

論文の内容の要旨

氏名：廣瀬 健 佑

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Synaptic mechanism of differential projections from the insular and medial prefrontal cortices to the nucleus accumbens core revealed by optogenetics

（光遺伝学的手法による島皮質および内側前頭前野から側坐核への異なる投射様式の解明）

大脳前脳部にある大脳基底核の一部の側坐核（NAc）は約95%が medium spiny neuron（MSN）で占められており、その他にコリン作動性介在ニューロン（ChN）および fast-spiking GABAergic neuron（FSN）が存在している。ChNはNAc全体の約2%と存在はわずかだが、その軸索はMSNへ投射し、自発発火を抑制することでMSNの機能調節として重要な役割を果たしていると考えられている。

NAcは、島皮質（IC）および内側前頭前野（mPFC）から投射を受けており、ICからNAcへの投射は、味覚記憶の形成や、社会的報酬に対する情緒的行動の制御などに重要な働きをしていることが知られている。また、mPFCからNAcへの興奮性入力、アルコール中毒といった嗜癖に関与していることが知られている。しかし、これらの機能的役割が明らかになっているにもかかわらず、各々の投射におけるシナプス様式やその伝達機構については明確にされていない。そこで本研究では、ラットを用いてICおよびmPFCからNAcのMSNおよびChNへの投射様式について光遺伝学的手法およびホールセル・パッチクランプ法にて解析した。さらに、ICまたはmPFCからの入力により放出されるアセチルコリンのNAcに対する影響を検討した。

まず、NAcを構成するMSN、ChN、FSNを同定するために、GABA作動性ニューロン内の小胞GABAトランスポーター（VGAT）に緑色の蛍光タンパク質であるVenusを発現させた遺伝子改変動物であるVGAT-Venusラットとコリン作動性ニューロン内のアセチルコリンの転移酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）に赤色蛍光タンパク質であるtdTomatoを発現させた遺伝子改変動物であるChAT-tdTomatoラットを交配させたVGAT-Venus×ChAT-tdTomatoラットを用いた。MSNは比較的小さい細胞体を持ち、細胞内にVenusタンパクを有していることから、共焦点レーザー顕微鏡下で緑色蛍光を発することにより同定できた。一方で、ChNは細胞内にtdTomatoタンパクを有していることから、共焦点レーザー顕微鏡下で赤色蛍光を発した。さらに、各々のニューロンの電気生理学的タイプ分類を行った。その結果、MSNは静止膜電位が -72.2 ± 0.8 mVであり、脱分極性電流パルスを通じた結果、発火閾値付近で特徴的なランプ状の脱分極による遅延性発火がみられた。一方、ChNは静止膜電位が -61.8 ± 0.7 mVであり、過分極電流パルスを通じた結果、特徴的なsagとrebound action potentialがみられた。FSNでは脱分極電流パルスを通じた結果、活動電位の発火に伴う大きな後過分極と高頻度発火がみられた。

次に、解剖学的に確認されているICからNAcへの投射について、光刺激により生じるシナプス後電流の電気生理学的特性を解析するため、以下の処置を行った。VGAT-Venusラットをイソフルラン麻酔下で頭蓋骨を露出し、ICに波長470 nmの青色光刺激によって活性化される非選択的陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン2（ChR2）と赤色蛍光タンパク質であるmCherryをコードしたアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を含んだ懸濁液（AAV5-hSyn-ChR2(H134R)-mCherry）を微量注入した。注入後、ChR2がNAcに発現するまで4-6週間飼育した。その後、同ラットからNAcを含んだ急性脳スライス標本作製し、ChR2を発現したIC→NAc投射線維を波長470 nm青色光刺激にて選択的に興奮させ、その時に生じる応答をホールセル・パッチクランプ法にて記録した。静止膜電位を -60 mVで固定した状態でMSNを記録した結果、光刺激により興奮性シナプス後電流（pEPSC）が誘発された。また、実験で記録したMSNのうち23.5%はEPSCに続いて外向き電流が誘発された。これはGABA_A受容体の拮抗薬であるピククリンにて消失したため、GABA_A受容体を介して調節を受けている可能性が考えられた。電流を固定した状態で同様に光刺激をした結果、興奮性シナプス後電位とそれに続く外向き電流が誘発された。また、静止膜電位を脱分極させると活動電位が誘発された。

