

# 研究報告書

## 「情動記憶形成と消去を担う扁桃体局所回路の制御機構の解明と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 渡部 文子

### 1. 研究のねらい

情動は、認知・意欲などの発現に深く関与すると共に、危険な場所や刺激を記憶・学習することで、私達の生存維持に重要な役割を担います。一方その異常は、心的外傷後ストレス症候群(PTSD)や不安障害 などにも直結し、現代のストレス社会において、今後益々大きな社会問題となることが予想されます。扁桃体はこれら情動発現や情動依存的学習に中心的役割を担うことが知られています。扁桃体依存的学習である「恐怖条件付け」と「消去 (extinction)」は、トラウマによる恐怖体験からの回復や治療法の開発などに直結することが期待され、特に近年、活発に研究が進められています。しかしながら、その多くは分子生物学的あるいは行動学的解析が中心であり、生理学的解析は大きく遅れているのが現状です。

そこで本研究では、まず情動記憶の基盤となる扁桃体シナプス伝達の制御機構を電気生理学的手法により明らかにすることをねらいます。さらに、情動記憶にこれら局所回路機能制御がどのように関与するかを検討するため、蛍光分子を発現する遺伝子改変マウスを用い、恐怖条件づけおよび消去により活性化された細胞群を可視化します。これらの細胞群が同一なのか重複するのか、興奮性細胞なのか抑制性なのか、どのような機能修飾を受けるのか、などを可視化された細胞から直接電気生理学的応答を記録することにより詳細に検討します。本研究計画により、扁桃体内の神経活動から読み出した情報を操作し、そのアウトプットを個体レベルで検討することで、情動記憶の形成を制御する神経機能を明らかにすることがねらいです。本研究成果により、PTSD やパニック障害などの精神疾患の治療法開発につながる基礎的知見を得ることが期待され、さらには加齢に伴う情動記憶の障害、リハビリテーションにおける情動刺激の効果的活用法など、様々な応用の可能性も広がります。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

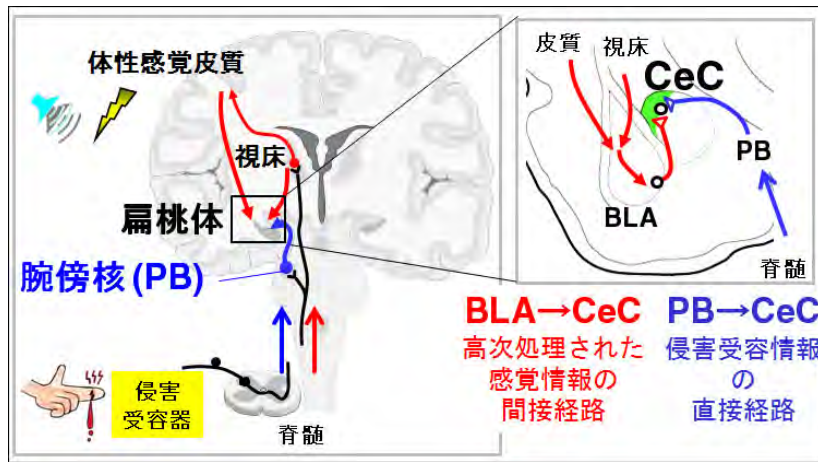
扁桃体の中でも外側外包中心核(CeC)は痛み扁桃体とも呼ばれ、痛み侵害受容刺激の中継核である腕傍核 (lateral parabrachial nucleus: PB)から直接的に入力を受けることが知られています。一方、CeC は扁桃体基底外側核 (BLA)からも入力を受けることから、CeC は、痛みの直接経路としてのPB入力と、皮質や視床で高次の処理を受けた間接経路としてのBLA入力という、異なる二経路の連合の場とみなすことができます。今回私達は、これら二経路のシナプス伝達が、恐怖記憶形成依存的に顕著なシナプス増強を起こすことを見出しました。さらにこの二経路のシナプス伝達は恐怖記憶形成後においてのみ有意な相関を示したことから、連合学習による異シナプス間相互作用が強く示唆されます。従来の研究では、恐怖記憶形成には視床や皮質から扁桃体外側核(LA)への径路が中心的に研究されてきましたが、今回の

研究では扁桃体中心核に焦点をあて、橋の腕傍核という原始感覚入力の可塑性が恐怖記憶形成によって制御されることを示すことに成功しました(Mol. Brain. *In press*)。これらの結果から、扁桃体中心核を痛みという「侵害受容」シグナルに「負情動」という情動的価値を付加する「連合の場」として捉えることができました。

