

パーキンソン病モデルマウスに
おける認知障害及びその機構
に関する研究

2016 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(帯広畜産大学)

木下 健一

目次

序論	1
第1章	5
緒言	6
材料および方法	8
結果	12
考察	14
第2章	17
緒言	18
材料および方法	20
結果	23
考察	26
第3章	29
緒言	30
材料および方法	32
結果	37
考察	40
結論	45
謝辞	46
参考文献	47
図表	57
学位論文要旨	79

序論

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) は進行性神経変性疾患のひとつで、アルツハイマー病に次いで多くの罹患者が存在し、50 歳以降に発症することが多く、我が国においても 10 万人に 100 人の割合で発症が報告されている [86]。PD は中脳黒質緻密部 (substantia nigra pars compacta: SNpc) のドパミン (dopamine: DA) 神経が変性し、主な投射先である線条体の DA 含量の低下、並びにアセチルコリンの相対的増加によって振戦や無動、固縮、姿勢反射障害といった錐体外路症状と呼ばれる運動障害を引き起こす疾患である [64, 70]。また、同時に不安や睡眠障害、自律神経の異常、認知障害といった非運動症状も多く併発し、なかでも痴呆や想起障害といった認知障害は、PD 患者の約 40%にも及び、痴呆のリスクは健常者と比較し約 6 倍にも及ぶ [15, 20, 32]。それにもかかわらず、PD に認知障害が併発するメカニズムは明らかではなく、現在 PD の認知障害に対する有効な治療薬・治療法は確立されていない。

ヒトの PD において認知障害は運動障害が現れるよりも前から認められることが多い [15, 20]。PD における認知障害の症状には、遂行記憶や手続き記憶、作業記憶、長期記憶などの記憶障害 [19, 36, 79] や注意能力の低下、不安、無気力 [41, 72] などが挙げられる。また、PD では正常と認知症の間にあたり、認知機能のうち 1 つの機能 (記憶・決定・理由づけ・実行など) に障害が生じているが、日常生活に支障はない状態と定義される軽度認知障害の発症も多い [2, 38]。しかしながら、軽度認知障害であっても将来的に認知症に発展する可能性が高く、横断的研究では健常者と比較し、認知症になるリスクが 4~6 倍にも及ぶことが報告されている [2]。現在のところ、MRI を応用した臨床研究などから PD では側頭葉の機能は比較的保たれているのに対し、前頭葉や後頭葉の機能が低下していることが示唆されている [27, 58]。しかし、PD に併発する認知障害の発症メカニズムの特定には至っていない。

PD モデル動物を用いた研究においても様々な認知障害が報告されている [75]。黒質線条体の DA 神経を 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) や 6-hydroxydopamine (6-OHDA) といった神経毒性の薬物で脱落させた PD モデル動物では、社会認識テスト [13] や新規物体認識テスト [84], Y 迷路テスト [47], モリス水迷路 [21] での空間記憶能力の低下が認められている。また、近年 PD の原因タンパクとして着目されている α シヌクレインの強発現動物やリスク遺伝子である leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) や parkin 遺伝子組み換え動物においても、新規物体認識テストや Y 字迷路テストなどで記憶障害が報告されている [8, 29, 57]。さらに、機能的な解析においても海馬神経細胞の長期増強や長期抑圧といったシナプス可塑性の異常等が認められている [85]。しかしながら、これら報告は学習や記憶の獲得といった記憶形成時のみに焦点が当てられており、記憶の形成後の過程である記憶の再固定や消去といった機能に焦点を当てた研究はほとんど存在しない。

近年の研究より、学習を経て獲得された記憶は、その後「固定」、「再固定」、「消去」といったプロセスを経ることが報告されている [48, 49, 51, 82]。学習を経て獲得されたばかりの記憶は不安定な状態であり、記憶の固定という過程を経て安定した状態で脳内に貯蔵される [44, 82]。固定された記憶も想起されることで再び不安定な状態となり、再固定という過程を経て再貯蔵され、より強固で長期的な記憶になる [49, 51]。一方で、安定した記憶であっても記憶の消去という過程を経ることで記憶は減弱する [48]。いずれの過程においても脳内の様々な領域において遺伝子発現や新規タンパク質の合成が必要とされており、近年それら過程に関わる脳領域やシグナル分子が特定されている [18, 43, 46, 52, 76]。記憶の固定・再固定・消去に関する研究の多くは、解析を行うにあたって恐怖条件付け試験を用いている。この試験は、動物の反応に一切の影響を及ぼさない中性的な刺激である条件刺激 (conditioned stimulus: CS) 下で、嫌悪刺激である無条件刺激 (unconditioned stimulus: US) を与えることにより CS に対

して恐怖を学習させるというものである。恐怖条件付け後、再び動物に CS を提示すると恐怖記憶が想起され、一度不安定な状態となる [77]。CS の提示が短時間あるいは低頻度である場合、記憶の再固定が誘導される一方で、条件付けの提示を長時間あるいは高頻度行うと記憶の消去が誘導される [43, 76]。CS に装置等の空間情報を用いる試験は「文脈的恐怖条件付け試験」と呼ばれ、海馬依存的記憶である [18, 43, 76]。一方、CS に音などを用いる場合、「手がかり恐怖条件付け試験」と呼ばれ、扁桃体依存的な記憶である [52]。

ヒトの PD では不足した DA を補充する目的でレボドパや DA アゴニストの投薬が行われており、運動症状の改善における有効性が認められている [16]。しかしながら、臨床試験でレボドパや DA アゴニストで運動症状が改善された場合においても、非運動症状の改善は認められないことが多い [16, 24]。一方、PD の認知障害に対する治療薬として、アルツハイマー病の治療薬として知られるコリンエステラーゼ阻害薬などが試みられ、その有効性なども報告されている。しかしながら、その効果にはばらつきがあり、また運動症状を増悪させる副作用も認められるなど、根本的な治療薬として実用化はされていない [62, 80]。また、近年、iPS 細胞を用いた再生医療が注目を集めているものの、実用化には未だ課題は多く、認知障害に対する有効性なども不明である [1]。PD モデル動物を用いた研究においても様々な化合物による PD の認知障害改善効果が報告されている。しかし、その多くは黒質 DA 神経傷害を減弱させる予防的アプローチが多く [13, 84]、PD を発症したモデル動物における認知障害改善効果を報告したものはほとんどない。

以上の知見をふまえ、本研究は、PD モデルマウスの認知機能について記憶の固定・再固定・消去機能のそれら各々について個別に評価し、機能異常が認められた場合にはその原因を詳細に調べることで、PD における認知障害の発症機構を解明すること、及び新規治療薬となる化合物を探索することを目的とした。

第1章ではMPTP急性投与方法によるPDモデルマウス(PDマウス)の作出・評価を行った。第2章では文脈的恐怖条件付け試験を用いてPDマウスの記憶の固定・再固定・消去機能の解析を行った。第3章ではPDマウスにおける恐怖記憶の消去亢進のメカニズム解析及びPDの認知障害に対する新規治療薬候補として、ホスホジエステラーゼIV阻害薬ロリプラムの有効性を評価した。

第1章

MPTP 誘発性パーキンソン病 モデルマウスの確立に関する研究

緒言

パーキンソン病 (parkinson's disease: PD) に関する研究は古くから行われており、近年までに様々な PD モデル動物が用いられている。PD モデル動物の作製は、1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) や 6-hydroxydopamine (6-OHDA) といった神経毒性薬物の投与によるものと α シヌクレインや parkin, leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) といった PD 関連遺伝子改変によるものの 2 つに大別される [21, 25, 75]。そのなかでも MPTP は最も古くから PD の研究に用いられており、モデル作出が非常に簡便である上、霊長類やげっ歯類において組織学的にも行動学的にもヒトの PD と非常によく似た病態を誘発することができる [35, 75]。

中枢ドパミン (dopamine: DA) 神経系は次の 4 つに大別される [65]。①黒質 (substantia nigra pars compacta: SNpc) -線条体路, ②中脳 (腹側被蓋野: Ventral Tegmental Area: VTA) - 大脳皮質路, ③中脳 (VTA) - 大脳辺縁系路, ④視床下部 - 下錐体路である。このうち①は錐体外路系運動機能の調節を担っており、PD の発症は①の DA 神経傷害に起因する [64]。一方、②や③は気分や報酬記憶といった運動機能以外の様々な機能の調節に大きな役割を担い、[60] ④は下垂体のプロラクチン放出制御などに関わっている。そのため、①の経路を特異的に脱落させたモデルを作出することが PD の研究において重要である。

マウスに MPTP を腹腔内投与すると、末梢では代謝されず、脂溶性が高いため容易に血液脳関門を通過する。その後、MPTP は線条体のグリア細胞内に集まり、モノアミン酸化酵素 B (Monoamine oxidase B: MAO-B) によって 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) に代謝される。MPP⁺は DA トランスポーターによって DA 神経に取り込まれ、DA 神経細胞内のミトコンドリアに集積する。MPP⁺はミトコンドリアの電子伝達系複合体 I の働きを阻害し、ATP 産生を阻害することにより神経細胞死を

引き起こす [35]。

MPTP は黒質線条体 DA 神経に特異性が高く，黒質線条体 DA 神経を選択的に脱落させることができる [35]。また，MPTP 誘発性 PD モデル動物は，パーキンソニズムや運動協調性，運動学習能力の低下といった錐体外路症状を示し，それら症状はレボドパによって改善するなど，ヒトの PD と非常によく似た病態を呈する [35]。また，PD と同様に非運動症状を示すことも多く報告されている [13, 21, 75, 84]。しかしながら，MPTP の投与は同一動物種においても様々な用量，投与条件（急性，慢性，長期投与等）が提唱されており，その条件によって黒質線条体 DA 神経の傷害の程度や PD 様症状の程度は様々である [9, 35]。

そこで第 1 章では，MPTP の急性投与方法（20 mg/kg，2 時間おきに 4 回投与）が PD マウスの作製に適切であるかどうかを組織学的及び行動学的に解析を行った。

材料および方法

動物

富士平工業株式会社（東京）から導入した 7 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを研究に使用した。マウスはアクリル製ケージ内で固形飼料（日本クレア，東京）と水を自由に摂取できる条件下で 2-3 匹ずつ飼育した。飼育室内は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度 $35 \pm 5\%$ に維持し，午前 7 時に明期が始まる明暗 12 時間周期で管理した。導入後 1 週間を飼育環境の馴化期間とし，全ての実験は 8 週齢時から開始した。

MPTP 投与

MPTP は SIGMA 社（St. Louis, USA）から購入したものをを用いた。MPTP は滅菌生理食塩水で溶解し最終濃度 2 mg/ml に調整した。PD モデルマウスの作出は MPTP を 8 週齢のマウスに 20 mg/kg の用量で 2 時間おきに 4 回腹腔内投与することで行った。control マウスには滅菌生理食塩水を同量投与した。行動測定をはじめとする全ての解析は MPTP 投与 7 日後から開始した。また，MPTP 投与に使用したエッペンチューブ，注射器及び投与マウスの飼育に用いた床敷き等は全て 5% 次亜塩素酸にて処置し，残留する MPTP を失活させた。

抗チロシン水酸化酵素（Tyrosine hydroxylase: TH）抗体を用いた免疫組織化学及び TH 陽性細胞数の評価

MPTP 投与 7, 9, 16 日後のマウスの脳をジエチルエーテル麻酔下で 4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定し，摘出後 4% パラホルムアルデヒド溶液で再固定した。固定後，マイクロスライサー（堂阪イーエム株式会社，京都）で 40 μm の厚さの切片を作製した。作製した切片は，まず 0.5% TritonX-100 含有 phosphate-buffered

saline (TPBS) で 1 時間室温にて処置した。次に PBS で 100 倍希釈した過酸化水素を 40 分間処置し、TPBS で洗浄後、TPBS で 100 倍希釈したブロッケン (雪印, 東京) を室温で 1 時間処置した。TPBS で洗浄後、TPBS で 5,000 倍希釈した抗 TH マウスモノクローナル抗体 (EMD Millipore, Inc, MA, USA) を 4°C の条件下で、24 時間処置した。その後、TPBS で洗浄し、TPBS で 500 倍希釈した 2 次抗体 (ビオチン化 anti-mouse IgG; Vector, CA, USA) を 4°C の条件下で 2 時間処置した。処置した切片を TPBS で洗浄し、avidine-biotin-horseradish peroxidase (VECTASTAIN ABCkit; Vector, CA, USA) を 4°C の条件下で 2 時間処置し、PBS で洗浄した後 3,3-diaminobenzidine etrhdrochloride (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いて発色した。その後、切片を PBS で洗浄し、スライドガラスに移し、50%グリセロール PBS で封入後、光学顕微鏡下で観察および SNpc における TH 陽性細胞数の計測を行った。ブレグマ後方 3.52 mm から連続 3 枚の切片における TH 陽性細胞数を評価し、その合計数を結果とした。

ウエスタンブロッティング法による線条体 TH 含量の測定

脳サンプルの採取は MPTP あるいは生理食塩水投与 7 日後に行った。マウスの脳を摘出後、全脳から線条体のみを分離し、エッペンチューブ内に入れた後、液体窒素にて急速凍結した。サンプルの調整は組織重量を秤量後、2 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride を添加した cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl: pH 7.4, 1% Triton-X, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を組織重量の 4 倍量加え、ホモジナイズすることで可溶化し、遠心器により 12,000 回転で 3 分間遠沈した。遠沈後、上清を回収し、等量の SDS sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue, 62.5 mM Tris-HCl: pH 6.8) を加え、95°C で 5 分間加熱後、超音波処理を施した。

得られたサンプルは泳動用バッファー (0.1%SDS, 0.025M Tris-HCl) 中で

SDS-PAGE (12% polyacrylamide)に展開後、ブロッティングバッファー(0.025% SDS, 0.025 M Tris-HCl, 20% methanol) 中でニトロセルロース膜 (Trans-Blot, transfer medium; Bio-Rad, CA, USA) に転写した。その後ニトロセルロース膜を TBS-T で 100 倍希釈したブロッッキングエース (雪印, 東京) でブロッッキングし, TBS-T によって 5,000 倍希釈した抗 TH マウスモノクローナル抗体 (EMD Millipore, Inc, MA, USA) あるいは 3000 倍希釈した抗 γ チュブリンマウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 4°C の条件下で 24 時間反応させた。TBS-T で洗浄後, TBS-T で 5,000 倍希釈した goat Anti-Mouse IgG, HRP (Promega, Fitchburg) を 1 時間反応させた。TBS で洗浄後, ImmunoStarLD (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いたケミカルルミネッセンス法により発光させた。標識タンパクバンドはルミノイメーリアナライザー (LAS-3000 mini ; 富士フイルム, 東京) により解析した。また, 得られたバンドは ImageJ ソフトウェア (NIH) により数値化した。

