

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～ 2009

課題番号：19390309

研究課題名（和文）NMDA 受容体 NR2B 受容体サブユニットを中心とした恐怖学習のメカニズム

研究課題名（英文） The mechanism for fear learning concerning NMDA receptor NR2B subunit.

研究代表者 辛 龍文 (SHIN RYONG-MOON)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：40443064

研究成果の概要（和文）：扁桃体シナプスでは LTP プロトコールに脱分極がなければプレ側のカイニン酸受容体活性による LTP のみが誘導され、一方脱分極があれば、ポスト側の NMDA 受容体活性による LTP のみ誘導される。 LTP 誘導時、ポストから内因性カンナビノイドが放出され、ポスト型 NMDA 受容体依存性 LTP がプレシナプス型 LTP を抑制する現象が確認された。すなわち、同一シナプスに LTP には、このようなヒエラルキーが存在し、これは学習した恐怖の情報処理に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）： We show that two distinct forms of LTP could be induced at amygdale synapses with an identical stimulation protocol depending on the level of postsynaptic membrane polarization. One form of LTP, resulting from pairing of postsynaptic depolarization and presynaptic stimulation, is induced by the activation of postsynaptic NMDA receptor, while same stimulation in the absence of postsynaptic depolarization leads to LTP, which is induced by the activation of presynaptic kainite receptor. There is a defined hierarchical order, such that presynaptic LTP is suppressed when postsynaptic LTP is induced by activation of CB1 receptors by endogenous cannabinoids released from postsynaptic cell. These results describe a previously unknown mechanism for the hierarchy of co-existing forms of LTP, possibly reflecting the hierarchy of memories for the previously experienced fearful events according to their aversiveness level.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 10,200,000 | 3,060,000 | 13,260,000 |
| 2008 年度 | 2,100,000  | 630,000   | 2,730,000  |
| 2009 年度 | 2,300,000  | 690,000   | 2,990,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 阪神大震災以後、PTSD という言葉は注目され、引き続き起こった各児童殺傷事件で児童やその保護者に対するケアが急務となり、PTSD への病態解明及び治療は社会的急務となっている。PTSD の病態は未だ解明されていないが、仮設として情動に関わる部位（扁桃核）を制御する部位（前部帯状皮質）に機能不全が示唆されている。しかし元来 PTSD の概念はベトナム戦争で悲惨な体験をした兵隊の精神的後遺症から始まり、同症状がレイプの被害者や自然災害の被災者にも現れ、病名として確立された。このように PTSD は純粋な外傷性精神障害で、環境因子としてのストレスが生体に与える影響を検討することがその病態の理解を深め、そこから得られた知見が新たな治療への道筋を見出し、臨床医学へフィードバックされるであろう。

(2) 動物を用いる恐怖記憶の研究は行動パラダイムとして“恐怖条件づけ学習”が主に利用されてきた。これは生体にとって音のような無害な刺激と電気ショックのような有害な刺激を同時に与えると、その後音に対してあたかも電気ショックを受けたかのような反応する。これまでの研究により恐怖条件づけ学習の成立には扁桃核が必須で、実験動物を用いると多様な実験手法が可能ため、げっ歯類を用いた心的外傷のモデルとしてこれまで多くの研究がなされてきた。

(3) 学習の獲得及び保持においては神経回路内におけるシナプス伝達効率の変化と継続が基礎と考えられていて、恐怖条件づけ学習を獲得させたラットの扁桃核外側核でもシナプス伝達効率の亢進が認められ、これはシナプス伝達の長期増強 LTP と同等であると結論付けられた。すなわち扁桃核外側核 LTP は恐怖条件づけ学習における記憶の形成と保持の基盤となっているため、扁桃核 LTP の研究は恐怖条件づけ学習のメカニズムの解明につながる。

(4) 申請者は細胞骨格制御に関わるリン酸化蛋白、stathminが扁桃核外側核に特異的に発現し、恐怖条件づけ学習の獲得、保持や扁桃

核外側核のLTPに必須であることを、遺伝子欠損マウスを用いて明らかにした。この知見は恐怖条件づけ学習の獲得過程で細胞骨格を介してシナプスの構造変化が起こり、次いで樹状突起の進展や短縮もしくは可動性の変化が起こり、その結果としてLTPが形成される分子機構が示唆される。すなわち扁桃核外側核ではNMDA受容体NR2Bサブユニットのカルシウム流入が契機とした一連のシグナルが細胞骨格制御に関わり不可逆的な樹状突起の構造変化が起こり、LTPと言う形で堅固な恐怖条件づけ学習が獲得されると考えられる。

現在、PTSDなどの不安症への薬剤としてベンゾジアゼピン系が最もよく使用されるが、これは扁桃核への抑制を強化させるという間接的な機構のためであります。扁桃核の興奮そのもの(LTP)への直接的なターゲットは未だ見出されず、これには恐怖条件づけ学習の基盤である扁桃核LTPの誘発までの詳細な機構が解明されて始めて明らかになります。