(2) 詳細

研究テーマA「恐怖記憶形成を制御する扁桃体神経回路機構の解析」

恐怖記憶形成の研究に広く用いられる恐怖条件付けは、音などの条件刺激(CS)と痛みなどの無条件刺激(US)との連合学習です。USとして用いられる「痛み」という侵害受容シグナルは、脊髄後角もしくは三叉神経脊髄路核を経て視床を経由し、痛みの感覚成分を視床や皮質に伝えます(図赤矢印)。これら皮質および視床から扁桃体外側核(LA)などへのシナプス

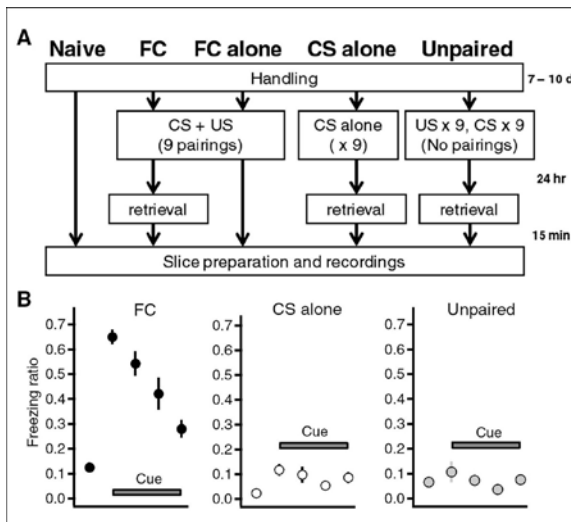


入力が、恐怖条件付けにおけるCS-US連合の分子基盤として、世界中で活発に研究されてきました。

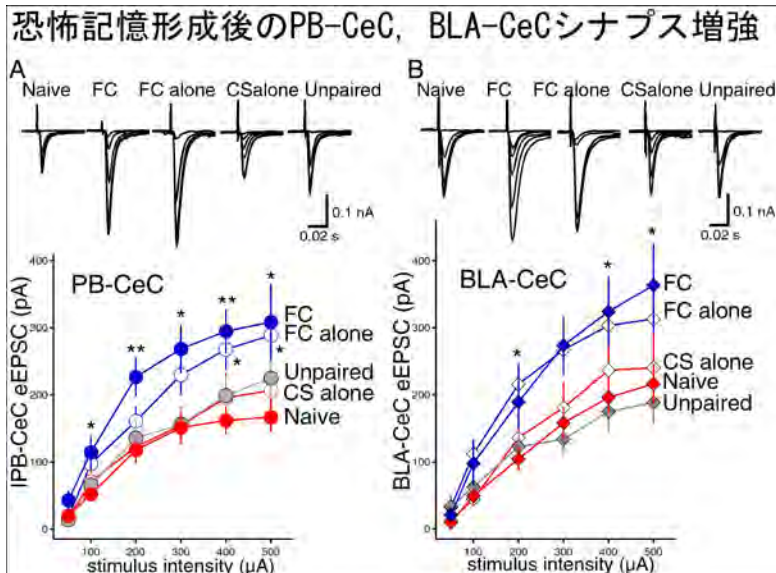
では、無条件刺激はなぜ「無条件に」負情動を喚起するシグナルとして働くのでしょうか？ USで

ある侵害受容シグナルのより直接的な経路として、脊髄後角から橋の腕傍核(PB)を介して扁桃体CeCに直接入力する経路があります(図青矢印)。この経路は様々な急性および慢性疼痛モデル動物においてシナプス可塑性を示すことも報告されています。そこで、私達はPB-CeC経路は痛みの情動成分を表現するのかもしれないと考えました。そしてCeCを、痛みの直接経路としてのPB入力と、皮質や視床で高次の処理を受けた間接経路としてのBLA入力という異なる二経路の「連合の場」として捉え直すことにしました。具体的には、

これら二経路のシナプス伝達が恐怖記憶形成後にどのような修飾を受けるのかを検討する目的で、以下の5群のマウスを設定しました(右図A); naive群、FC群、FC alone群、CS alone群、Unpaired群。FC alone群は連合学習は行わすが、スライス調整直前のretireval(恐怖記憶の想起)テストは行わない群。CS alone群は連合学習時に条件刺激である音(CS)のみ聞かせ、痛み刺激は与えずに翌日想起テストを行う群。Unpaired群はケ-



ジに入れた瞬間に無条件刺激である痛み刺激(US)を与え、終わってから CS を与えるため、連合学習は成立しない群。以上の群のうち想起テストを行った群の結果は、FC 群のみ強い Freezing を示し、CS alone 群および Unpaired 群では殆ど示しませんでした。以上 5 群から調整した脳切片を用いて CeC シナプス伝達特性を詳細に比較検討したところ、IPB-CeC および



