

博士学位論文審査要旨

2016年12月20日

論文題目： ラットの忘却に関する生理心理学的研究-空間記憶の忘却における NMDA 受容体の役割-

学位申請者： 篠原 恵介

審査委員：

主査： 心理学研究科 教授 畑 敏道

副査： 心理学研究科 教授 鈴木 直人

副査： 脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

要 旨：

本論文は忘却の神経メカニズムに関する研究である。空間参照記憶の忘却の背景に NMDA (N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体のはたらきがあると考え、この仮説を検討した一連の研究を報告している。

第1章では、関連する先行研究をレビューし、NMDA 型受容体が空間参照記憶の忘却を支える神経メカニズムのひとつである可能性について指摘したうえで、これまでの研究の問題点と今後の研究が明らかにすべき点についての道筋を示している。

第2章では、第1章の指摘にもとづき、まず Morris 型水迷路において獲得された空間参照記憶が忘却されるまでに要する期間について検討し、記銘から1週間の期間で忘却が生じることを確認した(実験1)。そして記銘後1週間にわたって脳室内に慢性的に投与した NMDA 型受容体阻害薬 D-AP5 が、Morris 型水迷路を用いた空間参照記憶の忘却を抑制することを発見した(実験2)。しかし、脳室内に投与した薬物は脳のあらゆる場所で効果を発揮すると考えられるため、忘却にかかわる NMDA 型受容体のはたらきが脳のどの部位で起こっているのかについては明らかにはならない。

そこで第3章では、海馬内への D-AP5 投与が空間参照記憶の忘却に与える効果を検討した。その結果、脳室内投与と同様に、海馬内への D-AP5 投与は空間参照記憶の忘却を抑制することを示した(実験3、4)。

第4章では、NMDA 型受容体のサブタイプに着目した。海馬には NR2A 型と NR2B 型の2種類の NMDA 型受容体が多く発現している。また、これらのサブユニット間では記憶に関連するとされるさまざまな生理学的側面においてそれぞれ異なった役割を持つことが知られている。そこで実験5では、NR2A あるいは NR2B NMDA 型受容体の阻害薬が空間参照記憶の忘却に与える効果について検討した。その結果、特に NR2A 型受容体が空間参照記憶の忘却に関与していることを示した。

第5章では、これらの知見をもとに、空間記憶の忘却がいかなるメカニズムについて生じるのかについて議論した。そして、シナプス部での AMPA 型グルタミン酸受容体の内向き輸送やニューロン新生がその候補となり得ることを指摘した。

以上のように、本論文は空間参照記憶の忘却に NMDA 型受容体、特に NR2A NMDA 受容体に関与していることを巧妙な行動学的実験と生理学的なテクニックによって世界で初めて示した研究として高く評価される。よって、本論文は、博士(心理学)(同志社大学)の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2016年12月20日

論文題目： ラットの忘却に関する生理心理学的研究-空間記憶の忘却における NMDA 受容体の役割-

学位申請者： 篠原 恵介

審査委員：

主査： 心理学研究科 教授 畑 敏道

副査： 心理学研究科 教授 鈴木 直人

副査： 脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

要 旨：

上記審査委員3名は、2016年12月19日（月）午後5時45分より2時間にわたり学位申請者に対して総合試験を行った。

学位申請者は提出論文に関して、審査委員からの専門的質疑に対して、適切な応答と説明を行い、本論文の学術的価値を証明した。また申請者は、本研究の基礎となる生理心理学・神経科学領域についても十分な知識を有することが認められた。

さらに、申請者は語学（英語）においても十分な学力を有することが確認された。

よって、総合試験の結果は合格であると認められ、学位申請者は博士（心理学）（同志社大学）の学位に相応しいものと認める。

博士学位論文要旨

論文題目： ラットの忘却に関する生理心理学的研究
—空間記憶の忘却における NMDA 受容体の役割—

氏名： 篠原 恵介

要 旨：

本研究の目的は、齧歯類（ラット）を対象として、行動薬理学的手法により、記憶の忘却を生じさせる神経メカニズムの一端を明らかにすることである。ヒトやその他の動物は過去の経験を記憶し、それを参照することで後の行動を決定づけることが可能となる。しかし、経験によって得られた情報のすべてが恒久的に保持されるわけではなく、大抵の情報は時間の経過に伴って失われる。すなわち、忘却 (forgetting) という現象が生じるのである。忘却は機能障害としてよりも、記憶を調整するための重要な機能として説明されてきた。本研究では忘却をより具体的に捉えるため、Tulving (1974) の定義に基づいて「既に獲得した記憶の保持が低下する現象」として定義する。