## 2. 研究の目的

(1) 扁桃核LTP誘発におけるNMDA受容体NR2Bサブユニットの役割の解明

①NMDA 受容体 NR2A, B サブユニットのシナプスでの分布（シナプス内外）を電気生理学手法と蛍光イメージングを用いて調べる。

②NMDA 受容体 NR2A, B サブユニットの活性によるカルシウム流入について蛍光イメージングを用いて比較検討する。

③LTP 誘発前後で樹状突起の形態変化や可動性の獲得もしくは喪失について蛍光イメージングを用いて調べる。

(2) LTP 誘発におけるメカニズムの確認のため恐怖条件づけ学習を獲得させたラットの樹状突起の形態変化や可動性について蛍光イメージングを使い、対照と比較検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Sprague Dawley ラット 3-4 週齢を苦し

みなく断頭し、全脳を直ちに冷却しパイプロトームで扁桃体外側核を含んだ急性切片を切り出す。

①Whole-cell patch clamp 法を用いて、シナプス伝達の可塑性の誘導に関与する受容体を調べるため、薬理学的実験を行う。採用する LTP 誘発プロトコールは 20Hz で 2 回を 2 Hz, 240 回に -70mV から +40 mV へ膜電位を上昇させる。

②Whole-cell patch clamp 法を用いてポストシナプス側の細胞に選択的にカルシウム指示薬を注入し、LTP 誘発プロトコール下でカルシウムイメージングを実行する。

(2) 恐怖条件付け学習を獲得させたラットの急性切片を作成し、カルシウムイメージングや樹状突起の形態を比較検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) LA シナプスでの pre-LTP

①LA シナプスでの高頻度刺激 (ポストシナプス側の脱分極なし) による長期増強 (LTP) が誘導できた。

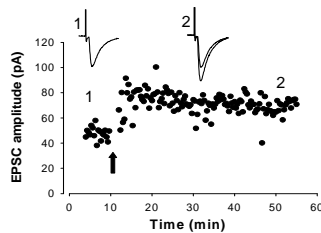


図1 LA シナプスでの pre-LTP

②①で生じた LTP の誘導機構を検索した。カルシウムキレート剤である BAPTA を whole-cell にて神経細胞内へ注入し、ポストシナプス側の細胞内カルシウムシグナルを止めて、LTP 誘導の有無を確認した。また膜透過性カルシウムキレート剤である BAPTA-AM を還流液により作用させてプレ・ポスト側のカルシウムシグナルを止めて LTP 誘導の有無を確認した。図2のように BAPTA では LTP 誘導は抑制されなかったが、BAPTA-AMにより LTP 誘導は抑制された。すなわちプレシナプス側のカルシウムシグナルが LTP 誘導に必要であった。

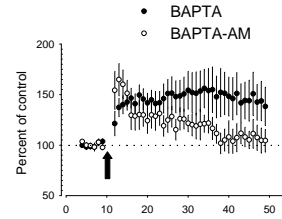


図2 カルシウムキレートによる LTP 誘導

③LTP を各グルタミン酸受容体拮抗剤にてその誘導が抑制されるかを確認した。代謝性グルタミン酸受容体拮抗剤 MCPG、NMDA 受容体拮抗剤 D-AP5、カイニン酸受容体拮抗剤 UBP296 で抑制効果を確認した。図3のように UBP296 のみで LTP は抑制できた。

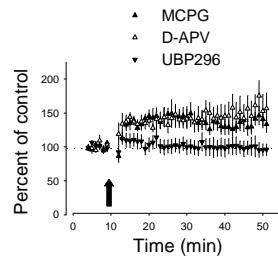


図3 グルタミン酸受容体拮抗剤による LTP 誘導実験

##### (2) pre-LTP の表現系

一般にシナプス可塑性は神経伝達物質の放出頻度の亢進 (プレ)、もしくは AMPA 受容体の機能更新 (ポスト) のどちらかで表現されうる。これを検討するためシナプスのみを記録する unitary recording を行った。刺激電極は非常に細く作成し、テスト刺激で 50% 程度の頻度で興奮性後シナプス電流 (EPSC) が発生するように刺激強度を設定する (図4)。そこで LTP プロトコールに従い、LTP を誘導させる。

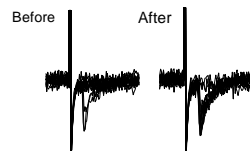


図4 LTP 誘導前後での EPSC

その結果、LTP 誘導後 EPSC の発生頻度は 50%より上昇した (図 4, 5)。図 6 では failure rate が減少し、EPSC の振幅は LTP 誘導前後では変化が見当たらなかった。

このような結果より pre-LTP の表現系は神経伝達物質の放出頻度が上昇するプレ型と考えられる。

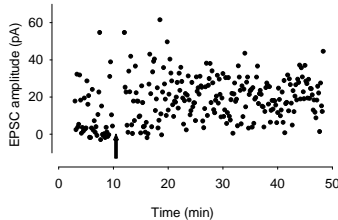


図 5 unitary recording による LTP

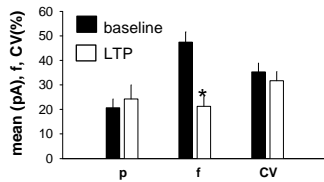


図 6 LTP による振幅 (p) や failure rate.

