

論文内容要旨

Role of amygdalar mGluR7 in acquisition and
extinction of conditioned taste aversion

(味覚嫌悪学習の獲得および消去における扁桃体の
mGluR7 の役割)

主指導教員：香西 克之教授

(医系科学研究科 小児歯科学)

副指導教員：杉田 誠教授

(医系科学研究科 口腔生理学)

副指導教員：光畑 智恵子准教授

(医系科学研究科 小児歯科学)

秋友 達哉

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言・目的】

扁桃体は情動学習の獲得・消去過程に関与しており、味覚嫌悪学習(CTA)においても重要な役割を果たす。CTA は実験的には、本来甘味を好む習性をもつマウスに対して甘味物質であるサッカリン溶液(Sac)の摂取時に内臓不快感を催す塩化リチウムを腹腔内投与することで、マウスは Sac と内臓不快感を関連づけて記憶し、その後、Sac に対し嫌悪感を抱くようになる。味覚による条件刺激と内臓感覚による無条件刺激の双方の情報を受け取り活動するニューロンが可塑的变化を基に、CTA を形成させることが推測されている。最近の研究で、扁桃体基底外側核(BLA)のニューロンの一部における情報の統合が CTA 獲得に必要なことが示されたが、情報を統合するニューロンとその下流のニューロンがどのような機能変化を起し、下流のニューロンの活性化パターンを変化させ、CTA を可能にするかは不明である。一方、CTA 獲得後に Sac を継続的に与えていくと、徐々に統合した記憶は解除され、Sac に対して再び嗜好性を示すようになる。これを消去記憶の獲得といい、Sac が安全であることを改めて経験し記憶する学習機能と考えられている。

mGluR7 は脳内に広く発現している G タンパク質共役型受容体であり、シナプス前膜に多くみられる。mGluR7 欠損マウスにおいて CTA 獲得機能の低下が報告されているが、獲得時における扁桃体内の各種領域のニューロンでの mGluR7 の発現量や細胞内局在の変化や、獲得後における mGluR7 の役割・脳内変化については不明な点が多い。

本研究では、CTA の獲得・消去過程における扁桃体内の各種領域 [BLA, 中心核(CeA), 皮質核(CoA), 内側核(MeA)] のニューロンにおける mGluR7 の発現量や細胞内局在の変化を解析するとともに、CTA の消去過程における mGluR7 アゴニストの影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 二瓶選択法による飲水量および Aversion Index (AI)の測定

CTA 獲得後の 8~14 週齢の C57BL/6N 雄性マウスに、蒸留水および Sac の二瓶を呈示し、1 日中自由に飲水できる環境下においた。24 時間ごとに二瓶の各飲水量を経日的に測定するとともに、翌日より 2 日ごとに 4 種の試薬 [vehicle (0.5% DMSO in PBS), AMN082 (mGluR7 アゴニスト), WAY100135 (セロトニン受容体_{1A}アンタゴニスト), MDL11,939 (セロトニン受容体_{2A}アンタゴニスト)] のいずれかを腹腔内投与した。また、飲水時間を朝夕 2 回 30 分間に制限した条件で、vehicle と AMN082 を朝の飲水 30 分前または飲水 10 分後に投与した場合についても、蒸留水と Sac の二瓶の各飲水量を経日的に測定した。そして、各飲水条件において CTA の指標として用いられる AI [蒸留水飲水量/(蒸留水飲水量+ Sac 飲水量)×100] を算出し、Sac に対する嫌悪度の経日的変化を評価した。

2. Western blotting による mGluR7 の発現量解析

C57BL/6N 雄性マウスにおいて、未処置群(Control), CTA 獲得 24 時間後のテスト直後(CTA 獲得確認), テスト後 1 日・2 日・3 日経過後, および消去記憶獲得後の 6 つの条件下にて脳を

摘出した。500 μm 厚の冠状断の新鮮脳スライス(Bregma -1.70 mm)を作製し、顕微鏡下にて扁桃体を BLA, CeA, CoA, MeA の 4 領域に分離して Western blotting を行い、抗 mGluR7 抗体反応物質(以下 ; mGluR7 とする)の発現量の変化を解析した。

3. mGluR7 の扁桃体内局在の免疫組織化学的解析

Control およびテスト後 2 日目の C57BL/6N 雄性マウスを灌流固定後に脳を摘出した。クリオスタットを用いて 30 μm 厚の冠状断凍結切片を作製した後に免疫組織化学染色を行い、BLA, CeA, CoA, MeA のニューロンに発現する mGluR7 の細胞内局在を解析した。

【結果】

1. 二瓶選択法にて消去記憶獲得における各試薬の作用について検討したところ、24 時間飲水条件において AMN082 を投与することで消去記憶の獲得が促進された。他の試薬では vehicle 投与群と差は認めなかった。30 分間飲水条件では、二瓶選択の飲水前に AMN082 の投与を行うと消去記憶の獲得が促進された一方で、二瓶選択の飲水後に投与した場合では効果はみられなかった。

2. Western blotting により CTA 獲得・消去過程における mGluR7 の発現量を解析したところ、4 領域ともに分子量の異なる 2 つのバンド(約 240 kDa バンド・75 kDa バンド)が確認された。BLA および CoA では高分子量のバンドがテスト後 1 日目以降に徐々に増加し、テスト後 3 日目をピークに減少傾向にあった。2 つのバンドの総和を経時的に比較した場合においても、テスト後 3 日目に最も発現量が増加していた。CeA および MeA においては明らかな変化はみられなかった。

3. 免疫組織化学染色にて mGluR7 の細胞内局在を比較すると、BLA において Control では細胞膜辺縁に発現が多い一方、テスト後 2 日目では細胞内オルガネラを含む細胞全体に発現しているニューロンが多くみられ、mGluR7 の細胞内局在に変化がみられた。

【考察】

mGluR7 を二瓶選択の飲水前に活性化することにより、消去記憶の獲得が促進されることが示唆された。そして、BLA のニューロンにおいて mGluR7 の発現量や細胞内局在に変化がみられたことから、BLA における mGluR7 が CTA の獲得・消去過程に関与している可能性が示唆された。