運動協調性を指標とした錐体外路症状の評価

運動協調性の評価にはローターロッドテストを用いた [47]。ローターロッド装置 (MK-610-A ; 室町機械株式会社, 東京) は自動で回転する直径 3 cm のロッドを 5 レーン有し, マウスがロッドから落下した際には落下検出センサーにて感知し, ロッド滞在時間を自動測定することができる。まず初めにマウスを低速 (5 rpm), 60 秒間ロッドの上に乗せ慣らしを行った。その 24 時間後, マウスを再びロッドの上に乗せ 30 秒間の静置後, 等速 20 rpm (mode A) にてロッドを回転させロッドから落下するまでの時間を計測した。この際, ロッドの最大滞在時間を 600 秒に設定し, 20 分以上の間隔をあけ 2 回試験を行い, その平均値をデータとした。

情動行動の評価

情動行動測定にはホールボードテストを用いた。床に等間隔に直径 3 cm の穴が開いた 50×50×50 cm の灰色アクリル製の自動ホールボード試験装置 (model ST-1 ; 室町機械株式会社, 東京) にマウスを入れ, 5 分間, 1 回の測定における総行動距離, 立ち上がり行動の回数・時間, ヘッドディッピング行動 (穴をのぞく行動) の回数・時間・潜在時間の測定を行った。マウスの立ち上がり行動やヘッドディッピング行動は壁面と穴に備え付けられた赤外線センサーによって, 総行動距離は装置上方に取り付けられた CCD カメラによって検出した。赤外線および CCD カメラの情報は専用のインターフェイスおよびソフトウェアによって集約, 解析, 保存した。

統計処理

2 群間の比較には等分散性の検定のために F 検定を行い, 等分散の場合 Student's t -test を行った。黒質緻密部の TH 陽性細胞数の比較では, Bartlett's test で等分散を確認した後, 一元配置分散分析を行った。有意差が得られた場合には, Tukey's test による多重比較を行った。なお, p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意であると判断した。全ての統計処理には SPSS ソフトウェアを用いた。

動物実験委員会の承認

本研究は帯広畜産大学の動物実験委員会において動物実験の許可を得ている。

結果

MPTP 投与による黒質線条体 DA 神経変性の評価

MPTP 投与による黒質線条体 DA 神経変性の評価は DA 産生の際の律速酵素である TH を指標に行った。MPTP 投与 7, 9, 16 日後における SNpc の DA 神経細胞を抗 TH 抗体で染色し、陽性細胞数を評価したところ、MPTP 投与群は control 群と比較し全ての日数において TH 陽性細胞数の有意な減少が認められた (Fig.1A, B)。また、投与 7 日後において、MPTP 投与マウスで線条体の抗 TH 抗体での染色性の低下が認められた (Fig. 1A)。次に、線条体の TH 含量をウエスタンブロッティング法で測定したところ、MPTP 投与 7 日後の線条体において control 群と比較し、TH 含量の有意な減少が認められた (Fig. 2)。これらの結果から、MPTP 投与によって全ての実験を開始する投与 7 日後から長期間にわたり黒質線条体の DA 神経変性が誘導されることが分かった。

錐体外路症状の評価

錐体外路症状の評価にはローターロッドテストを用いた。このテストでは強制的に回転するロッドの上にマウスを乗せ、ロッドから落下するまでの時間を測定することによりマウスの運動協調性や運動学習能力を測定することができ [47]、マウスの運動障害の評価に用いられる。マウスをロッドの上に乗せ、等速 20 rpm の速さでロッドを回転させたところ、MPTP 投与群は control 群と比較し有意にロッドから落ちるまでの時間が短縮した (Fig. 3)。この結果から、MPTP 投与により錐体外路症状のひとつである運動協調性の低下が誘発されたことが分かった。

一般行動並びに情動行動の評価

マウスの一般行動および情動行動はホールボードテストを用いて評価した。このテス

トでは、4つの穴が開いた新規環境下において総行動距離や立ち上がり行動、穴をのぞくヘッドディップ行動を測定することで、マウスの一般行動や情動行動を評価することができる。その結果、総移動距離、立ち上がり回数・時間、穴をのぞくヘッドディップ行動の回数・時間・潜在時間いずれの評価項目においても control 群と MPTP 投与マウス間に差は認められず (Fig. 4)、MPTP 投与はマウスの一般行動や情動行動に影響を与えないことが分かった。

考察

MPTP 急性投与によって SNpc における TH 陽性細胞数の減少、線条体における抗 TH 抗体での染色性の低下 (Fig. 1A, B), TH 含量の低下が認められた (Fig. 2)。また, SNpc における TH 陽性細胞数の減少は長期間にわたり認められた (Fig. 1A, B)。これらの結果は, 黒質線条体の DA 神経変性が不可逆的に誘導されたことを示しており, 本研究と同様の投与条件を用いた他の研究結果とも一致する [81]。MPTP は黒質線条体 DA 神経細胞の ATP 産生を阻害し, 神経細胞死を引き起こすことから [35], 本研究で認められた TH 陽性細胞数の減少は, SNpc における DA 神経細胞死を反映していることが推察される。一方で, MPTP は黒質と隣接し, DA 神経を多量に含む VTA の DA 神経細胞にはほとんど影響を及ぼさない [35]。これは, 線条体には他脳領域よりも特に多く MAO-B が存在し, 線条体でほとんどの MPTP が MPP⁺に代謝され, DA 神経に取り込まれることや, MPP⁺の毒性は神経メラニンを多く含む DA 神経に特異性が高く, 神経メラニンを多く含む黒質線条体 DA 神経細胞を選択的に傷害することなどが考えられる [17]。しかしながら, MPTP は VTA の DA 神経細胞や青斑核のノルアドレナリン (noradrenalin: NA) 神経細胞に若干ではあるものの, 傷害を及ぼすとの報告もある [35] ため, MPTP を用いる際には, それら脳領域の傷害も考慮に入れる必要がある。

黒質線条体 DA システムは運動協調性の調節に重要な役割を担っており [5], PD では運動協調性の低下を主徴とする錐体外路症状が認められる [64, 70]。本研究においても, MPTP を投与したマウスではローターロッド試験においてロッドから落ちるまでの時間が短縮し, 錐体外路症状のひとつである運動協調性の低下が認められた (Fig. 3)。錐体外路系運動機能は大腦基底核-大腦皮質回路によって調節されている。大腦基底核は大腦皮質運動野と視床・脳幹とを結び付けている神経核の集合体のことで, 線条

体、淡蒼球内節・外節、視床下核、黒質緻密部・網様部で構成される [5]。なかでも線条体は GABA 神経を多量に含み、大脳基底核の調節に中心的な役割を担っている。線条体は SNpc からの DA 神経の抑制性の入力を受ける一方で、介在神経として興奮性アセチルコリン神経が分布しており、線条体の GABA 神経は、DA 神経とアセチルコリン神経による相反的な神経支配を受けている [5]。PD 罹患者や PD モデル動物では、黒質 DA 神経脱落による線条体 DA 減少とアセチルコリンの相対的な増加によって、線条体による大脳基底核の抑制性制御が破綻し、視床から大脳皮質運動野への興奮性出力が減少することで錐体外路症状を示す [53]。これら知見から、本研究におけるローターロードテストでのロード滞在時間の短縮も黒質線条体 DA 神経脱落による大脳基底核-大脳皮質回路の調節障害に起因するものであると推察される。過去の報告でも、MPTP 誘発性 PD マウスはローターロード試験における運動学習能力の低下や、寡動を評価するポールテストでの遂行能力の減少、カタレプシーを評価するバーテストでの前肢運動能力の低下が示されており [22, 47]、本研究で認められた運動障害は他の運動機能を評価する行動測定においても同様に認められることが示唆される。

MPTP 投与マウスではホールボードテストで何ら異常を認めず、一般行動・情動行動は正常であった (Fig. 4)。このことは、本研究で用いたモデルマウスの活動量や不安症状等に異常は認められないことを意味する。一方で、ヒトの PD では不安症状やうつ病発症リスクの亢進が報告されている [41, 72]。また、MPTP 慢性投与 PD モデル動物や α シヌクレイン強発現 PD モデル動物においても不安様行動の亢進が報告されている [57, 81]。不安様行動やうつ様症状の発症には VTA の DA 神経や青斑核の NA 神経、縫線核のセロトニン (serotonin, 5-hydroxytryptamine: 5-HT) 神経が密接に関与している [30]。うつ様症状を呈する PD 患者は DA だけでなく NA や 5-HT の異常も高度に認められ [15, 20]、また、うつ・不安様症状を呈する PD モデル動物でもそれら神経伝達物質や神経核の障害が報告されている [81]。本研究で用いた PD モデルマ

ウスでは、黒質線条体 DA システム以外の神経伝達物質やそれを担う神経核への影響が比較的軽度であるため、不安様症状等が認められなかったことが考えられる。

本章の結果から、MPTP の急性投与は、黒質線条体 DA 神経脱落と運動障害といった PD と類似した病態を引き起こすことが分かった。一方で、マウスの一般行動や情動行動には一切の影響を与えなかった。

MPTP の急性投与はマウスに PD の主病態である DA 神経脱落と運動障害を引き起こしたため、PD モデルとして適切であると判断し、以降の実験では本章にて得られたモデルマウスを PD マウスとした。

第 2 章

パーキンソン病モデルマウスに
おける文脈的恐怖記憶の固定、
再固定、消去に関する研究

緒言

パーキンソン病 (parkinson's disease: PD) では記憶機能の低下や想起障害といった認知障害を高率に併発することが報告されている [15, 20, 32]。1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 誘発性 PD モデル動物においてもモリス水迷路テストや社会認識テスト, 新規物体認識テストといった行動試験において認知機能の低下が報告されている [13, 21, 84]。しかしながら, これら報告は記憶の獲得や学習機能そのものに対する解析しか行われていない。

記憶は学習を経て獲得され, 脳内に固定されることで形成される [82]。近年, 固定された記憶は想起すると一度不安定な状態となり [77], 再固定という過程を経て長期的で強固な記憶になることが報告されている [49, 51]。一方で, 消去という過程を経ることで固定された記憶は減弱することも報告されている [48]。しかしながら, PD モデルマウスにおける記憶の固定・再固定・消去機能はほとんど不明である。

恐怖条件付け試験はマウスの反応に一切の影響を及ぼさない中性的な刺激である条件刺激 (conditioned stimulus: CS) 下で, 嫌悪刺激である無条件刺激 (unconditioned stimulus: US) を与えることにより, CS に対して恐怖を学習させるというテストである。文脈的恐怖条件付け試験は CS に装置への暴露 (装置に対する空間情報), US にフットショックを用いることで, 装置の空間情報に対して恐怖を学習させることができる [18, 43, 76]。また, 文脈的恐怖条件付け試験は恐怖記憶の固定後, CS へ再暴露することで記憶の再固定や消去を誘導することができるため, 記憶の再固定や消去機能の解析に多く用いられている。記憶の再固定は恐怖条件付け後マウスを再び CS に短時間暴露することで誘導され [43, 76], 記憶の再固定が起こると CS に対する恐怖記憶は維持される。一方で, 記憶の消去はマウスを CS に長時間あるいは頻回暴露することで誘導される。記憶の消去が起こると, CS に対して安全であるという記憶が形成されることで,

CSに対する恐怖記憶は減弱する [43, 76]。

そこで本章では、文脈的恐怖条件付け試験を用いて PD マウスの記憶の固定・再固定・消去機能の解析を行った。また、恐怖条件付け時に用いる US の強度によって記憶の再固定や消去に及ぼす効果が異なるとの報告がある [3, 7] ため、本研究では弱刺激（1 mA/2 秒，1 回）と強刺激（2 mA/2 秒，2 回）の 2 種類の US を用いて PD マウスの記憶の固定・再固定・消去機能を解析した。

材料と方法

動物及び MPTP 投与

第 1 章の記載に準じて実施した。

行動測定装置

行動装置は 17.0×17.0×14.5 cm のアクリル製の箱（条件付け装置）と電気刺激装置で構成される（ST-10；メルクエスト，富山）。アクリル製の箱は四方を黒色のアクリル板で囲っており，床にはステンレススチール製のロッドが 1 cm 間隔で並んでいる。ステンレススチール製のロッドは電気刺激装置とつながっており，マウス足部に電気刺激を与えることができる。また，装置上部に CCD カメラを設置し，マウスの行動観察，測定，解析に用いた。

行動測定

全ての行動測定は①恐怖条件付け，②再固定・消去トレーニング，③再固定・消去テストで構成される。

弱 US（1 mA/2 秒，1 回刺激）を用いた測定

①マウスを条件付け装置に入れ 148 秒後に 1 mA/2 秒の電気刺激を 1 回与えた。その 30 秒後にマウスを条件付け装置から取り出し，ホームケージ内に戻した。

②①の 24 時間後，マウスを再び条件付け装置に入れ，再固定あるいは消去トレーニングを行った。再固定トレーニングの場合は 3 分間，消去トレーニングの場合は 30 分間条件付け装置内に滞在させた。このトレーニング中，電気刺激は一切与えなかった。また，この際固定された記憶としてフリージング行動の測定を行った。

③②の 24 時間後、マウスを再び条件付け装置に入れ、再固定あるいは消去テストを行った。両テストともにマウスを条件付け装置内に 3 分間滞在させ、フリージング行動の測定を行った。

強 US (2 mA/2 秒, 2 回刺激) を用いた測定

①マウスを条件付け装置に入れ 74 秒後と 148 秒後に 2 mA/2 秒の電気刺激を与えた。その 30 秒後にマウスを条件付け装置から取り出し、ホームケージ内に戻した。

②①の 24 時間後、マウスを再び条件付け装置に入れ、再固定あるいは消去トレーニングを行った。再固定トレーニングの場合は 3 分間、消去トレーニングの場合は 30 分間条件付け装置内に滞在させた。このトレーニング中、電気刺激は一切与えなかった。また、この際固定された記憶としてフリージング行動の測定を行った。消去においてのみ同様のトレーニングを翌日も行った。

③②の 24 時間後、マウスを再び条件付け装置に入れ、再固定あるいは消去テストを行った。両テストともにマウスを条件付け装置内に 3 分間滞在させ、フリージング行動の測定を行った。

本条件では記憶の保持テストも行った。①と同様の条件付け後、9 日間にわたり 24 時間ごとにマウスを条件付け装置に 3 分間入れ、フリージング行動を測定し、記憶がどれだけ保持されるかを比較、解析した。

再固定誘導の評価

①弱 US あるいは強 US を用いて恐怖条件付けを行なった。

②①の 24 時間後、マウスを再び条件付け装置に 3 分間入れ、再固定トレーニングを行った。この際、再固定を阻害する目的で $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬であるクロニジン (3 mg/kg) (和光純薬工業株式会社, 東京) を条件付け装置からマウスを取り出