これらの特性を調べた後、このEPSCが単シナプス応答または多シナプス応答のどちらによるものなのかを調べた。まずpEPSCを確認後、電位依存性ナトリウムチャンネル遮断薬であるテトロドトキシン

ン (TTX) 1 μ M を灌流投与した。その結果, pEPSC が消失した。さらに pEPSC の消失を確認後, カリウムチャンネル遮断薬である 4-アミノピリジン (4-AP) 1 mM 投与により応答が回復した。その後, AMPA 受容体の遮断薬である DNQX 40 μ M を灌流投与した結果, pEPSC は消失した。これらの結果より, NAc における MSN は IC から単シナプス性の興奮性投射を受けていることが示唆された。

次に, IC \rightarrow NAc, mPFC \rightarrow NAc の投射様式を解析するため, VGAT-Venus \times ChAT-tdTomato ラットの IC または mPFC に AAV5-hSyn-ChR2(H134R)-mCherry を微量注入し, 光刺激時のシナプス応答を MSN および ChN から同時記録した。その結果, IC \rightarrow NAc においては MSN にて pEPSC が誘発されたが, ChN では pEPSC を認めなかった。一方で, mPFC \rightarrow NAc においては MSN および ChN ともに pEPSC が誘発された。さらに各々のニューロンは TTX 1 μ M によって pEPSC が消失し, 4-AP 1 mM で回復した。その後, DNQX 40 μ M により pEPSC が消失した。この結果は MSN においても同様であった。これらの結果より, IC \rightarrow NAc では MSN へ投射する一方, ChN へはほとんど投射していないのに対し, mPFC \rightarrow NAc では MSN と ChN の両方に投射することが示唆された。

次に, NAc における ChNs の生理機能を解析する実験を行った。IC \rightarrow NAc において, MSN と ChN を同時記録し, ChN を発火させた状態で MSN での光刺激時における pEPSC を記録した。その結果, 光刺激により誘発された pEPSC を確認後, コリンエステラーゼ阻害薬であるネオスチグミン (100 μ M) の灌流投与により pEPSC は有意に減弱し, ムスカリン M₁ 受容体選択的拮抗薬であるピレンゼピン (10 μ M) により, その減弱は阻害された。また, 非選択的アセチルコリン受容体作動薬であるカルバコール (10 μ M) によっても pEPSC が減弱し, アトロピンまたはピレンゼピンはその減弱を阻害した。

上記の結果より, ChN は MSN に発現する M₁ 受容体を介して MSN の活動を調節する可能性が示唆されたが, 他のタイプのムスカリン型受容体を介していないことを確認するため, pEPSC の確認後, ピレンゼピン, ムスカリン M₂ 受容体のアロステリック調節因子であるガラミン (200 μ M) およびムスカリン M₃, M₄, M₂/M₄ 受容体に対する各々の選択的拮抗薬である J104129 (500 nM), PD102807 (5 μ M), AF-DX384 (2 μ M) を各々灌流投与した後, カルバコール投与による応答の変化を記録した。その結果, ガラミン, J104129, PD102807, AF-DX384 では pEPSC を有意に減弱したが, ピレンゼピンでは変化がみられなかった。

今回の研究より, IC \rightarrow NAc においては MSN へ投射し, mPFC \rightarrow NAc においては, MSN と ChN 両方に投射していることが明らかになった。これは, mPFC から NAc における ChN への興奮性入力によるアセチルコリンの放出が, MSN における M₁ 受容体を介して, IC から NAc における MSN への興奮性入力を抑制する可能性を示唆している。