BLA-CeC シナプスともに、FC 群および FC alone 群において naive 群に比べ有意に亢進したシナプス応答を示した一方、CS alone 群および Unpaired 群は naive 群と変わりませんでした。これらのシナプス増強にはシナプス前終末の放出確率増大によるシナプス増強が起こっていることが示唆された一方、シナプス後細胞における AMPA 応答の増大、および NMDA 受容体のキネティクスの変化も示唆されました。

さらにこの二経路のシナプス伝達には FC 後においてのみ有意な相関を示したことから、連合学習による何らかの異シナプス間相互作用が強く示唆されました。

以上の結果から、恐怖条件付けによる連合学習依存的に CeC のシナプス増強が誘導され、さらにそこには IPB-CeC および BLA-CeC 異シナプス間相互作用が関与することが示されました。今回の結果から、扁桃体中心核は高次処理されたマルチモーダルな感覚情報という環境シグナルに、「負情動」という情動的価値を付加する「連合の場」として機能することが示唆されます。

#### 研究テーマ B「活動依存的可視化マウスの作製と解析」

情動記憶形成に扁桃体の局所回路機能制御がどのように関与するかを検討するため、活動依存的に蛍光分子を発現する遺伝子改変マウスの作製を、新潟大学崎村建司先生との共同研究により行いました。研究開始時点での予定よりも大幅に遅れていますが、現在順調に繁殖を進めています。目的の遺伝子を持つマウスが得られ次第、活動依存的マーカー陽性細胞および陰性細胞から直接電気生理学的解析を行うことで、より詳細な恐怖記憶形成の神経回路制御機構の解明を目指します。

### 3. 今後の展開

本さきがけ研究の結果から、恐怖記憶形成依存的に CeC のシナプス増強が誘導されることが示され、扁桃体中心核を新たな連合の場として捉えることができました。しかしながら、IPB 入力 が可塑性を持つことは、情動記憶形成を信頼性よく制御するためには、一見むしろ有害であるように思えます。この疑問に答えるため、今後は CeC シナプス増強の生理的意義を、行動学的手法や活動依存的可視化マウスなどを組み合わせて検討してゆきます。また、慢性疼痛モデルマ

ウスでも CeC シナプス増強が報告されていますが、情動障害を伴う精神疾患の罹患率は、痛みなどのストレスを慢性的に持つ人で有意に高いことが知られています。これらの報告と本研究結果から、情動記憶形成と慢性疼痛形成のメカニズムとには密接な相互作用があることが示唆されます。今後はこの問題に行動学的手法や可視化マウスを用いて取り組み、より生理的条件下に近い情動記憶制御機構の理解に近づくことを目指します。CeC は抑制性神経細胞や様々な神経ペプチドを豊富に含む点で、従来着目されてきた LA や BLA とは大きく性質が異なります。今回見出した CeC シナプス可塑性の制御機構を分子から個体レベルまで一貫して解析することで、精神疾患などの新たな治療法開発につながる基礎的知見を得ることが期待されます。

#### 4. 自己評価

研究開始当初の目標としていた可視化マウスの解析までに至らなかったのが最大の反省点です。マウスは現在繁殖中であり、今後順次解析予定です。一方、さきがけ研究提案時には従来と同様の扁桃体外側核を主眼とした神経回路解析を予定していましたが、研究期間中に CeC における CS-US の連合という、全く新たな視点を獲得して成果をあげることができたのが大きな収穫でした。扁桃体中心核には様々な原始感覚入力があることは報告されていましたが、さきがけ研究によって、恐怖記憶形成という連合学習を CeC における PB シグナルと BLA シグナルとの連合という切り口で捉えることに成功しました。したがって、当初とは視点が異なるものの、恐怖記憶形成を制御する扁桃体神経回路機構の解析という目標は達成できたと考えます。さきがけ研究期間中にこのような新たな芽を育てることが出来た点で満足度は高い一方、むしろ新たな疑問も多く生じました。IPB シナプス可塑性はなぜ必要なのか？恐怖記憶形成と下向性抑制との関係は？CeC シナプス増強と疼痛閾値制御との時間的相関は？これらの疑問に答えるため、今後は行動学的手法と可視化マウスを用いた神経生理学的手法、生化学的手法、光操作などを用いて研究を進めてゆくことで、「脳情報の解読と制御」の「制御」の部分を達成したいと思っています。