した直後に腹腔内投与した。対照群には溶媒である滅菌生理食塩水を同量投与した。

③②の 24 時間後、マウスを再び条件付け装置に入れ、再固定された記憶の評価を行った。この際、クロニジン投与による再固定阻害作用が認められれば、その時用いた実験条件は再固定の誘導に適しているものであると判断した。

フリージング行動の測定

マウスの記憶はマウスの恐怖行動であるフリージング行動を測定することにより行った。CCD カメラにて記録・保存した動画を用い、測定中にフリージング行動を示した時間の割合（フリージング時間 / 総測定時間 × 100）をデータとした。消去トレーニングにおいては装置に入れてから初めの 3 分間と最後の 3 分間におけるフリージング行動を測定し、データとした。

統計処理

比較する群間で因子が複数存在する場合、2 元配置分散分析あるいは 3 元配置分散分析で因子間の交互作用を解析した。因子間に交互作用が存在しない場合には Tukey's test を用いてその後の検定を行い、交互作用が存在する場合には Wilcoxon signed-rank test を用いてその後の検定を行った。なお、 p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意であると判断した。全ての統計処理には SPSS ソフトウェアを用いた。

結果

弱刺激を用いた文脈的恐怖条件付け試験

弱刺激（1 mA/2 秒，1 回）を用いた恐怖条件付けの 24 時間後，マウスを再び条件付け装置に入れ固定された記憶を評価したところ，control，PD マウス群共に高いフリージング割合を示し，両群間に有意な差は認められなかった（Fig. 5A, B）。次に，条件付け装置に短時間暴露（3 分間）し，記憶の再固定を誘導した 24 時間後，マウスを再び条件付け装置に入れ再固定された記憶を評価したところ，両群とも固定テスト時と同程度のフリージング割合を示し，両群間に有意な差は認められなかった（Fig. 5A）。また，条件付け装置に長時間暴露（30 分間）し，記憶の消去を誘導した 24 時間後，マウスを再び条件付け装置に入れ消去された記憶を評価したところ，固定テスト時と比較し，両群ともに有意なフリージング割合の減少が認められ，また両群間に有意な差は認められなかった（Fig. 5B）。

以上の結果から，弱刺激を用いた恐怖条件付け試験の場合，PD マウスの記憶の固定・再固定・消去は正常に起こることが分かった。

強刺激を用いた文脈的恐怖条件付け試験

強刺激（2 mA/ 2 秒，2 回）を用いた恐怖条件付けの 24 時間後，マウスを再び条件付け装置に入れ固定された記憶を評価したところ，control，PD マウス群共に高いフリージング割合を示し，両群間に有意な差は認められなかった（Fig. 6A, B）。また，条件付け装置に短時間暴露（3 分間）し，記憶の再固定を誘導した 24 時間後，マウスを再び条件付け装置に入れ再固定された記憶を評価したところ，両群とも固定テスト時と同程度のフリージング割合を示し，両群間に有意な差は認められなかった（Fig. 6A）。一方，条件付け装置に長時間暴露（30 分間）し，記憶の消去を誘導した 24 時間後および

48 時間後、マウスを再び条件付け装置に入れ消去された記憶を評価したところ、記憶の固定テスト時よりも有意なフリージング割合の減少が PD マウスでは control マウスと比較し、より早期から認められた (Fig. 6B)。また、恐怖条件付け後 24 時間ごとに短時間 (3 分間) の条件付け装置への再暴露を 9 日間にわたり行い、記憶の保持機能を評価したところ、消去テスト時と同様に PD マウスでは control マウスと比較し有意なフリージング割合の減少がより早期から認められた (Fig. 7)。

以上の結果から、強刺激を用いた恐怖条件付け試験の場合、PD マウスの記憶の固定・再固定は正常に起こるものの、消去が亢進し記憶の保持機能が低下することが分かった。

再固定誘導の評価

記憶の再固定には記憶想起による固定された記憶の不安定化のプロセスが必要であり、強い刺激を用いて恐怖条件付けを行った場合やストレスの多い実験条件下では、CS への再暴露時、短い CS への再暴露では固定された記憶の不安定化が起こりにくく、結果として記憶の再固定が誘導されないことが報告されている [11]。そこで、本研究に用いた実験条件が記憶の不安定化や再固定を誘導できているかどうかを再固定阻害薬投与により解析した。弱刺激あるいは強刺激を用いた恐怖条件付けの 24 時間後、条件付け装置に短時間暴露 (3 分間) し、マウスを装置から取り出した直後に不安定化した記憶が再固定される過程を阻害する作用が報告されているクロニジン [23] を腹腔内投与した。その 24 時間後、マウスを再び条件付け装置に入れ再固定された記憶を評価したところ、弱刺激を用いた実験条件の場合、control, PD マウスともにクロニジン投与群は溶媒投与群と比較し有意なフリージング行動の減少が認められた (Fig. 8A)。この結果は、弱刺激の実験条件では記憶の想起時、記憶の不安定化・再固定の過程は正常に起こっており、その過程はクロニジンによって阻害されたことを示唆している。一方、強刺激を用いた実験条件の場合、クロニジン投与による再固定阻害作用は認めらなかつ

た (Fig. 8B)。この結果から、強刺激を用いた実験条件では短時間の CS 再暴露時に記憶の不安定化・再固定の過程が起こらないことが分かった。

考察

MPTP 誘発性 PD マウスは恐怖条件付け時に与える US の強度にかかわらず、記憶の固定および再固定は正常であった(Fig. 5A, 6A)。記憶の固定と再固定は不安定な状態の記憶を安定な状態として脳内に貯蔵する過程であり、同一の遺伝子発現や新規タンパク合成を必要とするなど、その分子機構は類似していることが示唆されている [51]。例えば、恐怖条件付け後や記憶の短時間想起後に海馬 CA1 領域や扁桃体外側基底核にタンパク質合成阻害薬を投与すると記憶の固定と再固定はともに阻害される [18, 44, 51, 52]。また、両過程ともに同領域におけるグルタミン酸受容体やカルシウム依存性キナーゼの活性化、転写因子 cAMP response element-binding protein (CREB)の働きを必要とする [43, 44, 51, 52]。以上のことから、MPTP 誘発性 PD マウスにおいて不安定な記憶を安定化する過程や関連脳領域の機能は正常であることが示唆される。

記憶の消去は元の記憶が忘却されるわけではなく、CS に対して安全であるという新しい記憶が形成されることで、結果として恐怖記憶の減弱が起こる現象である [48]。また、記憶の消去と再固定は記憶の減弱と増強という正反対の現象を引き起こすものの、両者ともに固定された記憶の想起依存性に起こるなど、同一のプロセスを必要とする [43, 76]。記憶の想起後、記憶が再固定あるいは消去どちらの過程をたどるかは、恐怖条件付け時の US 強度や恐怖条件付けから想起までの日数、想起時間の長さ (CS 再暴露の長さ) に左右され、それら条件依存的に記憶は再固定から消去へシフトすることが近年の研究から見出されている [33, 40]。また、消去学習による記憶の減弱と再固定阻害による記憶の減弱とは関わっている脳領域や遺伝子、タンパク質に相違があることが考えられている [48, 49]。本研究では、MPTP 誘発性 PD マウスは記憶の再固定は正常であるものの、消去が亢進することが明らかとなった(Fig. 5A, 6A, B)。この結果から、PD マウスでは再固定に関わる脳領域や遺伝子よりもむしろ消去に関わる脳領

域や遺伝子、タンパク質合成に変化が生じている可能性が示唆された。また、恐怖記憶の想起後、PD マウスでは記憶の増強よりも減弱を誘導する過程へのシフトが亢進している可能性も考えられ、それは CS への短時間頻回暴露での記憶の保持機能減弱の結果 (Fig. 7) とも一致する。

本研究では恐怖条件付け時に与える US の強度に比較的弱い刺激 (1 mA/2 秒, 1 回) と強い刺激 (2 mA/2 秒, 2 回) を用いて実験を行った。その結果、弱刺激では恐怖記憶の消去に両群間で変化は認められず、強刺激を用いた場合でのみ PD マウスの消去亢進が認められた (Fig.5B, 6B)。本研究と同様に、異なる US の強度がその後の記憶に異なる影響を及ぼすことを示した論文がいくつか報告されている。Baldi らは US 強度が強いほど恐怖記憶の固定や汎化が増強されることを報告 [7] しており、Wiltgen らは海馬の機能に障害を受けたマウスは弱い US 下では恐怖記憶の固定が障害されるものの、強い US では恐怖記憶の固定が正常に起こることを見出している [83]。このように、記憶の固定や再固定・消去を比較するにあたって US 強度の選択は非常に重要であり、本研究で用いた強い US は恐怖記憶の消去や保持機能を解析する際に有用であることが分かった。

再固定誘導直後に再固定阻害作用が報告されているクロニジン投与したところ、弱い US 条件下では再固定が阻害されたものの、強い US 条件下では再固定が阻害されなかった (Fig. 8A, B)。クロニジンは想起後、不安定化した記憶が再固定される過程を阻害するため [23]、本研究で用いた弱 US 条件では記憶の不安定化・再固定のプロセスが正常に起きているのに対し、強 US 条件では記憶の不安定化が起きず、再固定が誘導されないことが分かった。強い US を用いた場合、記憶の固定が強固に起こり、記憶の想起時に不安定化が起こりにくくなったため、再固定が生じないことが考えられる。記憶の不安定化は CS への再暴露時間に依存する [11] ため、本 US 条件において記憶の再固定を誘導するためには、より長期間の CS 再暴露を行う必要がある。しかしながら、

再固定が正常に起こる弱い US 条件下において PD マウスの再固定は正常であったことから、PD マウスの再固定能力は control マウスと同等であると考えられる。

本章の結果から、MPTP 誘発性 PD モデルマウスは恐怖記憶の固定並びに再固定は正常であるものの、恐怖記憶の消去が亢進し、保持機能が減弱していることが分かった。このことから、記憶の消去亢進ならびに保持機能低下が PD に併発する認知障害に関与している可能性が示唆された。本章の PD マウスで認められた記憶の消去亢進を MPTP 誘発性 PD マウスにおける認知障害と定義し、次章で PD マウスの認知障害の発症機構を解析した。

第3章

パーキンソン病モデルマウスに
おける消去亢進のメカニズム解析
及び
ロリプラムによる改善効果の検討

緒言

恐怖記憶の消去は条件付け記憶の想起依存性に起こり、条件刺激 (conditioned stimulus: CS) に対する新しい記憶の形成によって、恐怖記憶が減弱する現象である [48]。また、文脈的恐怖条件付け試験において恐怖記憶の消去には海馬、扁桃体、前頭前皮質 (medial prefrontal cortex: mPFC) が密接に関与している [43, 46, 48]。そのなかでも海馬は、記憶の想起、新しい記憶の形成時ともに重要な領域であり [10, 48, 68, 73]、海馬の機能変化や海馬と他脳領域との相互作用の変化は恐怖記憶の消去に影響を及ぼす [56, 78] ことが知られている。また、海馬には CA1, CA3, 歯状回 (dentate gyrus: DG) といった亜領域が存在し、恐怖記憶に対して異なった働きをする。例えば、CA1 は CS の文脈情報を認識し、扁桃体と相互作用することで CS と無条件刺激 (unconditioned stimulus: US) との情報を結びつける役割を担うなど、恐怖記憶の固定や再固定時に重要な領域である [43, 50]。近年、DG が恐怖記憶の想起や消去に重要な役割を担うことが報告されており、扁桃体との相互作用や神経細胞の変化が記憶の想起や消去に重要であることが示唆されている [56, 61, 73]。また、1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 誘発性パーキンソン病 (parkinson's disease: PD) モデル動物を用いた研究において海馬の機能や空間記憶等の海馬依存性記憶の障害が報告されている [21, 47, 84, 85]。よって、本研究で認められた PD マウスの恐怖記憶消去亢進にも海馬の機能変化が関与している可能性がある。

cAMP は細胞内セカンドメッセンジャーとしてはたらく分子の一つであり、タンパク質リン酸化酵素 A (protein kinase A: PKA) の活性化を介して cAMP response element-binding protein (CREB) のリン酸化並びに CREB が仲介するタンパク質合成を促進する (Fig. 9) [12, 63]。この cAMP-PKA-CREB 経路は海馬の神経細胞における長期増強 (long-term potentiation: LTP) や海馬依存性記憶、文脈的恐怖記憶の想

起・増強・消去にも密接に関与していることが報告されている [43, 50, 63]。また、CREB は文脈的恐怖記憶の固定・再固定・消去に重要な転写因子であり、CREB の標的遺伝子としてシナプス可塑性や学習・記憶を制御する activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) や神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 等が知られている [12]。cAMP-PKA-CREB シグナルはこれら遺伝子の発現制御、タンパク質合成を介して恐怖記憶の固定・再固定・消去の制御に関わっていると考えられている。

細胞内における cAMP の調節にはホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase: PDE) が重要な役割を担っており、中でも PDEIV は中枢神経系において大脳皮質や海馬といった記憶を司る領域に豊富に存在し、長期記憶等に密接に関与している [63]。また、ロリプラムを始めとする PDEIV 阻害剤は海馬 cAMP-PKA-CREB シグナルを増強し、海馬シナプスの長期増強 (long-term potentiation: LTP) や海馬依存性記憶を増強するだけでなく、文脈的恐怖記憶を増強することなども報告されている [45, 54, 66]。さらにロリプラムは加齢や脳虚血、アルツハイマー病に伴う認知障害を改善する [6, 26, 42] など認知障害治療薬としてもその効果が確認されている。

そこで本章では、PD マウスの消去亢進のメカニズムを解析するため、恐怖記憶関連脳領域の神経活性や CREB の関与を精査するとともに、ロリプラムの認知障害改善効果の検討を行った。

材料と方法

動物及び MPTP 投与

第 1 章の記載に準じて実施した。

抗 c-Fos 抗体を用いた免疫組織化学及び c-Fos 陽性細胞数の評価

強刺激を用いた恐怖条件付け実験条件の 2 回目の消去直後, 30, 60 分後にマウスをジエチルエーテルにて麻酔し, phosphate-buffered saline (PBS) と 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定の後, 断頭し, 取り除いた全脳を 4%パラホルムアルデヒド溶液で再固定した。固定後, マイクロスライサー (堂阪イーエム, 京都) で 40 μm の厚さの切片を作製した。作製した切片は, まず 0.5%TritonX-100 含有 PBS (TPBS) で 1 時間室温にて処置した。次に PBS で 100 倍希釈した過酸化水素を 40 分間処置し, TPBS で洗浄後, TPBS で 100 倍希釈したブロックエース (雪印, 東京) を室温で 1 時間処置した。TPBS で洗浄後, TPBS で 5,000 倍希釈した抗 c-Fos ウサギポリクローナル抗体 (EMD Millipore, MA, USA) を 4°C の条件下で 24 時間処置した。その後, TPBS で洗浄し, TPBS で 500 倍希釈した 2 次抗体 (ビオチン化 anti-rabbit IgG; Vector, CA, USA) を 4°C の条件下で 2 時間処置した。処置した切片を TPBS で洗浄し, avidine-biotin-horseradish peroxidase を 4°C の条件下で 2 時間処置し, PBS で洗浄した後, 3,3-diaminobenzidine etrhydrochloride (和光純薬工業, 大阪) を用いて発色した。その後, 切片を PBS で 5 分間, 3 回洗浄し, スライドガラスに移し, 50%グリセロール PBS で封入後, 光学顕微鏡下で観察および, 海馬 (ブレグマ後方 1.82 - 2.06 mm) ・ mPFC (ブレグマ前方 1.34 - 1.94 mm) ・ 扁桃体 (ブレグマ後方 1.58 - 1.94 mm) における c-Fos 陽性細胞の計測を行った。この際, 海馬は CA1, 歯状回 (dentate gyrus: DG) に, 扁桃体は外側部 (lateral amygdala: LA), 外側基底部 (basolateral amygdala: BLA),