ラットの行動薬理学的実験において興味深い知見が報告されている。Villarreal, Do, Haddad, & Derrick (2002) は、N-methyl-D-aspartate 型グルタミン酸受容体 (以下 NMDA 受容体) 機能の不活化によって、既に獲得した空間記憶の保持が向上することを示した。放射状迷路の 4/8 課題を用いて空間記憶を獲得させたラットに NMDA 受容体阻害薬 CPP を投与し続けたところ、その後の保持テストで統制群と比べて少ない誤選択数を示したのである。この結果は、空間記憶の忘却の過程に NMDA 受容体が関与する可能性を示唆している。

NMDA 受容体は、記憶の生物学的基盤とされる長期増強 (long-term potentiation; LTP) の生起に重要な役割を担うことが知られている。このことから、齧歯類 (ラット, マウス) を対象として、記憶形成の各段階における NMDA 受容体の役割について検討されてきた。多くの先行研究では、NMDA 受容体阻害薬を投与されたラットでは新しい空間記憶の獲得に失敗することが示されてきた。一方、既に獲得した記憶の保持や想起については研究間で結果が異なる。空間記憶を測定する典型的な迷路課題である Morris 水迷路を用いた幾つかの先行研究 (e.g. Day & Langston, 2006) は、先述の Villarreal et al. (2002) による報告と異なり、記憶獲得後に NMDA 受容体阻害薬を投与しても保持に影響しないとする結果を報告している。

ただし、Day & Langston (2006) 等の先行研究は NMDA 受容体の阻害が保持を「悪化」させるか否かを検討することが目的であった。そのため、統制群において記憶が十分に維持される程度の保持期間を経た後に記憶保持の程度を測定している。このことから、NMDA 受容体阻害薬の投与を原因とする忘却の抑制 (保持の向上) が天井効果によって隠されていた可能性は十分に考えられる。

そこで篠原・畑 (2014) は、Morris 水迷路を用いて忘却と NMDA 受容体との関係を検討した (実験 1, 2)。初めに実験 1 として、獲得した空間記憶を忘却 (保持低下) させる程度の保持期間の長さを探る実験を実施した。訓練では円形プール内に隠された逃避台位置を探る試行を 1 日につき 4 試行で 4 日間に渡って実施した。訓練終了後にラットを 4 群に配分し、それぞれ異なる長さの保持期間 (1, 7, 14, 28 日間) を経た後にプローブテストを実施した。プローブテストでは逃避台が取り除かれたプール内を一定時間 (典型的には 60 秒間) に渡って探索させた。その結果、1 日後のテストで見られた目標位置に対する探索の偏りが 7 日後のテストでは確認されなかった。

実験 1 の結果から訓練終了の 7 日後には空間記憶の忘却が生じ始めると仮定し、実験 2 では 7

日間の保持期間を採用して NMDA 受容体阻害薬 AP5 の脳室内投与による影響を検討した。ここでは、訓練後からテストまでの保持期間における NMDA 受容体の働きを検討するため、期間中に持続的に阻害薬を投与する必要がある。Villarreal et al. (2002)は保持期間中に CPP の腹腔内投与を 24 時間間隔で反復的に繰り返していたが、この方法では投与からの時間経過によって薬物の効果に変動が生じる可能性が考えられる。そこで本研究では、Day & Langston (2006)の方法に従い、Alzet 製の浸透圧ポンプを利用して AP5 を脳内へ持続的に投与した（本研究ではこのような投与法を慢性投与と呼ぶ）。実験 1 と同一の手続きによる訓練を実施し、訓練終了 1 日後から NMDA 受容体阻害薬 AP5 を脳室内に慢性投与した。その結果、訓練終了の 7 日後に実施したプローブテストで成績の改善が示された。この結果は、獲得後における NMDA 受容体の機能が空間記憶の忘却に重要な役割を担う可能性を示唆している。