### (3) LA シナプスでの post-LTP

① LA シナプスでの高頻度刺激とポストシナプス側の脱分極による組み合わせのプロトコールにより LTP が誘導できた。

BAPTA を神経細胞内へ注入し、ポストシナプス側のカルシウムシグナルを抑制すると LTP は誘導されなかった。

この結果よりこのタイプの LTP はポストシナプス側のカルシウムシグナルによる LTP と考えられた。

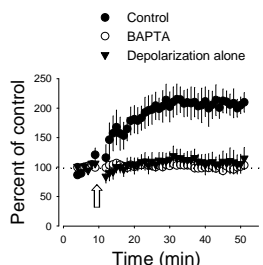


図 7 カルシウムキレートによる post-LTP の誘導

② post-LTP を各グルタミン酸受容体拮抗剤、UBP296、D-AP5 及び L-タイプカルシウム拮抗剤 nitrendipine を用いて抑制効果を調べた。UBP296 では抑制できず、D-AP5 部分的に更に nitrendipine を加えて完全に抑制された (図 7)。

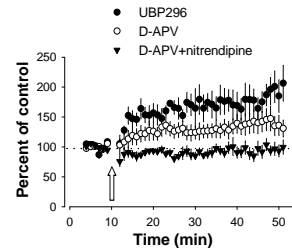


図 7 post-LTP の性質

### (4) pre-, post-LTP のヒエラルキー : post-LTP が pre-LTP 誘導を抑制する

これまでの実験結果よりタイプの異なる LTP が生じる時、一方が他方を抑制するいわゆる“ヒエラルキー”の存在が考えられた。このメカニズムを薬理的に検討した。

図 1 で認められた脱分極なしで誘発される LTP は内因性カンナビノイドのアナログである anandamide で抑制された (図 8)。

更に内因性カンナビノイドが放出部位を特定するため以下のような実験をおこなった。

内因性カンナビノイド受容体タイプ 1 拮抗剤である AM281 下で、細胞内へ BAPTA を注入し、脱分極を加えた高頻度刺激にて LTP の誘導を試みた。その結果、誘導が可能で、それは UBP296 で抑制された (図 9)。すなわち内因性カンナビノイドはポストシナプスの脱分極によりポストシナプス側から放出されプレシナプスへ作用し、そこで生じる pre-LTP を抑制すると考えられた。

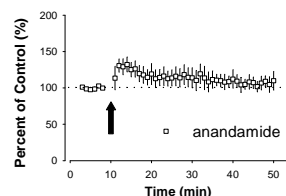


図 8 内因性カンナビノイドによる pre-LTP 抑制

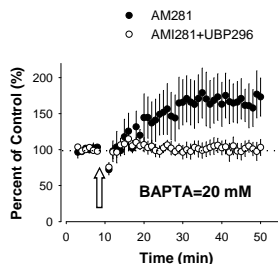


図9 ポストシナプスからの内因性カンナビノイドの放出

研究の主な成果：本研究からこれまでポストシナプス側の NMDA 受容体依存性 LTP が付加的なプレシナプス側の LTP を抑制し、その中で内因性カンナビノイドが中心的役割を演じている事がわかった。従来カンナビノイドは人類の長い歴史の中で心の安定を図る薬物として利用され、最近では不安症の薬物治療や、恐怖記憶を消去する過程で重要な役割を演じている事が解ってきている。この意味からもストレス応答の中心的部位である扁桃体でのシナプス伝達の内因性カンナビノイドの作用機序が解明されたのは非常に意味があると考えられる。

また神経科学的にシナプスに共存する LTP 同士は一方が他方をコントロールするというヒエラルキーが存在することは非常に興味深く、シナプスの研究に影響を与えようである。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

- ① 辛 龍文 Ghost LTP in the Amygdala 12<sup>th</sup> POSTECH Brain Winter School. POSTECH Brain Research Center. Neuronal control on animal behaviors. Feb 4 2010. Pohang University of Science & Technology (POSTECH), Pohang, South Korea
- ② 辛 龍文 Hierarchical Order of Synaptic Plasticity in Amygdala 第115回 神経科学セミナー 2009年9月14日 三重大学医学部
- ③ 辛 龍文 Synaptic mechanism for Fear memory 大学院セミナー2009年2月24日 上海交通大学 生命科学技术学院

- ④ 辛 龍文 Synaptic mechanism for Fear memory 第104回 神経科学セミナー 2008年1月29日 三重大学医学部

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辛 龍文 (SHIN RYONG-MOON)

独立行政法人放射線医学総合研究所

分子イメージング研究センター

主任研究員

研究者番号：40443064

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

樋口真人 (HIGUCHI MAKOTO)

独立行政法人放射線医学総合研究所

分子イメージング研究センター

チームリーダー

研究者番号：10373359

須原哲也 (SUHARA TETSUYA)

独立行政法人放射線医学総合研究所

分子イメージング研究センター

グループリーダー

研究者番号：90216490

管野 巖 (KANNO IWAO)

独立行政法人放射線医学総合研究所

分子イメージング研究センター

グループリーダー

研究者番号：10360356