中央部 (central amygdala: CeA) に, mPFC は前辺縁皮質 (prelimbic cortex: PL), 下辺縁皮質 (infralimbic cortex: IL) に分けて評価した。全ての切片における左右各脳領域の c-Fos 陽性細胞数を評価し, その合計数を結果とした。

海馬 cAMP 濃度測定

海馬組織サンプルは, 強刺激を用いた恐怖条件付け実験条件の 2 回目の消去直後, あるいは一切の条件付けを行わずマウスをジエチルエーテル麻酔下で断頭し, 採取・凍結した。海馬組織重量の 10 倍量の 5%トリクロロ酢酸を添加し, ポリトロン型ホモジナイザーにて組織を可溶化した。その後サンプルを遠心分離器にて遠心 (1,500 rcf, 10 分間) し, 上清を採取後, 更に 3 倍量の 5%トリクロロ酢酸を加えた。次に, サンプルの 5 倍量の無水エーテルを加え 10 回の転倒混和後, 静置し, 上清のエーテル層を取り除いた。この操作を 3 回繰り返したのち, 残留する無水エーテルを取り除くため 70°C, 5 分間加熱した。cAMP 測定には cAMP EIA kit (Cayman Chemical Company, MI, USA) を使い, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて行った。吸光度は 415 nm の波長にて測定を行った。測定時には 750 pmol - 0.3 pmol 間で 8 つのプロット点が存在するスタンダードサンプルを用い, スタンダードカーブを作成し, cAMP 濃度の計算に用いた。また, 全てのサンプル及びスタンダードサンプルは 2 回の繰り返し測定を行い, その平均値をデータとした。cAMP 濃度は pmol/海馬タンパク質量 (mg) で標準化した。海馬のタンパク質定量には protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いた。

蛍光免疫組織化学

強刺激を用いた恐怖条件付け実験条件の 2 回目の消去 30 分後にマウスをジエチルエーテル麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定の後, 断頭し, 取り除いた全脳

を4%パラホルムアルデヒド溶液で再固定した。固定後、マイクロスライサー（堂阪イーエム、京都）で40 μmの厚さの切片を作製した。作製した切片は、まずTPBSで1時間室温にて処置した。次に、TPBSで100倍希釈したヤギ血清を室温で1時間処置した。TPBSで洗浄の後、TPBSで500倍希釈した抗リン酸化CREB（phosphorylated CREB: p-CREB）ウサギポリクローナル抗体（Cell Signaling Technology Inc, MA, USA）を4℃の条件下で48時間処置した。その後、TPBSで洗浄し、TPBSで5,000倍希釈したAlexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG（Thermo Fisher Scientific, MA, USA）を4℃の条件下で2時間処置した。処置した切片をTPBSで洗浄し、TPBSで5,000倍希釈した抗NeuNマウスモノクローナル抗体（EMD Millipore, MA, USA）、あるいは抗GFAPマウスモノクローナル抗体（Cell Signaling Technology Inc, MA, USA）、doublecortin (DCX)マウスモノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology, TX, USA）を4℃の条件下で24時間処置した。その後、TPBSで洗浄し、TPBSで5,000倍希釈したAlexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG（Thermo Fisher Scientific, MA, USA）を4℃の条件下で2時間処置した。PBSで5回洗浄した後、Vectashield（Vector Laboratories Inc, CA, USA）にて封入後、共焦点レーザー顕微鏡（C2+, Nikon, 東京）下で観察および、海馬（ブレグマ後方1.82 – 2.06 mm）におけるp-CREB陽性細胞の計測を行った。全ての切片における左右各脳領域のp-CREB陽性細胞数を評価し、その合計数を結果とした。

消去トレーニング時におけるロリプラム投与

ロリプラム（東京化成工業、東京）は1%DMSOで希釈した。ロリプラムは消去トレーニングの2時間前に1, 2, 3 mg/kg, 200 μl/20 gの用量でマウスに腹腔内投与した。対照群には、1%DMSOを同量投与した。その他の方法は第2章の強刺激時における消去トレーニングの方法に準じて行った。

正中縫線核 (median raphe nucleus: MRN) への逆向性色素投与及び評価

逆向性色素には滅菌生理食塩水で希釈した 2%fluorogold (Setarch Biotech LLC, OR, USA) 水溶液を用いた。マウスを 2,2,2-tribromoethanol (0.32 mg/kg, i.p.; Sigma Aldrich, MO, USA) で麻酔し, 脳定位固定装置 (SR-5; 成茂, 東京) に固定した。ブレグマから後方に 4.5 mm かつ正中に歯科用ドリルを用いて頭蓋骨に小孔をあけ, 4.7 mm の深さまでカニューレを挿入した。Fluorogold の投与は 10 μ L マイクロシリンジ (ITO, 富士, 日本) を用い, 50 nl 投与した。2%Fluorogold 投与から 2 日後, マウスをジエチルエーテル麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定の後, 断頭し, 取り除いた全脳を 4%パラホルムアルデヒド溶液で再固定した。固定後, マイクロスライサー (堂阪イーエム, 京都) で 40 μ m の厚さの切片を作製した。作製した切片はまず TPBS で 1 時間室温にて処置した。次に TPBS で 100 倍希釈したブロックエース (雪印, 東京) を室温で 1 時間処置した。その後, SNpc 切片に TPBS で 5,000 倍希釈した抗チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase: TH) マウスモノクローナル抗体 (EMD Millipore, Inc, MA, USA) あるいは抗 glutamate decarboxylase (GAD) 67 マウスモノクローナル抗体を, MRN 切片に 5,000 倍希釈した抗トリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase: TPH) マウスモノクローナル抗体 (EMD Millipore, Inc, MA, USA) を 4°C の条件下で 24 時間処置した。TPBS で洗浄後, TPBS で 5,000 倍希釈した Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を 4°C の条件下で 2 時間処置した。PBS で洗浄した後, Vectashield (Vector Laboratories Inc, CA, USA) で封入後, 共焦点レーザー顕微鏡 (C2+, Nikon, 東京) 下で 405 nm, 及び 561 nm の波長を用いて観察を行った。MRN の位置は TPH 陽性細胞を, SNpc の位置は TH 陽性細胞を指標に確認した。

統計処理

2 群間の比較には等分散性の検定のために F 検定を行い、等分散の場合 Student's t -test を行った。多群比較では、Bartlett's test で等分散を確認した後、1 元配置分散分析を行った。有意差が得られた場合には、Tukey's test による多重比較を行い、有意差が得られない場合には Kruskal-Wallis 検定及び、その後の検定に Mann-Whitney U-tests を用いて多重比較を行った。比較する群間で因子が複数存在する場合、2 元配置分散分析あるいは 3 元配置分散分析で因子間の交互作用を解析した。因子間に交互作用が存在しない場合には Tukey's test を用いてその後の検定を行い、交互作用が存在する場合には Wilcoxon signed-rank test を用いてその後の検定を行った。なお、 p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意であると判断した。全ての統計処理には SPSS ソフトウェアを用いた。

結果

恐怖記憶消去後の c-Fos 陽性細胞数の評価

恐怖記憶消去直後, 30 分, 60 分後に恐怖記憶に関わる脳領域である海馬・扁桃体・前頭前皮質における神経活性を c-Fos 陽性細胞数を指標に評価した。また, 海馬は CA1, DG (Fig. 10A-C) に, 扁桃体は LA, BLA, CeA (Fig. 11A-D), mPFC は PL, IL (Fig. 12A-C) といった神経核に分けて解析した。その結果, 全ての脳領域における神経核において control 及び PD マウス群共に恐怖記憶消去直後と比較し, 30 分や 60 分後で c-Fos 陽性細胞数の増加が認められたものの, 両群間に有意な差は認められなかった。つまり, 消去後において両群間の神経活性に有意な差はなく, PD マウスの恐怖関連神経回路そのものは正常に機能していることが分かった。

海馬における恐怖記憶消去前後での cAMP 濃度の測定

消去トレーニングの直後あるいは, 一切の恐怖条件付け等を行わないマウスの海馬を摘出し, ELISA 法にて cAMP の濃度を測定した。その結果, 恐怖条件付けを行っていない条件及び恐怖記憶消去直後の海馬において PD マウスの cAMP 濃度は control マウスと比較し有意に減少していた (Fig. 13A, B)。つまり, 消去時を通して PD マウスの海馬では cAMP の濃度が減少していることが分かった。

海馬における恐怖記憶消去後の p-CREB の発現解析

恐怖記憶の消去 30 分後, 海馬における p-CREB の発現を解析した。その結果, 海馬 CA1, CA3 領域では control, PD マウスともに p-CREB 陽性細胞の発現はわずかに認められる程度であった (Fig. 14A, B)。一方海馬 DG 領域においては, 両群ともに高密度

な p-CREB 陽性細胞数の発現が認められ、その発現数を評価したところ、PD マウス群は control マウス群と比較して有意に p-CREB 陽性細胞数が減少していた (Fig. 15A, B)。また、p-CREB 陽性細胞は両群ともに成熟神経細胞のマーカである NeuN と 30%に満たない程度の共発現を認めた (Fig. 16A, B)。一方、アストロサイトのマーカである GFAP とはほとんど共発現せず (Fig. 17A)、未熟神経細胞のマーカである DCX とは多くの共発現が認められた (Fig. 17B)。この結果から、恐怖記憶の消去後、PD マウスは海馬 DG 領域の p-CREB 発現が減少しており、その p-CREB 発現の多くは未熟細胞に、中程度は成熟神経細胞に認められることが分かった。

ロリプラムの PD マウス消去亢進および p-CREB 発現減少に対する改善効果の解析

ホスホジエステラーゼ PDEIV 選択的阻害薬ロリプラム投与による PD マウスの消去亢進の改善効果を検討した。その結果、PD マウスに溶媒である 1%DMSO を投与した群ではこれまでの結果と同様に control マウスより早期からのフリージング割合の減少、つまり消去の亢進が認められた。一方で、PD マウスにロリプラムを投与した群では用量依存的にフリージング割合の早期減少が改善した。また、高用量群 (2, 3 mg/kg) においては、control マウス群レベルにまで消去機能を改善させた (Fig. 18B)。一方、control マウス群にロリプラムを投与した場合には、1%DMSO を投与した群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 18A)。

次に、ロリプラム投与による PD マウス消去亢進の改善後、海馬 DG 領域の p-CREB 発現を解析した。その結果、PD マウスで認められた p-CREB の発現減少はロリプラム投与により control マウスレベルにまで回復した (Fig. 19A, B)。また、ロリプラムは p-CREB 陽性細胞と NeuN との共発現割合には影響を及ぼさなかった (Fig. 20A, B)。

以上の結果から、ロリプラムには PD マウスの消去亢進に対して行動学的にも分子生物学的にも改善効果を有することが分かった。

SNpc から MRN への神経投射の解析

PD では黒質線条体ドパミン (dopamine: DA) 神経の変性だけではなく、MRN のセロトニン (serotonin, 5-hydroxytryptamine: 5-HT) システムの機能低下も報告されている [15, 20, 25]。しかしながら、黒質 DA 神経が MRN の 5-HT 神経との関係性についてはあまり理解されていない。そこで、黒質の DA 神経が MRN に投射しているかどうかを MRN に逆向性トレーサー (2%fluorogold) を投与することにより解析した (Fig. 21A)。その結果、fluorogold は黒質中に認められたものの TH 陽性細胞とは共発現していなかった (Fig. 21B)。一方で、GAD67 陽性細胞とは共発現が認められ (Fig. 21B)、黒質の GABA 神経が MRN に投射していることが分かった。

考察

PD マウスは恐怖記憶の消去後、恐怖記憶関連脳領域である海馬・扁桃体・前頭前皮質全ての領域において、神経活性のマーカーである c-Fos 発現量は control 群との間で変化が認められなかった (Fig. 10, 11, 12)。この結果は、PD マウスの恐怖記憶消去に関わっている神経回路は正常に機能していることを示唆している。恐怖記憶の消去が正常に起こるためには神経核の活性化だけではなく、遺伝子発現や新規タンパク質の合成を介したシナプス可塑性の変化などを必要とする [43, 49, 50, 76]。c-Fos は活性化した神経細胞から発現誘導される前初期遺伝子であるため、神経活性の指標として用いられる [39] が、シナプス可塑性の変化やそれに関わる遺伝子発現、タンパク質合成等の変化を反映しているわけではない。つまり、PD マウスの消去亢進は恐怖記憶回路そのものの障害に起因するわけではなく、関連脳領域における遺伝子発現や新規タンパク質合成、シナプス可塑性の変化に起因していると考えられる。

本研究では海馬 cAMP-PKA-CREB 経路の PD マウス恐怖消去亢進への関与を精査した。海馬は恐怖条件付け記憶において、CS の文脈情報を扁桃体に送り US と関連付ける役割や記憶想起時の文脈認識の役割等を担っており [68, 69, 73]、恐怖記憶の獲得・想起・固定・再固定・消去のいずれのプロセスにおいても必要不可欠な領域である。海馬には CA1, CA3, DG といった亜領域が存在するが、その中でも近年、DG が恐怖記憶の想起や消去において重要な役割を担っていることが報告されている。例えば、DG は成熟した個体においても神経細胞の新生が行われる領域であり、神経細胞の新生数や新生した神経細胞が神経回路へ動員される割合の変化と恐怖記憶消去との関連性が示唆されている [56]。また、DG における CREB 発現の増加が恐怖記憶の想起を増強する [73] ことや、DG における LTP やスパインの形成が記憶の想起時に CS の情報を扁桃体に送る際に機能していることが報告されている [61, 68]。恐怖記憶の消去は記憶の

