

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500462

研究課題名(和文) 情動記憶の消去における扁桃体神経回路制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of extinction of emotional memory by amygdaloid neural circuits

研究代表者

三輪 秀樹 (Miwa, Hideki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80468488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：GABA作動性ニューロンを蛍光タンパク質Venusで標識したトランスジェニックマウス(VGAT-Venusマウス)を用いて、扁桃体GABA作動性ニューロンの化学マーカー(特に神経ペプチド)による免疫組織化学的解析を行った。その結果、ソマトスタチン(SST)陽性および血管作動性小腸ペプチド(VIP)陽性神経終末様シグナルが扁桃体中心核に特に観察された。扁桃体中心核は扁桃体からの出力であり、SST、VIPは各GPCRを介して抑制性・興奮性シグナルを行うことが知られていることから、神経ペプチドにより恐怖記憶の消去機構に独自の調節を行っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus transgenic mice, in which GABAergic neurons are labeled with the Venus fluorescent protein, the immunohistochemical characterization of GABAergic neurons in the amygdala was performed. As a result, nerve terminal-like signals of somatostatin (SST) and vasoactive intestinal peptide (VIP) in the central nucleus of the amygdala were observed. These results suggest that SST and VIP have unique roles in regulation of extinction of fear memory.

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：扁桃体 GABA作動性ニューロン Ca²⁺結合タンパク質 神経ペプチド 情動 記憶 消去

1. 研究開始当初の背景

動物は身の危険を感じた出来事や場所を記憶することで外界のシグナルを脳内に再構成し、価値判断に利用することで以後の行動を規定したり、環境に応じてその価値判断を動的に変化させたりして自身の生命の安全を確保してきた。しかし、このような恐怖などの情動記憶制御システムが過度のストレスにより破たんされ、心的外傷後ストレス障害 (post-traumatic stress disorder: PTSD) などの精神疾患の原因となると考えられている。

恐怖記憶の制御機構を評価する行動学実験として音恐怖条件づけ学習がある。この学習試験では、音など単独では恐怖反応をおこさない中立的な刺激 (条件刺激、conditioned stimulus: CS) とすくみ行動などの恐怖反応を引き起こす電気ショック (無条件刺激、unconditioned stimulus: US) を対呈示すると、その後 CS 単独でも恐怖反応をおこし「情動学習」が成立する。さらに一度獲得された記憶も、その後 CS のみを呈示し続けることで「消去」されることが知られている。これらの情動学習・消去に関わる脳領域として、扁桃体と内側前頭前野 (medial prefrontal cortex: mPFC) がある。

扁桃体は恐怖などの情動に関連した情報の処理・記憶と情動反応の表出に関わると考えられている。また、扁桃体は外側核、基底外側核、中心核や介在核 (intercalated nucleus: ITC) など複数の亜核から構成され、解剖学・組織学的に複雑な構造をもち、ニューロンの層構造が見られる海馬、小脳皮質や大脳皮質と比較すると研究がなかなか進まなかった。一方で、mPFC は「消去」に重要な役割を果たしており、ITC へのトップダウン的制御により、扁桃体による恐怖記憶発現を抑制していると考えられており (Quirk & Mueller, 2008) 申請者は消去機構の解明には、mPFC と扁桃体神経回路とのゲートの役割を担う ITC の研究が必須であるという考えに

至った。しかしながら、(1) ITC ニューロンは GABA 作動性ニューロンであり、生標本では識別が困難である、(2) シナプス伝達・可塑性の分子過程の詳細な解析には急性脳スライス標本が有効だが、異なる脳領域間のシナプス伝達を解析する際に電気刺激する神経線維が着目する脳領域からの神経線維であることを同定することは極めて困難である、という理由から研究がほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、連携研究者の柳川右千夫から GABA 作動性ニューロンを蛍光タンパク質で標識できる遺伝子改変マウス (VGAT-Venus マウス) の提供を受け、さらにチャンネルロドプシン 2 を組み込んだアデノ随伴ウィルスベクター (AAV-ChR2) を mPFC に接種し、急性扁桃体スライス標本を作製し、光刺激することにより mPFC からのシナプス入力のみを誘発し ITC ニューロンからシナプス応答を測定することで上記の問題を解決し、ITC ニューロンという「ゲート」を介した「内側前頭前野による扁桃体神経回路の制御機構」を解明することを目標とする。

3. 研究の方法

扁桃体 GABA 作動性ニューロンのサブタイプの分類を行うために、VGAT-Venus マウスを利用して、GABA 作動性ニューロンの代表的な化学マーカーである神経ペプチド [ソマトスタチン (SST)、血管作動性小腸ペプチド (VIP)、コレシストキニン (CCK)] の分布を解析するため、免疫組織学的解析を行った。