Shinohara & Hata (2014)は、背側海馬内への局所投与が空間記憶の忘却に与える影響を検討した（実験 3, 4）。背側海馬は空間記憶の獲得において重要な脳部位とされる（Jarrard, 1995; Morris, Garrud, Rawlins & O'Keefe, 1982）が、NMDA 受容体は海馬に限らず脳内の広範な部位に分布していることもわかっている（Monaghan & Cotman, 1986）。篠原・畑 (2014)で実施した脳室内投与では、脳内全体に投与薬物が影響する可能性が残っていたため、空間記憶の忘却に関わる NMDA 受容体が存在する脳部位については確かめられなかった。

実験 3 では、実験 2 と同様の手続きで AP5 を背側海馬内に慢性的に投与した。その結果、実験 2 と同様にプローブテストでの成績改善が示された。次に実験 4 として、より長期の保持期間（13 日間）を経た後のテストにおいて、期間前半の投与（即時投与：訓練 1-6 日後）では AP5 による成績改善が示されたが、後半の投与（遅延投与：訓練 7-12 日後）ではその効果を示さなかった。この結果から、NMDA 受容体阻害による忘却抑制の効果は阻害終了後も持続すること、NMDA 受容体阻害は既に忘却された記憶を改善させないことが示された。これらの特徴は、Villarreal et al. (2002)の報告した電気生理学的実験での結果（NMDA 受容体阻害による長期増強の持続）においても類似する結果が示されている。これらの結果は、背側海馬内に存在する NMDA 受容体の機能が空間記憶の忘却に関与することを示唆している。

Shinohara & Hata (2015)では、NMDA 受容体サブユニット GluN2A と GluN2B の選択的阻害が忘却に与える影響を検討した（実験 5）。実験 3 と同様の手続きで、GluN2A 選択的阻害薬 NVP-AAM077 または GluN2B 選択的阻害薬 Ro 25-6981 を背側海馬内に慢性的に投与した。また、これらの薬物の両方を希釈した溶液（NVP/Ro）を投与する群を作成し、結果を比較した。その結果、NVP-AAM077 のみを投与したラットでは、訓練終了の 7 日後に実施したプローブテストにおいて忘却抑制の可能性を示す結果が示された。一方で、Ro 25-6981 の投与ではそのような効果は見られず、統制ラットと同様の結果を示した。また、これらの阻害薬を混合して投与した場合に AP5 投与（Shinohara & Hata, 2014）で見られたような忘却抑制の効果が示された。興味深いことに、プローブテストの翌日に再び同一の手続きでプローブテスト（第 2 保持プローブ）を実施したところ、NVP-AAM077 のみを投与したラットでは投与前に獲得した記憶に基づく探索行動に固執していたのに対して、両種のサブユニットを阻害したラットではそのような固執性を示さなかった。このことは、GluN2B の阻害が空間記憶保持を悪化させる可能性を示唆している。以上により、実験 5 の結果から、NMDA 受容体サブユニット GluN2A は既に獲得した記憶の忘却に、GluN2B は記憶の維持にそれぞれ関与している可能性が示唆された。

いくつかの先行研究では、記憶想起によって生じる保持の脆弱化や消去といった現象が GluN2B の選択的阻害によって抑制されるという結果が報告されている（Dalton et al., 2012; Milton et al., 2013）。これらの現象はいずれも阻害薬投与以前に獲得した記憶の低下に関係する現象であることから、忘却における GluN2B の関与がこれまでは間接的に示唆されてきた。しかしながら、先行研究と本研究（実験 5）の結果をまとめると、同じ記憶の低下であっても、ある種の操作によって誘発される記憶保持の低下（脆弱化、消去）と時間の経過によって生じる低下

(忘却)とでは、関与するサブユニットの種類がそれぞれ異なることが明らかとなった。NMDA 受容体はシナプス伝達効率の変化において重要とされ、また、活性するサブユニットの種類によってその変化の傾向が異なることがわかっている。そのため、本研究の結果は忘却を生じさせる神経メカニズムを解明するにあたって重要な知見であると考えられる。