想起依存的に起こるため、DGの恐怖記憶想起に関する役割は恐怖記憶の消去時においても同様に重要であることが示唆される。また、海馬におけるcAMP-PKA-CREBは恐怖記憶の固定・再固定・消去において重要なシグナルカスケードのひとつである。海馬におけるcAMPの高発現は恐怖記憶の獲得を増強し恐怖記憶消去を遅延させ[45], PKAを抑制したトランスジェニックマウスでは恐怖記憶の消去が促進する [34]。さらに、恐怖記憶消去時には海馬でCREBの発現が増加する [14] など、恐怖記憶消去に対するcAMP-PKA-CREBシグナルの役割は数多く報告されている。本研究では、PDマウスの消去時において、海馬でのcAMPレベルの減少及び海馬DGでのp-CREBの発現減少が認められ (Fig.13, 15), ロリプラムにより海馬cAMP-CREB経路を増強することでPDマウスの消去亢進は改善した (Fig. 18, 19)。この結果から、PDマウスは海馬DGのcAMP-PKA-CREB経路の減弱によって、恐怖記憶の消去亢進が生じていることが示唆された。

本研究で認められたp-CREB発現は成熟細胞やグリア細胞ではなく未熟細胞で多く認められた (Fig. 16, 17, 20)。海馬DGは成熟した個体においても神経細胞の新生が行われる領域であり、神経新生やそれに伴う神経回路形成は学習や記憶、精神機能に大きな影響を与える [4]。近年、海馬DGにおける神経細胞新生の増加は恐怖記憶の消去を亢進し [56], さらに未熟細胞そのものが海馬依存性記憶に影響を及ぼすといった報告がある [28]。しかしながら、未熟細胞と恐怖記憶消去との関連性については未だ不明な点が多い。今後、海馬DG未熟細胞におけるp-CREBの発現と恐怖記憶消去との関連性について更なる研究が必要である。

PDEは構造的および機能的特徴から11のファミリーに分類され、21の遺伝子によってコードされており、cAMPやcGMPの環状リン酸ジエステルを加水分解する (Fig. 9) [63]。その中でもPDEIVは末梢組織だけではなく中枢神経系にも多くの発現が認められ、特に海馬や皮質、扁桃体、線条体などの記憶や精神機能を司る領域に高い発現が認

められている [63]。また、ロリプラムを始めとする PDEIV 阻害薬は LTP や海馬依存性記憶、長期記憶増強の効果を有することが報告されており、加齢やアルツハイマー病、脳虚血等に起因する認知障害への改善効果等も報告されている [6, 26, 42]。本研究においても、ロリプラムは PD マウスの消去亢進並びに海馬 DG のリン酸化 CREB 発現の減少を改善した (Fig. 18B)。一方で、ロリプラムは control マウスの消去機能には何ら影響を与えなかった (Fig. 18A)。Monti らはロリプラムの長期投与は恐怖記憶の獲得を増強し消去を遅延させるものの、ロリプラムの短回投与は消去機能に影響を及ぼさないことを報告している [45]。これらの事から、恐怖記憶の消去が正常に起こるためにはある閾値以上の cAMP のはたらきが必要であり、ロリプラムは海馬 DG 領域において、正常な消去を起こすために必要となる閾値濃度以上に cAMP を増加させることで、PD マウスの消去亢進を改善していることが示唆される。

PD に対する治療薬の多くは、対症療法として不足した DA 補充を狙ったもので、運動機能改善効果の面で PD 患者の Quality of Life に大きく貢献している [16]。しかしながら、レボドパをはじめとする DA 補充薬は認知障害に効かない場合が多く、PD に併発する認知障害に対する治療薬は未だ充実していない [16, 24]。また、DA 神経傷害を緩和し、認知機能改善を示した報告も存在するが、実用化には至っていない [13, 84]。本研究は、黒質の DA 神経そのものではなく、黒質 DA 神経の傷害により間接的に障害された海馬の機能をロリプラムによって改善している。今後ロリプラムの PD に併発する認知障害に対する効果の理解を更に深めることで、PD による認知障害の新規治療薬として大きな貢献が期待できる。

DA は学習や作業記憶、エピソード記憶、海馬依存性記憶、LTP などにおいて重要な役割を担っている [55, 67, 74]。例えば、D1/D5 受容体は海馬 LTP を制御し、エピソード記憶に関与する [31]。また、D1 受容体欠損マウスは空間記憶能力の障害が認められる [71] など、DA と海馬依存性記憶は密接に関与している。MPTP 誘発性 PD モデル

マウスにおいても同様に作業記憶や空間学習能力、海馬依存性記憶の減弱が報告されている [13, 21, 84]。本研究においても文脈的恐怖記憶の消去の亢進や保持機能の減弱並びに、海馬 DG での cAMP-CREB シグナルの減弱が認められた (Fig. 6B, 7, 13, 15)。cAMP シグナルは DA によっても調節されることから、SNpc の DA 神経脱落は海馬の DA システムを減弱させ認知障害を引き起こしていることが示唆される。しかしながら、PD の認知障害にレボドパやドパミンアゴニストなどの DA 補充療法が効かない場合が多いこと [15, 24] から、DA 以外の経路が引き金となって海馬の機能不全を起こしている可能性が考えられる。その可能性として考えられる原因の一つに他のモノアミン系神経伝達物質の関与が挙げられる。人の PD では、SNpc の DA 神経系だけでなく、縫線核 5-HT 神経系や青斑核ノルアドレナリン (noradrenalin: NA) 神経系の減弱が報告されている。また、PD モデル動物においても DA 以外のモノアミン系の異常も報告されている [15, 20]。5-HT や NA は精神機能の調節に大きな役割を担っており、認知機能への関与も報告されている [30]。本研究では、5-HT 神経を多く含み、脳の広範囲に 5-HT 神経を投射している神経核である MRN に逆向性トレーサーを投与し、黒質の MRN への投射を解析した。その結果、黒質の GABA 神経が MRN へ投射していることが確認できたものの、DA 神経の投射は確認できなかった (Fig. 21)。この結果は、背側縫線核 (dorsal raphe nucleus: DRN) に逆向性トレーサーを投与した Kirouac らの研究 [37] と類似しており、黒質は DA 神経の他に GABA 神経を多く含むため、本研究で認められた MRN へ投射する黒質の神経は GABA 神経であることが考えられる。一方で、DRN 並びに MRN の 5-HT 神経に逆向性蛍光色素 EGFP を発現させた研究では、黒質の DA 神経や大脳基底核神経細胞が DRN や MRN に投射していることが示されている [59]。この結果の相違は、DRN 及び MRN は腹側部や背側部で投射先が異なり、逆向性トレーサーを用いた実験では縫線核 5-HT 神経の広範囲に逆向性蛍光色素を遺伝子導入した実験と比較すると、逆向性色素注入が縫線核の一部分に限局されたなどの理由が考えられ

る。これらのことから、SNpcのDA神経脱落は、縫線核5-HT神経や青斑核NA神経にも影響を及ぼし、間接的に海馬の機能にも影響を及ぼした可能性が考えられる。しかしながら、5-HTやNAとPDマウス消去亢進との関係性は不明であり、今後更なる研究が必要である。

本章の結果から、PDマウスの消去亢進は海馬DG領域のcAMP-CREB経路の減弱に起因し、海馬DG領域のcAMP-CREB経路の減弱をロリプラムによって増強することで、消去の亢進が改善されることが示唆された。

結論

パーキンソン病 (parkinson's disease: PD) において認知障害は高率に発症するにもかかわらず、そのメカニズムは明らかではなく、有効な治療薬は存在しない。本研究は 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine phosphodiesterase (MPTP) 誘発性 PD モデルマウス (PD マウス) を用いて、記憶の固定・再固定・消去を行動学的及び分子生物学的に解析した。また、新規治療薬としてホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase: PDE) IV 阻害薬ロリプラムの検討を行った。

第 1 章では MPTP の急性投与により PD マウスを作出し、病理学的及び行動学的に評価を行った。その結果、MPTP 急性投与は黒質線条体のドパミン (dopamine: DA) 神経脱落と運動障害を引き起こすことを示した。第 2 章では文脈的恐怖条件付け試験を用いて PD マウスの記憶の固定・再固定・消去能力を解析した。その結果、PD マウスは記憶の固定・再固定は正常であるものの、消去が亢進し、保持能力が減弱していることを見出した。第 3 章では PD マウスの消去時における海馬 cAMP-cAMP response element-binding protein (CREB) 経路の解析および PDEIV 阻害剤ロリプラムの改善効果を検討した。その結果、PD マウスでは恐怖記憶の消去時に海馬 cAMP シグナルが低下しており、さらに海馬歯状回 (dentate gyrus: DG) 領域においてリン酸化 CREB 発現が減弱していることを見出した。また、消去の亢進並びに cAMP-CREB シグナルの減弱はロリプラムによって改善し、ロリプラムによる治療効果を示した。

以上をまとめると、黒質線条体 DA 神経傷害は海馬 DG 領域における cAMP-CREB 経路の減弱を誘導し、その結果、記憶の消去亢進を引き起こすことが示唆された。つまり、PD に併発する認知障害は海馬 DG の機能低下による消去亢進が関与している可能性がある。また、ロリプラムは減弱した海馬 DG の cAMP-CREB シグナルを補うことで、消去亢進の改善効果が期待でき、PD に併発する認知障害に対する新規治療薬となり得る。

謝辞

本研究の遂行にあたり、日頃よりご懇篤なるご指導、ご助言を賜りました岐阜大学大学院連合獣医学研究科、帯広畜産大学基礎獣医薬理学研究室の石井利明教授、室井喜景准教授、家畜病理学研究室の古岡秀文教授、岐阜大学獣医薬理学研究室の海野年弘教授に深甚なる謝意を表します。

また、論文を作成するにあたり、ご校閲賜りました岐阜大学大学院連合獣医学研究科、岩手大学の宇塚雄次教授、東京農工大学の下田実教授に心より御礼申し上げます。

大学院生活を支えていただきました岐阜大学大学院連合獣医学研究科の諸先生ならびに事務職員の方々に篤くお礼申し上げます。

また、帯広畜産大学基礎獣医薬理学研究室の諸先輩、後輩たちのおかげで非常に充実した大学院生活がおくれました。本当にありがとうございました。

最後に、実験のために犠牲になりました多くの動物に哀悼の意を表します。

参考文献

- 1] Aarsland, D., Ballard, C., Rongve, A., Broadstock, M. and Svenningsson, P. (2012). Clinical trials of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Curr Neurol Neurosci.* 12, 492-501.
- 2] Aarsland, D., Bronnick, K., Williams-Gray, C., Weintraub, D., Marder, K., Kulisevsky, J., Burn, D., Barone, P., Pagonabarraga, J., Allcock, L., Santangelo, G., Foltynie, T., Janvin, C., Larsen, J.P., Barker, R.A. and Emre, M. (2010). Mild cognitive impairment in Parkinson disease: a multicenter pooled analysis. *Neurology.* 75, 1062-1069.
- 3] Abrari, K., Rashidy-Pour, A., Semnianian, S. and Fathollahi, Y. (2008). Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: dependence upon training intensity. *Neurobiol Learn Mem.* 89, 178-84.
- 4] Abrous, D.N., Koehl, M. and Le Moal., M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 85, 523-69.
- 5] Alexander, G.E. and Crutcher, M.D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13, 266-71.
- 6] Bach, M.E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y.F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D. and Kandel, E.R. (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 5280–5285.
- 7] Baldi, E., Lorenzini, C.A. and Bucherelli, C. (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 81, 162-6.
- 8] Beccano-Kelly, D.A., Volta, M., Munsie, L.N., Paschall, S.A., Tatarnikov, I., Co, K., Chou, P.,

- Cao, L.P., Bergeron, S., Mitchell, E., Han, H., Melrose, H.L., Tapia, L., Raymond, L.A., Farrer, M.J., and Milnerwood, A.J. (2015). LRRK2 overexpression alters glutamatergic presynaptic plasticity, striatal dopamine tone, postsynaptic signal transduction, motor activity and memory. *Hum Mol Genet.* 24, 1336-49.
- 9] Bezard, E., Dovero, S., Bioulac, B. and Gross, C. (1997). Effects of different schedules of MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. *Exp Neurol.* 148, 288-92.
- 10] Bouton, M.E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learn. Mem.* 11, 485–494.
- 11] Bustos, S.G., Giachero, M., Maldonado, H. and Molina, V.A. (2010). Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology.* 35, 1097-1108.
- 12] Carlezon, W.A.Jr., Duman, R.S. and Nestler, E.J. (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 28, 436-45.
- 13] Castro, A.A., Wiemes, B.P., Matheus, F.C., Lapa, F.R., Viola, G.G., Santos, A.R., Tasca, C.I. and Prediger, R.D. (2013). Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1513, 103-16.
- 14] Chai, N., Liu, J.F., Xue, Y.X., Yang, C., Yan, W., Wang, H.M., Luo, Y.X., Shi, H.S., Wang, J.S., Bao, Y.P., Meng, S.Q., Ding, Z.B., Wang, X.Y. and Lu, L. (2014). Delayed noradrenergic activation in the dorsal hippocampus promotes the long-term persistence of extinguished fear. *Neuropsychopharmacology* 39, 1933-45.

- 15] Chaudhuri, K.R., Healy, D.G. and Schapira, A.H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5, 235-45.
- 16] Chaudhuri, K.R., Rzos, A. and Sethi, K.D. (2013). Motor and nonmotor complications in Parkinson's disease: an argument for continuous drug delivery?. *J Neural Transm (Vienna)*. 120, 1305-20.
- 17] Chiueh, C.C., Wu, R.M., Mohanakumar, K.P., Sternberger, L.M., Krishna, G., Obata, T. and Murphy, D.L. (1994). In vivo generation of hydroxyl radicals and MPTP-induced dopaminergic toxicity in the basal ganglia. *Ann NY Acad Sci.* 738, 25-36.
- 18] Debiec, J., LeDoux, J.E. and Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, 527-38.
- 19] Dujardin, K., Defebvre, L., Krystkowiak, P., Degreef, J.F. and Destee, A. (2003). Executive function differences in multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 9, 205-11.
- 20] Emre M. Dementia in Parkinson's disease: cause and treatment. (2004). *Curr Opin Neurol.* 17, 399-404.
- 21] Ferro, M.M., Bellissimo, M.I., Anselmo-Franci, J.A., Angellucci, M.E., Canteras, N.S. and Da Cunha, C. (2005). Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods.* 148, 78-87.
- 22] Fujikawa, T., Miguchi, S., Kanada, N., Nakai, N., Ogata, M., Suzuki, I. and Nakashima, K. (2005). *Acanthopanax senticosus* Harms as a prophylactic for MPTP-induced Parkinson's disease in rats. *J Ethnopharmacol.* 97, 375-81.
- 23] Gamache, K., Pitman, R.K. and Nader, K. (2012). Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder.

Neuropsychopharmacology 37, 2789-96.

