の応答を促進し、恐怖記憶を増強することが推測された。Otx2 は胎生期において腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞の分化に寄与することが知られているが、生後においても扁桃体に入力するドーパミン線維の機能を保持する上で重要な役割を担うと考えられる。本研究の結果は、ドーパミン作動性細胞が入力した局所領域、あるいは標的細胞の性質により、ドーパミンがもたらす作用に違いが生じることを示唆している。

審査結果の要旨

外部からの刺激と連合した記憶は、神経細胞間のシナプス結合が可塑的に変化することによって形成され、恐怖情動の記憶の場合には扁桃体の可塑性が重要である。扁桃体は、腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞による投射を受けており、同細胞の分化には、ホメオ蛋白質 Otx2 が寄与することが示唆されている。そこで本研究では中脳辺縁系ドーパミン経路において Otx2 が恐怖記憶に与える影響について検討した。

ドーパミン作動性細胞特異的な Otx2 欠損マウス(Otx2-flox/DAT-cre)を作成し、音に対する恐怖行動の経時変化を解析し、さらに、腹側被蓋野と扁桃体において組織化学的な解析を行った。その結果、Otx2 欠損マウスは、コントロールマウスと同様に音に対して恐怖条件付けされ、恐怖行動(すくみ行動)を見せる一方、24 時間後に恐怖記憶を想起させると、恐怖行動の割合が有意に低下した。さらに、恐怖記憶の消去学習から 1 週間後、コントロールマウスでは恐怖記憶の自発的回復が見られるが、欠損マウスでは認められなかった。また Otx2 欠損マウスにおいては、扁桃体基底外側核の前側核へと投射するドーパミン線維が有意に減少することがわかった。さらに、恐怖記憶の自発的回復を促進するコンドロイチン硫酸、恐怖記憶の消去に関わる Parvalbumin も扁桃体基底外側核の前側核において減少した。これらの結果から、ドーパミン作動性細胞における Otx2 は、恐怖記憶の想起及び、自発的回復に重要な役割を果たすことが示唆された。

以上、中脳辺縁系ドーパミン経路において Otx2 が恐怖記憶の想起及び自発的回復に重要な役割を果たすことを示した点に学位論文としての価値を認める。