光刺激を行うシステム (Optogenetic) 構築のため、チャンネルロドプシン 2 (ChR2) 発現トランスジェニックマウスを用いて、急性海馬スライス標本および動物個体を用いて、条件検討を行った。

4. 研究成果

GABA 作動性ニューロンを蛍光タンパク質 Venus で標識したトランスジェニックマウス (VGAT-Venus マウス) を用いて、扁桃体 GABA 作動性ニューロンの化学マーカー (特に神経ペプチド) による免疫組織化学的解析を行った。その結果、ソマトスタチン (SST) 陽性および血管

作動性小腸ペプチド (VIP) 陽性神経終末様シグナルが扁桃体中心核に特に観察された。扁桃体中心核は扁桃体からの出力であり、SST、VIP は各 GPCR を介して抑制性・興奮性シグナルを行うことが知られていることから、神経ペプチドにより恐怖記憶の消去機構に独自の調節を行っている可能性が示唆された。光刺激システムは購入した LED の強さが弱いことや発現している細胞と光刺激している点と距離など技術的な問題を把握でき、現在解決に向けて取り組んでおり、克服できる見込みができています。今後、研究成果で報告した扁桃体中心核に投射している SST 細胞および VIP 細胞の脳内での正確な位置を解析したのち、光刺激することで恐怖記憶の消去機構の解明を進める予定である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Megumi Oka, Yukiko Sekine, Yumi Sato, Chihiro Saruta, Hideki Miwa, Mika Tanaka, Shigeyoshi Itoharu, Teiichi Furuichi: Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(51): 21104-21109, 2012. 査読有
Ken Kobayashi, Hideki Miwa, Masato Yasui: Progesterone maintains amniotic tight junctions during midpregnancy in mice. *Mol Cell Endocrinol.* 337: 36-42, 2011. 査読有

[学会発表](計9件)

柴崎貢志、山田勝也、三輪秀樹、富永真琴、石崎泰樹：恒温動物の神経興奮を規定する分子基盤；温度センサーTRPV4 による脳内温度の感知 Neuro2013 (2013年6月20日、京都) 査読無
原宏士朗、藤枝智美、入江智彦、三輪秀樹、岡淳一郎、白尾智明、花尻(木倉)瑠理、合田幸広、栗原正明、関野祐子：光学測定法によるマウス扁桃体外側核の神経応答に対するカンナビノイド類の作用の解析 Neuro2013 (2013年6月21日、京都) 査読無
藤原和之、三輪秀樹、三國雅彦、柳川右

千夫：GAD67 ヘテロノックアウトマウスの行動解析 Neuro2013 (2013年6月21日、京都) 査読無

松本圭史、三輪秀樹、片山圭一、山田一之、小田川摩耶、野崎弥生、柳川右千夫、有賀純：恐怖記憶形成における Slitrk4 の役割 Neuro2013 (2013年6月22日、京都) 査読無

三輪秀樹、柳川右千夫：小胞型 GABA トランスポーター(VGAT)-Venus トランスジェニックマウスを用いた扁桃体基底外側核群 GABA 作動性ニューロンの免疫組織化学的分類 Neuro2013 (2013年6月22日、京都)

Kazuyuki Fujihara, Hideki Miwa, Masahiko Mikuni, Yuchio Yanagawa: Behavioral characterization of glutamate decarboxylase 67 (GAD67) heterozygous knockout mice. The 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Nov. 9, 2013, San Diego, USA).

Hideki Miwa, Yuchio Yanagawa: Distribution of GAD65 and GAD67 immunoreactive somata in the mouse cortex: Classification using molecular markers. The 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Nov. 10, 2013, San Diego, USA).

Hideki Miwa, Yuchio Yanagawa: Immunohistochemical characterization of GABAergic neurons in the amygdala using vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus transgenic mice. The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Oct. 16, 2012, New Orleans, USA). 査読無

三輪秀樹、藤原和之、柿崎利和、三國雅彦、棚平千代子、玉巻伸章、柳川右千夫：パルプアルブミン陽性ニューロン特異的 GAD67 ノックアウトマウスを用いた統合失調症 GABA 仮説の検証 第35回日本神経科学大会(2012年9月20日、名古屋) 口頭発表

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://genbehavneuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/Yanagawa_Lab/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 秀樹 (MIWA, Hideki)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80468488

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

柳川 右千夫 (YANAGAWA, Yuchio)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90202366