- 24] Gevaerd, M.S., Miyoshi, E., Silveira, R., Canteras, N.S., Takahashi, R.N. and Da Cunha, C. (2001). L-Dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 4, 361-70.
- 25] Giráldez-Pérez, R., Antolín-Vallespín, M., Muñoz, M. and Sánchez-Capelo, A. (2014). Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2, 176-92.
- 26] Gong, B., Vitolo, O.V., Trinchese, F., Liu, S., Shelanski, M. and Arancio, O. (2004). Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *J. Clin. Invest.* 114, 1624-1634.
- 27] Göttlich, M., Münte, T.F., Heldmann, M., Kasten, M., Hagenah, J. and Krämer, U.M. (2013). Altered resting state brain networks in Parkinson's disease. *PLoS One.* 8, e77336.
- 28] Hagihara, H., Takao, K., Walton, N.M., Matsumoto, M. and Miyakawa, T. (2013). Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural Plast.* doi: 10.1155/2013/318596.
- 29] Halliday, G.M., Leverenz, J.B., Schneider, J.S. and Adler, C.H. (2014). The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 29, 634-50.
- 30] Hamon, M. and Blier, P. (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 45, 54-63.
- 31] Hansen, N. and Manahan-Vaughan, D. (2014). Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity. *Cereb. Cortex.* 24, 845-58.
- 32] Hou, J.G. and Lai, E.C. (2007). NON-MOTOR SYMPTOMS OF PARKINSON'S DISEASE. *Int J Gerontol.* 1, 53-64.

- 33] Inda, M.C., Muravieva, E.V. and Alberini, C.M. (2011). Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci.* 31, 1635-43.
- 34] Isiegas, C., Park, A., Kandel, E.R., Abel, T. and Lattal, K.M. (2006). Transgenic inhibition of neuronal protein kinase A activity facilitates fear extinction. *J Neurosci.* 26, 12700-7.
- 35] Jakowec, M.W. and Petzinger, G.M. (2004). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro pyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates. *Comp Med.* 54, 497-513.
- 36] Kehagia, A.A., Barker, R.A. and Robbins, T.W. (2010). Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 9, 1200-13.
- 37] Kirouac, G.J., Li, S. and Mabrouk, G. (2004). GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol.* 469, 170-84.
- 38] Korczyn, A.D. (2016). Parkinson's and Alzheimer's diseases: Focus on mild cognitive impairment. *Parkinsonism Relat Disord.* 1, S159-61.
- 39] Kovács K.J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol.* 20, 665-72.
- 40] Lee, J.L., Milton, A.L. and Everitt, B.J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci.* 26, 10051-6.
- 41] Leentjens, A.F., Dujardin, K., Marsh, L., Martinez-Martin, P., Richard, I.H., Starkstein, S.E., Weintraub, D., Sampaio, C., Poewe, W., Rascol, O., Stebbins, G.T. and Goetz, C.G. (2008). Apathy and anhedonia rating scales in Parkinson's disease: critique and recommendations. *23*, 2004-14.
- 42] Li, L.X., Cheng, Y.F., Lin, H.B., Wang, C., Xu, J.P. and Zhang, H.T. (2011). Prevention of

- cerebral ischemia-induced memory deficits by inhibition of phosphodiesterase-4 in rats. *Metab. Brain. Dis.* 26, 37-47.
- 43] Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P.W. and Kida, S. (2009). Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci.* 29, 402-13.
- 44] McGaugh, J.L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248-51.
- 45] Monti, B., Berteotti, C. and Contestabile, A. (2006). Subchronic rolipram delivery activates hippocampal CREB and arc, enhances retention and slows down extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 31, 278-86.
- 46] Morgan, M.A. and LeDoux, J.E. (1999). Contribution of ventrolateral prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 72, 244-51.
- 47] Moriguchi, S., Yabuki, Y. and Fukunaga, K. (2012). Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. *J Neurochem.* 120, 541-51.
- 48] Myers, K.M. and Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Nuron* 36, 567-84.
- 49] Myers, K.M. and Davis, M. (2002). Systems-level reconsolidation: reengagement of the hippocampus with memory reactivation. *Neuron* 36, 340-3.
- 50] Myers, K.M. and Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Mol. Psychiatry.* 12, 120-50.
- 51] Nader K. (2015). Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7, a021782.
- 52] Nader, K., Schafe, G.E. and LeDoux, J.E. (2000). Fear memories require protein synthesis in

the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722-6.

- 53] Nambu, A. (2005). A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's disease. *J Neurol.* 252, 1-4.
- 54] Navakkode, S., Sajikumar, S. and Frey, J.U. (2004). The type IV-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and its effect on hippocampal long-term potentiation and synaptic tagging. *J Neurosci.* 24, 7740-4.
- 55] Otmakhova, N.A. and Lisman, J.E. (1998). D1/D5 dopamine receptors inhibit depotentiation at CA1 synapses via cAMP-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 18, 1270-9.
- 56] Pan, Y.W., Storm, D.R. and Xia, Z. (2013). Role of adult neurogenesis in hippocampus-dependent memory, contextual fear extinction and remote contextual memory: new insights from ERK5 MAP kinase. *Neurobiol. Learn. Mem.* 105, 81-92.
- 57] Paumier, K.L., Sukoff Rizzo, S.J., Berger, Z., Chen, Y., Gonzales, C., Kaftan, E., Li, L., Lotarski, S., Monaghan, M., Shen, W., Stolyar, P., Vasilyev, D., Zaleska, M.D., Hirst, W. and Dunlop, J. (2013). Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. *PLoS One.* 8, e70274.
- 58] Pirogovsky-Turk, E., Filoteo, J.V., Litvan, I. and Harrington, D.L. (2015). Structural MRI Correlates of Episodic Memory Processes in Parkinson's Disease Without Mild Cognitive Impairment. *J Parkinsons Dis.* 5, 971-81.
- 59] Pollak, D.I., Fürth, D., Xuan, Y., Johansson, Y., Pozzi, L., Silberberg, G., Carlén, M. and Meletis, K. (2014). A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron* 83, 663-78.
- 60] Polter, A.M. and Kauer, J.A. (2014). Stress and VTA synapses: implications for addiction and depression. *Eur J Neurosci.* 39, 1179-88.
- 61] Redondo, R.L., Kim, J., Arons, A.L., Ramirez, S., Liu, X. and Tonegawa, S. (2015).

- Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature* 513, 426–430.
- 62] Reingold, J.L., Morgan, J.C. and Sethi, K.D. (2007). Rivastigmine for the treatment of dementia associated with Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 3, 775-83.
- 63] Richter, W., Menniti, F.S., Zhang, H.T. and Conti, M. (2013). PDE4 as a target for cognition enhancement. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 17, 1011-27.
- 64] Rodriguez-Oroz, M.C., Jahanshahi, M., Krack, P., Litvan, I., Macias, R., Bezard, E. and Obeso, J.A. (2009). Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol.* 8, 1128-39.
- 65] Roeper, J. (2013). Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci.* 36, 336-42.
- 66] Roesler, R., Reolon, G.K., Maurmann, N., Schwartzmann, G., Schröder, N., Amaral, O.B., Valvassori, S. and Quevedo, J. (2014). A phosphodiesterase 4-controlled switch between memory extinction and strengthening in the hippocampus. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 91.
- 67] Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I., Medina, J.H. and Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325, 1017-20.
- 68] Roy, D.S., Arons, A., Mitchell, T.I., Pignatelli, M., Ryan, T.J. and Tonegawa, S. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature* 531, 508-12.
- 69] Rudy, J.W., Huff, N.C. and Matus-Amat, P. (2004). Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 675-85.
- 70] Samii, A., Nutt, J.G. and Ransom, B.R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet* 363, 1783-93.
- 71] Sariñana, J., Kitamura, T., Künzler, P., Sultzman, L. and Tonegawa, S. (2014). Differential roles of the dopamine 1-class receptors, D1R and D5R, in hippocampal dependent

- memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 8245-50.
- 72] Schrag, A. (2006). Quality of life and depression in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 248, 151-7.
- 73] Sekeres, M.J., Mercaldo, V., Richards, B., Sargin, D., Mahadevan, V., Woodin, M.A., Frankland, P.W. and Josselyn, S.A. (2012). Increasing CRTC1 function in the dentate gyrus during memory formation or reactivation increases memory strength without compromising memory quality. *J Neurosci.* 32, 17857-68.
- 74] Shohamy, D. and Adcock, R.A. (2010). Dopamine and adaptive memory. *Trends. Cogn. Sci.* 14, 464-72.
- 75] Solari, N., Bonito-Oliva, A., Fisone, G. and Brambilla, R. (2013). Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. *Learn Mem.* 20, 592-600.
- 76] Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J. and Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci.* 24, 4787-95.
- 77] Suzuki, A., Mukawa, T., Tsukagoshi, A., Frankland, P.W. and Kida, S. (2008). Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem.* 15, 426-33.
- 78] Tronson, N.C., Schrick, C., Guzman, Y.F., Huh, K.H., Srivastava, D.P., Penzes, P., Guedea, A.L., Gao, C. and Radulovic, J. (2009). Segregated populations of hippocampal principal CA1 neurons mediating conditioning and extinction of contextual fear. *J Neurosci.* 29, 3387–3394.
- 79] van Asselen, M., Almeida, I., Andre, R., Januário, C., Gonçalves, A.F. and Castelo-Branco, M. (2009). The role of the basal ganglia in implicit contextual learning: a study of

- Parkinson's disease. *Neuropsychologia*. 47, 1269-73.
- 80] van Laar, T., De Deyn, P.P., Aarsland, D., Barone, P. and Galvin, J.E. (2011). Effects of cholinesterase inhibitors in Parkinson's disease dementia: a review of clinical data. *CNS Neurosci Ther*. 17, 428-41.
- 81] Vucković, M.G., Wood, R.I., Holschneider, D.P., Abernathy, A., Togasaki, D.M., Smith, A., Petzinger, G.M. and Jakowec, M.W. (2008). Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *Neurobiol Dis*. 32, 319-27.
- 82] Wiltgen, B.J., Brown, R.A., Talton, L.E. and Silva, A.J. (2004). New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 44, 101-8.
- 83] Wiltgen, B.J., Sanders, M.J., Anagnostaras, S.G., Sage, J.R. and Fanselow, M.S. (2006). Context fear learning in the absence of the hippocampus. *J Neurosci*. 26, 5484-91.
- 84] Yabuki, Y., Ohizumi, Y., Yokosuka, A., Mimaki, Y. and Fukunaga, K. (2014). Nobiletin treatment improves motor and cognitive deficits seen in MPTP-induced Parkinson model mice. *Neuroscience*. 259, 126-41.
- 85] Zhu G., Chen, Y., Huang, Y., Li, Q. and Behnisch, T. (2011). MPTP-mediated hippocampal dopamine deprivation modulates synaptic transmission and activity-dependent synaptic plasticity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 254, 332-41.
- 86] 厚生労働省：平成 20 年患者調査の概況，表 11，
http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/eisei_houkoku/11/dl/kekka7.pdf

図表

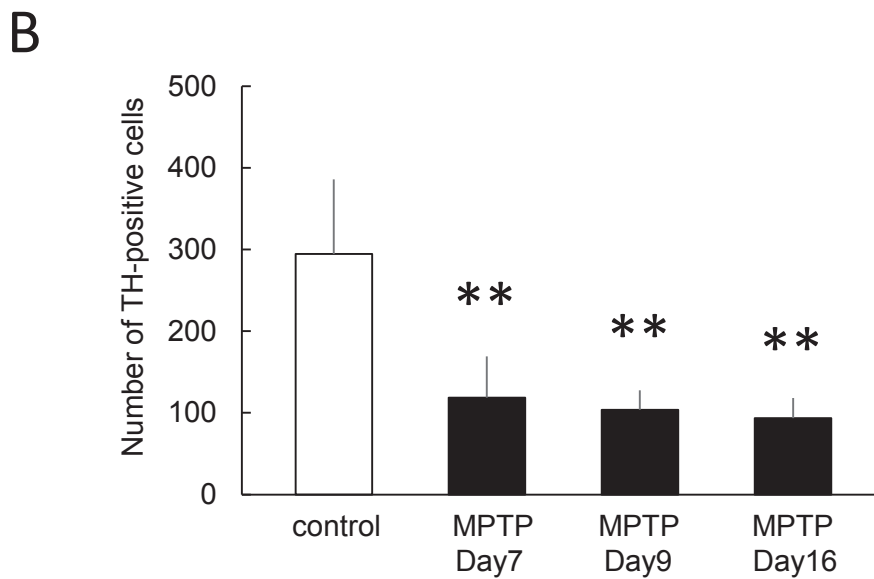
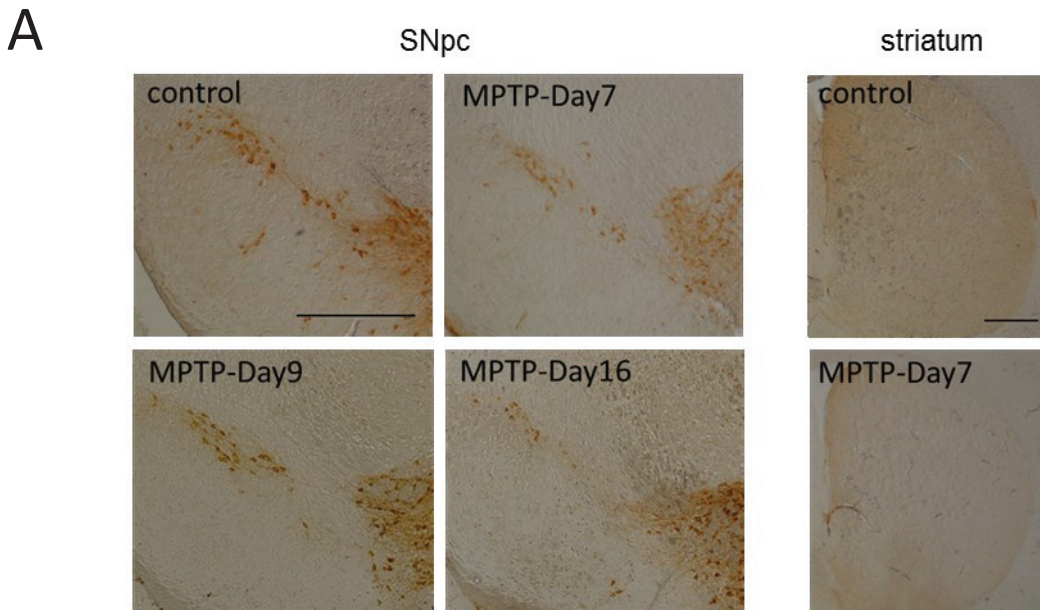


Fig. 1 Effect of MPTP on DAergic neurons in the SNpc and the striatum.

(A) Photomicrograph images of tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining in the SNpc and striatum of control and 7, 9 and 16 days after MPTP-treated mouse. Scale bar: 500 μ m.

(B) Total number of TH-positive cells in the SNpc of control ($n = 7$) and 7 ($n = 9$), 9 ($n = 6$) and 16 ($n = 5$) days after MPTP-treated mice (** $p < 0.01$ vs. control). Results represent mean \pm SD.