本さきがけ領域において、分野をまたぐ多くの仲間たち、研究総括やアドバイザーの先生方と議論が出来たことが、研究者として成長する大きな糧となりました。心より感謝いたします。

#### 5. 研究総括の見解

課題はほぼ達成された。研究成果に基づいて提案された仮説は興味深い。情動の制御に大脳が関与する場合に、BMI 技術で情動を制御することも可能となると考えられ、今後の BMI の展開の基礎として寄与することが期待される。

扁桃体は情動発現や情動依存的学習に中心的役割を担う。「情動」は BMI 技術適用の上で避けて通れない重要な課題である。分子生物学的、行動学的には多くの研究があるが、そのメカニズムの解明には至っていない。本研究は、扁桃体依存的学習である「恐怖条件付け」と「消去 (extinction)」に注目し、情動記憶の基盤となる扁桃体シナプス伝達の制御神経回路を明らかにした。

扁桃体のうち、外側外包中心核 (CeC) ニューロンは、2 つの経路の入力を受ける。1 つは、侵害受容刺激 (痛み) の中継核である腕傍核 (PB) からの直接的な侵害受容入力、他方扁桃体基底外側核 (BLA) から大脳などを介した間接的な侵害受容入力である。この 2 経路のシナプス伝達が恐怖記憶形成依存的に顕著なシナプス増強を起こすこと、この 2 つの経路のシナプス伝達

は恐怖記憶形成後においてのみ有意な相関を示したことから、連合学習による異シナプス間相互作用がこの2経路の入力シナプス間に存在し、PBからの直接的な侵害入力によって大脳を介して可塑的に制御されることを示した(Mol. Brain. 6:11, 2013)。このことから、扁桃核 CeC 核は痛みという「侵害受容」シグナルに「ネガティブな意味」を持つ情動的価値(負情動)を付加する「連合の場」であることを提案した。

CeCに注目し、恐怖記憶学習に際して、侵害性入力、大脳の制御を受けるメカニズムの1つを示したもので、情動の神経機構にとって重要な発見であると考えられる。可視化マウスの実験が現在、順調に進んでおり、3月末の研究期間終了までに、さらに多くの知見が得られることが期待される。この研究を含め、情動の基礎研究は進みつつあり、これらのメカニズムを踏まえたBMI技術の今後のさらなる展開が期待される。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. <b>Watabe, A.M.*</b> , Ochiai, T., Nagase, M., Takahashi, Y., Sato, M., and Kato, F. Synaptic Potentiation in the Nociceptive Amygdala Following Fear Learning in Mice. <i>Mol. Brain</i> (2013) in press   |
| 2. Kato, H.K, Kassai, H., <b>Watabe, A.M.</b> , Aiba, A., and Manabe, T. Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP3 receptor and L-type Ca <sup>2+</sup> channel in mouse CA1 pyramidal cells. <i>J. Physiol.</i> (2012) 590:3019-34  |
| 3. Nomoto, M., Takeda, Y., Uchida, S., Mitsuda, K., Enomoto, H., Saitoh, K., <b>Watabe, A.M.</b> , Kobayashi, S, Masushige, S., Manabe, T., Satoshi Kida S. Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity. <i>Mol. Brain</i> (2012) 5 (8)                                       |
| 4. Arima-Yoshida, F., <b>Watabe, A.M.</b> , Manabe, T. The mechanisms of the strong inhibitory modulation of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. <i>Eur J Neurosci.</i> (2011) May;33(9):1637-46.   |
| 5. Moody, T., <b>Watabe, A.M.</b> , Indersmitten, T., Noboru H. Komiyama, N.H., Grant, S.G.N., and Thomas J. O'Dell T.J. $\beta$ -Adrenergic Receptor Activation Rescues Theta Frequency Stimulation-Induced LTP Deficits in Mice Expressing C-Terminally Truncated NMDA Receptor GluN2A Subunits. <i>Learning and Memory</i> , 18: 118–127 (2011) |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件



(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

- 1, Ayako M. Watabe “Synaptic Potentiation in the Nociceptive Amygdala Following Fear Learning in Mice” NIPS International Workshop 2012; Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link (Okazaki, Japan), 2012/9/13-15 (招待講演)
- 2, Kato F, Takahashi Y, Watabe AM. Chronic pain-induced morphofunctional plasticity in the nociceptive amygdala. *Gordon Research Conference*, “Amygdala in health and disease” ME, USA 2011 July (選抜式学会発表)

著作物

- 1, 渡部文子、真鍋俊也 (2012). 神経可塑性「シグナル伝達キーワード事典」山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司(編)(羊土社)pp.266-273.