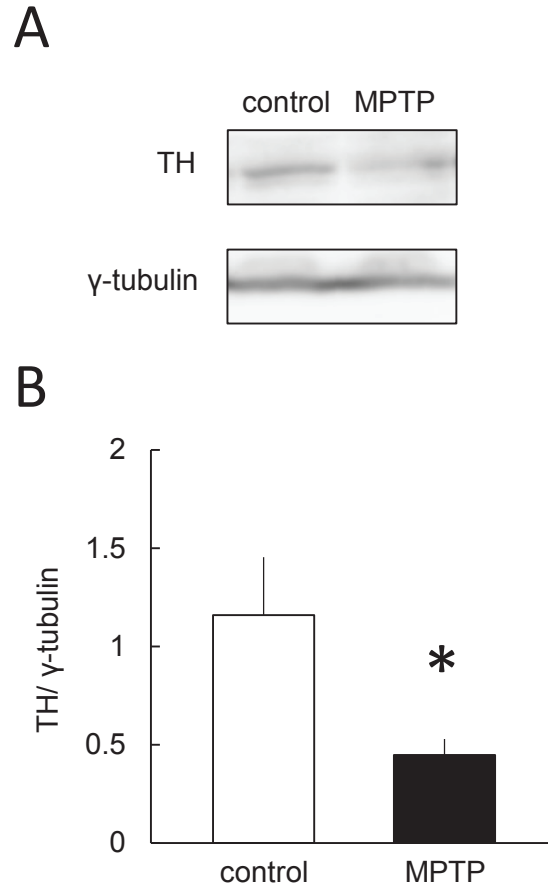


Fig.2 Westernblot analysis for the TH expression levels in CPu of the control and PD mice.

(A) The images show the representative results (upper: TH, lower: γ -tubulin). (B) Bar graph shows the TH expression levels normalized by γ -tubulin (* $p < 0.05$ vs. control, $n = 7$ per group). Results represent mean \pm SD.

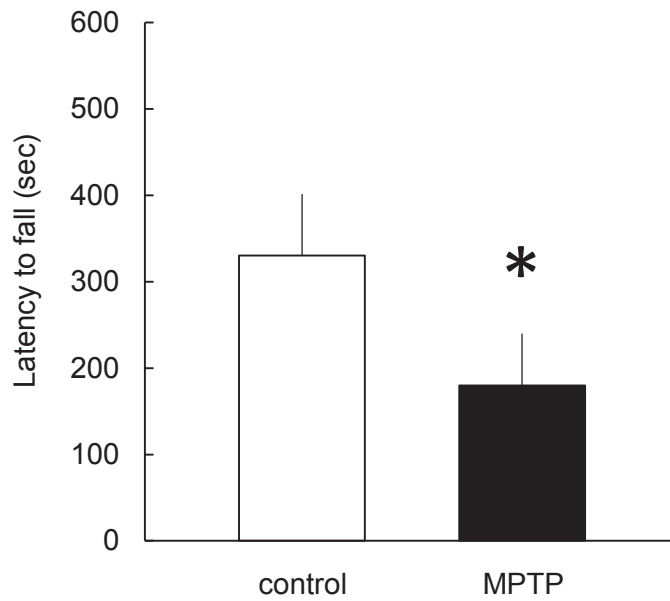


Fig.3 Effect of MPTP on motor coordination in the rotarod test.

The latency of each mouse fell from the rod rotating at 20 rpm was recorded over two trials per a mouse at 20 min intervals and a maximum trial time length of 600 s per trial. Data are presented as mean of latency to fall from the rod over two test trials. The latency time to fall from the rod in PD mice significantly decreased as compared with control mice (* $p < 0.05$ vs. control, $n = 5$ per group). Results represents mean \pm SEM.

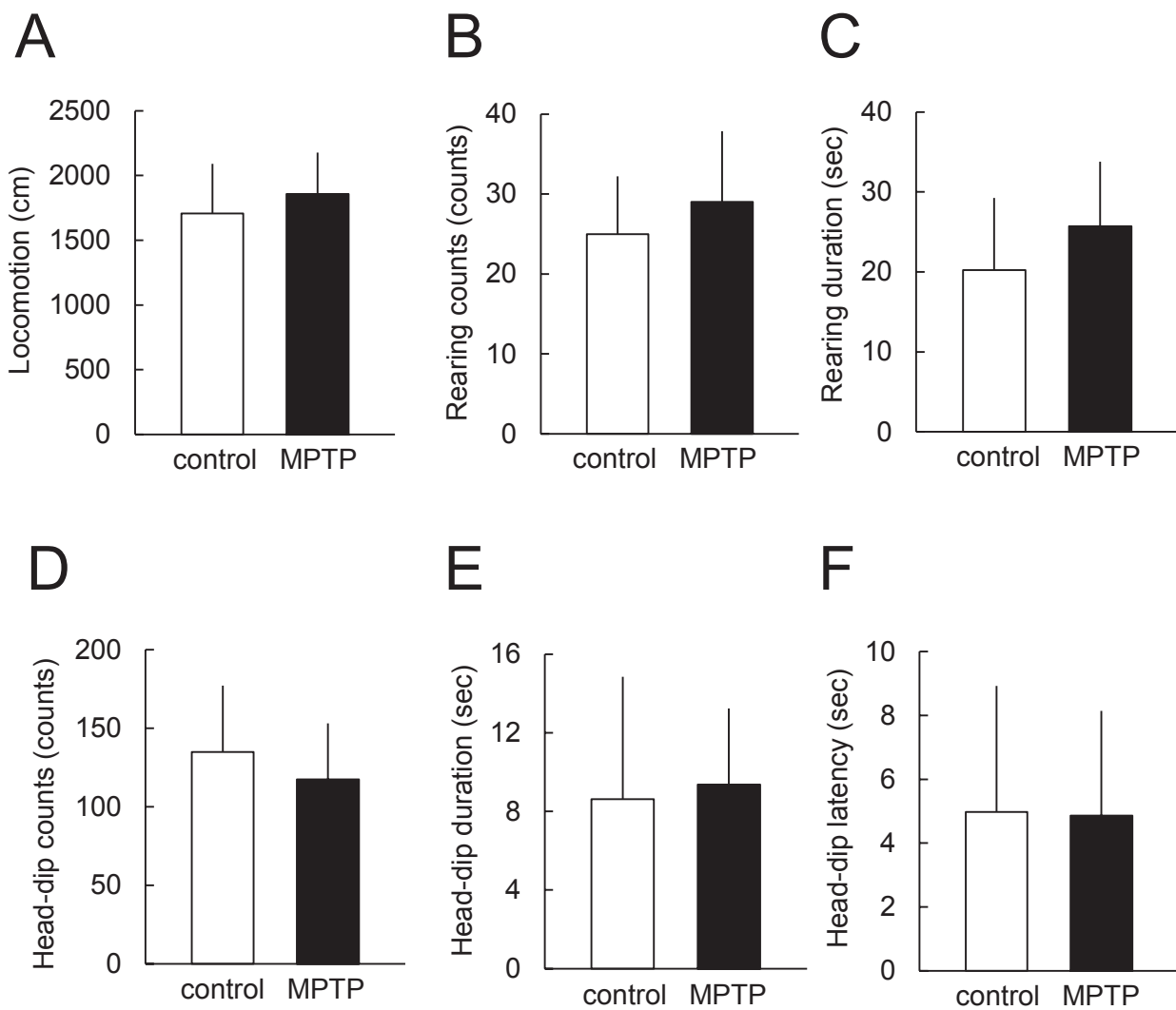


Fig.4 Effect of MPTP on general behavioral activities in the automated hole-board test.

There were no significances on (a) locomotion, (B) rearing counts, (C) rearing duration, (D) head-dip counts, (E) head-dip duration, and (F) head-dip latency between control ($n = 10$) and PD mice ($n = 11$). Results represent mean \pm SD.

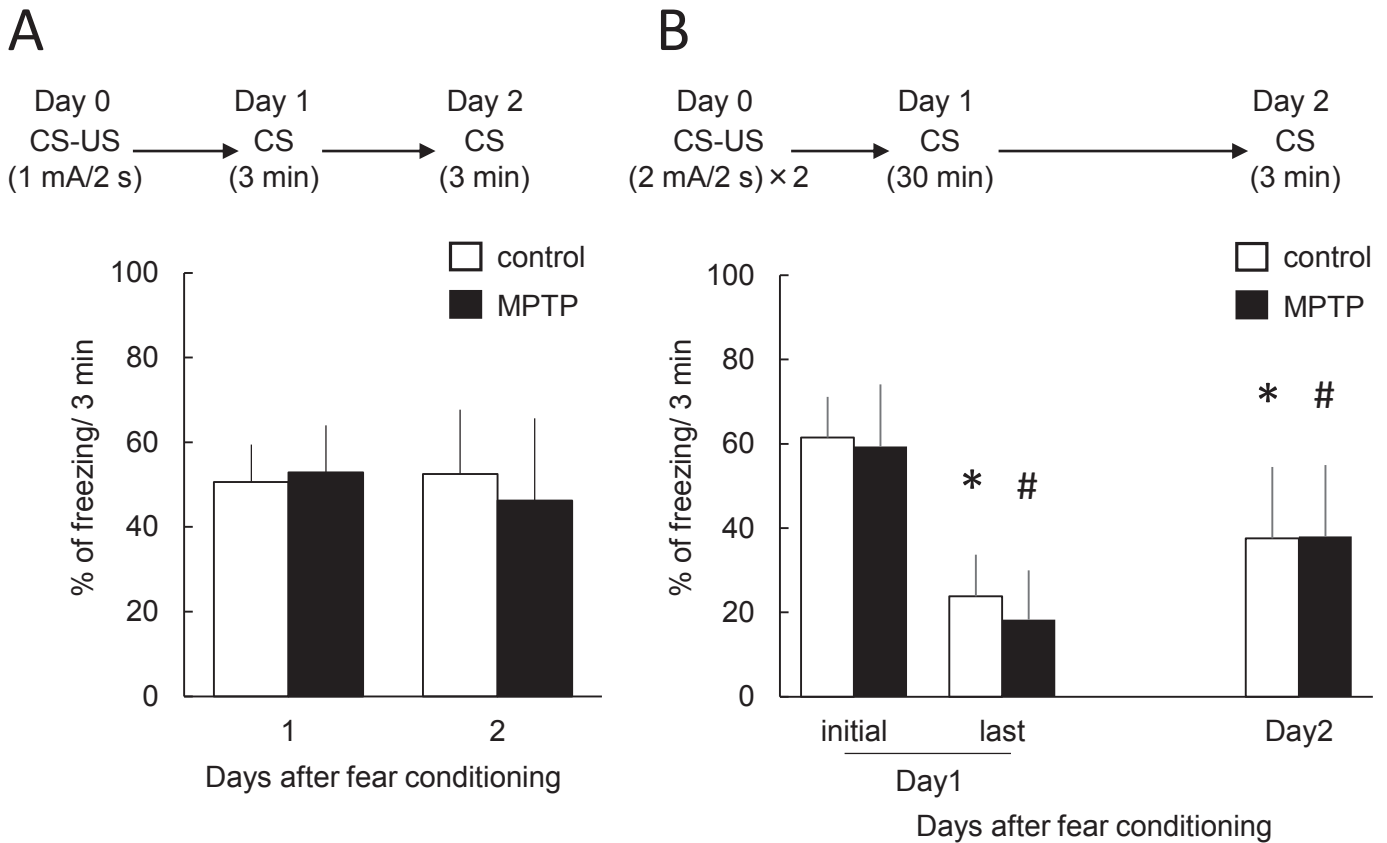


Fig.5 Effect of MPTP on the contextual fear conditioning test under a weak unconditioned stimulus (US).

(A) Reconsolidation test: mice were trained with a single footshock (US: Day 0, stimulation: 1 mA/ 2 s duration, once) and, 24 h later, reexposed to the training context (conditioned stimulus: CS) for 3 min without US (Day 1). Reconsolidation memory was assessed by placing mice once again in the CS for 3 min 24 h after consolidation (Day 2). There were no significant differences between control and PD mice (control: $n = 12$, MPTP: $n = 11$). (B) Extinction test: mice were trained with a single footshock (US: Day 0, stimulation: 1 mA/ 2 s duration, once) and, 24 h later, reexposed to the CS for 30 min (Day 1). Memory extinction was determined by assessment of freezing by placing mice once again in the CS 24 h after consolidation (Day 2). All tests were assessed as percentage of time spent freezing during the initial 3 min of the entire duration of CS. Freezing levels in both control and PD mice significantly decreased after re-exposure. But there were no differences between the groups ($*p < 0.05$ vs. control-Day1, $\#p < 0.05$ vs. MPTP-Day1, $n = 10$ per group). Results represent mean \pm SD.

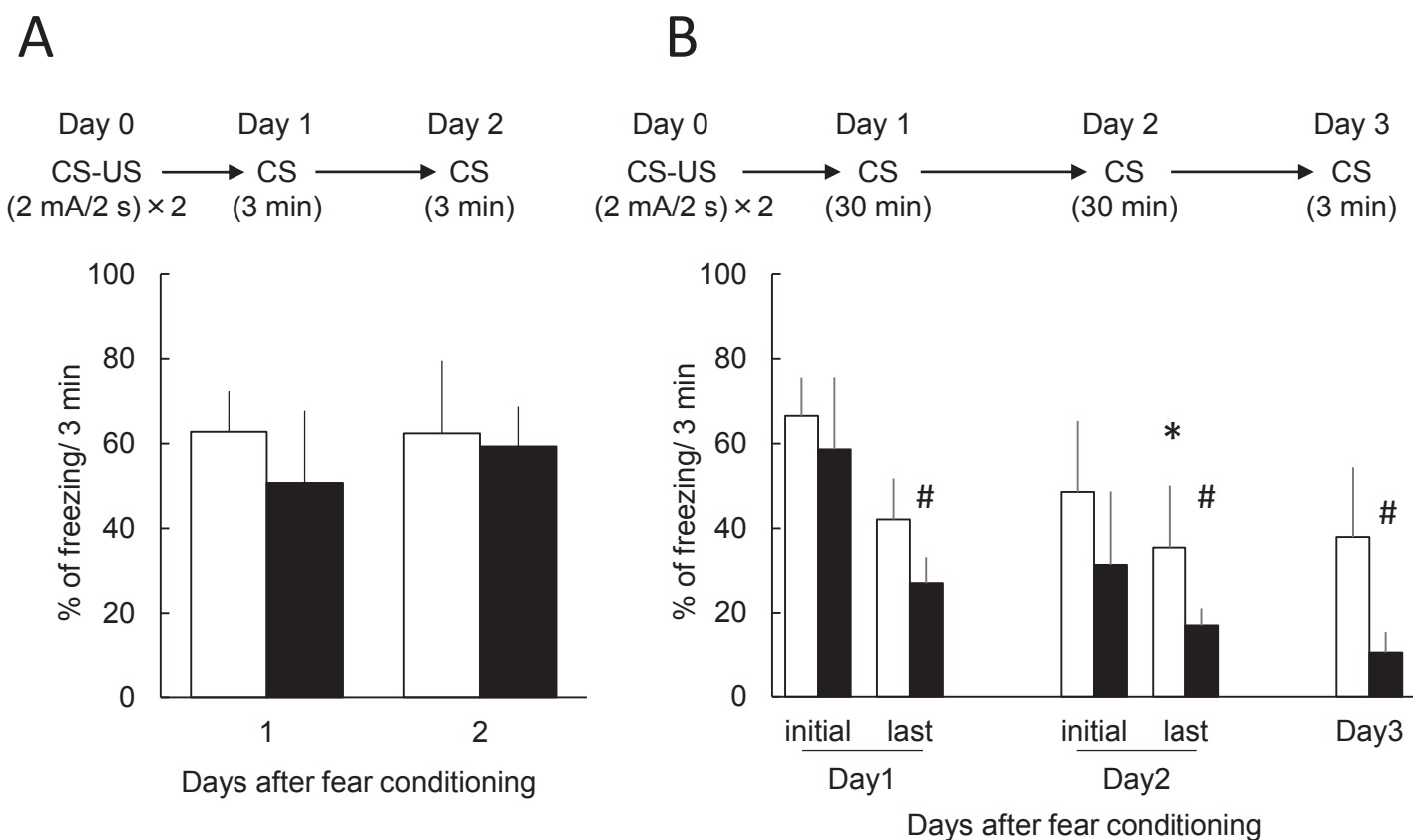


Fig.6 Effect of MPTP on the contextual fear conditioning test under an intense US.

(A) Reconsolidation test: Mice were trained with an intense US (Day 0) and, 24 h later, reexposed to the training context (CS) for 3 min (for consolidation) without US (Day 1). Reconsolidation memory was assessed by placing mice once again in the CS for 3 min 24 h after consolidation (Day 2) ($n = 7$ per group). There were no differences between control and PD mice. (B) Extinction test: Mice were trained with intense US (Day 0) and reexposed to the CS for 30 min every day over 3 days after training with the intense US (Day 1 - 3). All tests were assessed as percentage of time spent freezing during the initial 3 min of the entire duration of CS. Freezing (extinction memory) 3 days after training with the intense US significantly decreased in the PD mice but not the control mice ($*p < 0.05$ vs. control-Day1, $\#p < 0.05$ vs. MPTP-Day1, $n = 4$ per group). Results represent mean \pm SD.

Day 0 Day 1 Day 2 Day 3 Day 4 Day 5 Day 6 Day 7 Day 8 Day 9
 CS-US → CS → CS → CS → CS → CS → CS → CS → CS → CS
 (2 mA/2 s) × 2 (3 min) (3 min) (3 min) (3 min) (3 min) (3 min) (3 min) (3 min) (3 min)

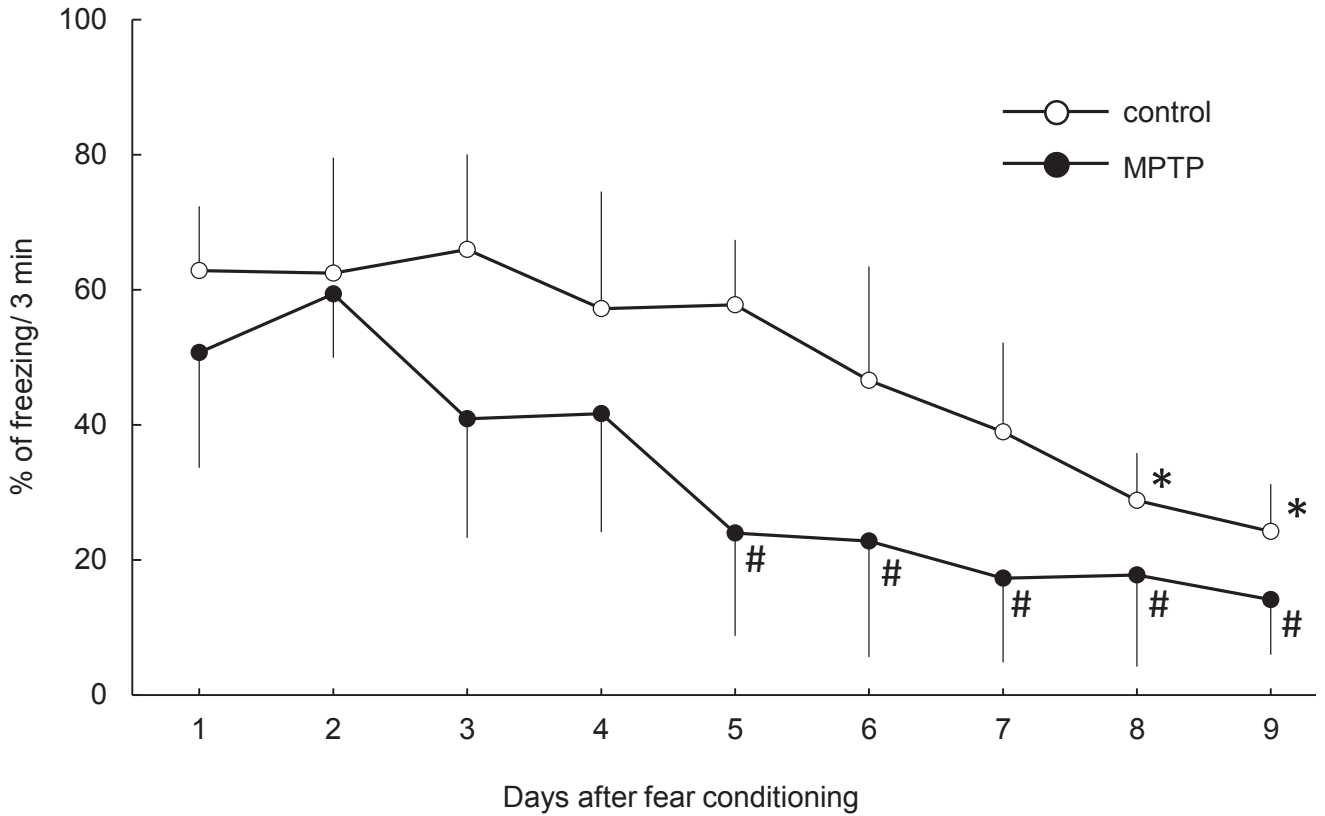


Fig.7 Effect of MPTP on the memory retention under an intense US.

Mice were trained with an intense US (Day 0) and then reexposed to the CS for 3 min every day over 9 days after training with the intense US (Day 1 - 9). A significant decrease in freezing was observed at 8 and 9 days after training with the intense US (Day 8 - 9) in control mice. PD mice showed a significant decrease in freezing between 5 - 9 days after training with the intense US (Day 5 - 9) (* $p < 0.05$ vs. control-Day 1, # $p < 0.05$ vs. MPTP-Day 1, $n = 7$ per group). Result represents mean \pm SD.

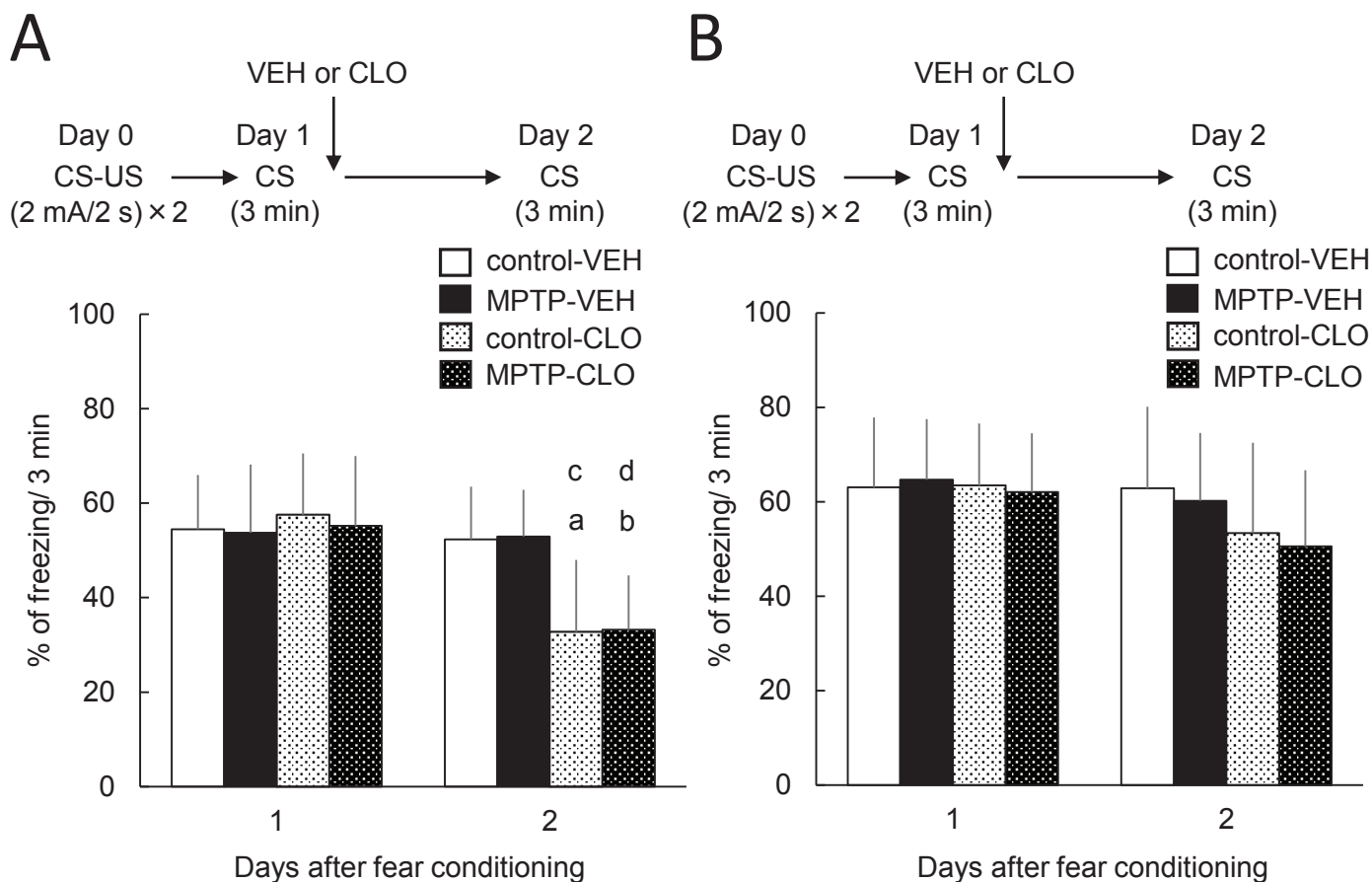


Fig. 8 Administration of clonidine (CLO) immediately after reactivation of fear memory.

(A) Mice were trained with a weak US, and 24 h later, mice were re-exposed to CS for 3 min without US (Day 1). Mice were then removed from CS and clonidine hydrochloride (0.3mg/kg) or its vehicle was administered immediately. Mice were again placed in CS for 3 min 24 h after the first retrieval (Day 2). Clonidine significantly decreased in freezing levels at Day 2 in both control ($n = 12$: control-CLO) and PD mice ($n = 10$: MPTP-CLO) compared to the freezing levels during the first memory retrieval (Day 1) but vehicle did not ($n = 12$: control-VEH, $n = 10$:MPTP-VEH) (^a $p < 0.05$ vs. control-CLO-Day 1; ^b $p < 0.05$ vs. MPTP-CLO-Day 1; ^c $p < 0.05$ vs. control-VEH-Day 2; ^d $p < 0.05$ vs. MPTP-VEH-Day 2).

(B) Mice were trained with an intense US, and 24 h later, mice were re-exposed to CS for 3 min without US (Day 1). Mice were then removed from CS and clonidine hydrochloride (0.3 mg/kg) or its vehicle was administered intraperitoneally immediately. Mice were again placed in the CS for 3 min 24 h after the first retrieval (Day 2). Clonidine did not affect freezing levels at Day 2 in both control and PD mice compared to the levels during the first memory retrieval (Day 1) ($n = 11$: control-CLO, $n = 11$: MPTP-CLO, $n = 11$: control-VEH, $n = 11$: MPTP-VEH).

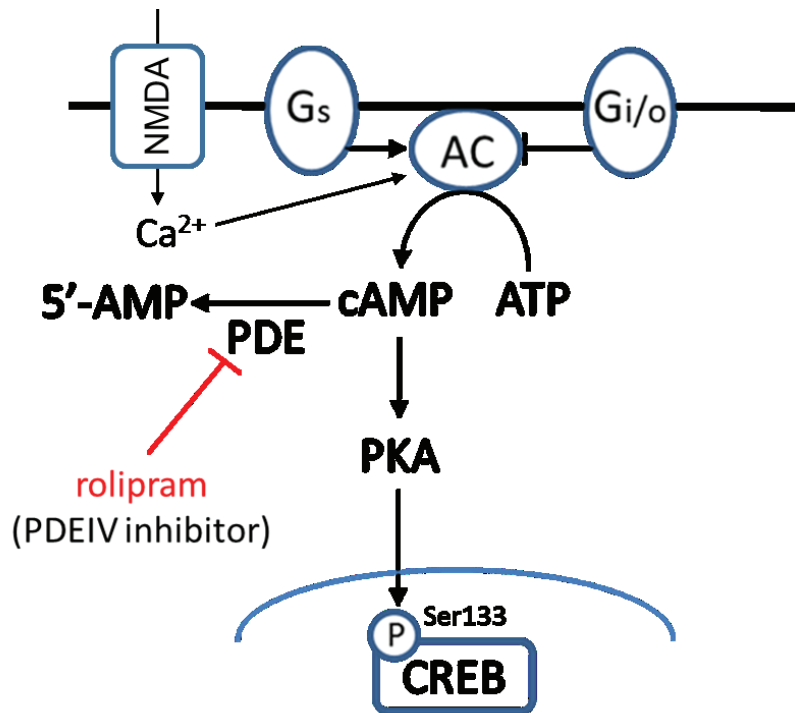


Fig. 9 Schematic illustration of the CREB phosphorylation signaling pathway.

Activation of the G protein-coupled receptors or receptors induced Ca²⁺ influx such as the NMDA receptor leads to the production a second messenger such as cAMP or Ca²⁺, which in term activates a protein kinase A (PKA). PKA translocated to the nucleus and phosphorylates the ser133 of CREB. PDEs degrade the cAMP to the 5'-AMP and rolipram, a PDE IV inhibitor, inhibits the degradation of cAMP and enhances the cAMP-CREB pathway.

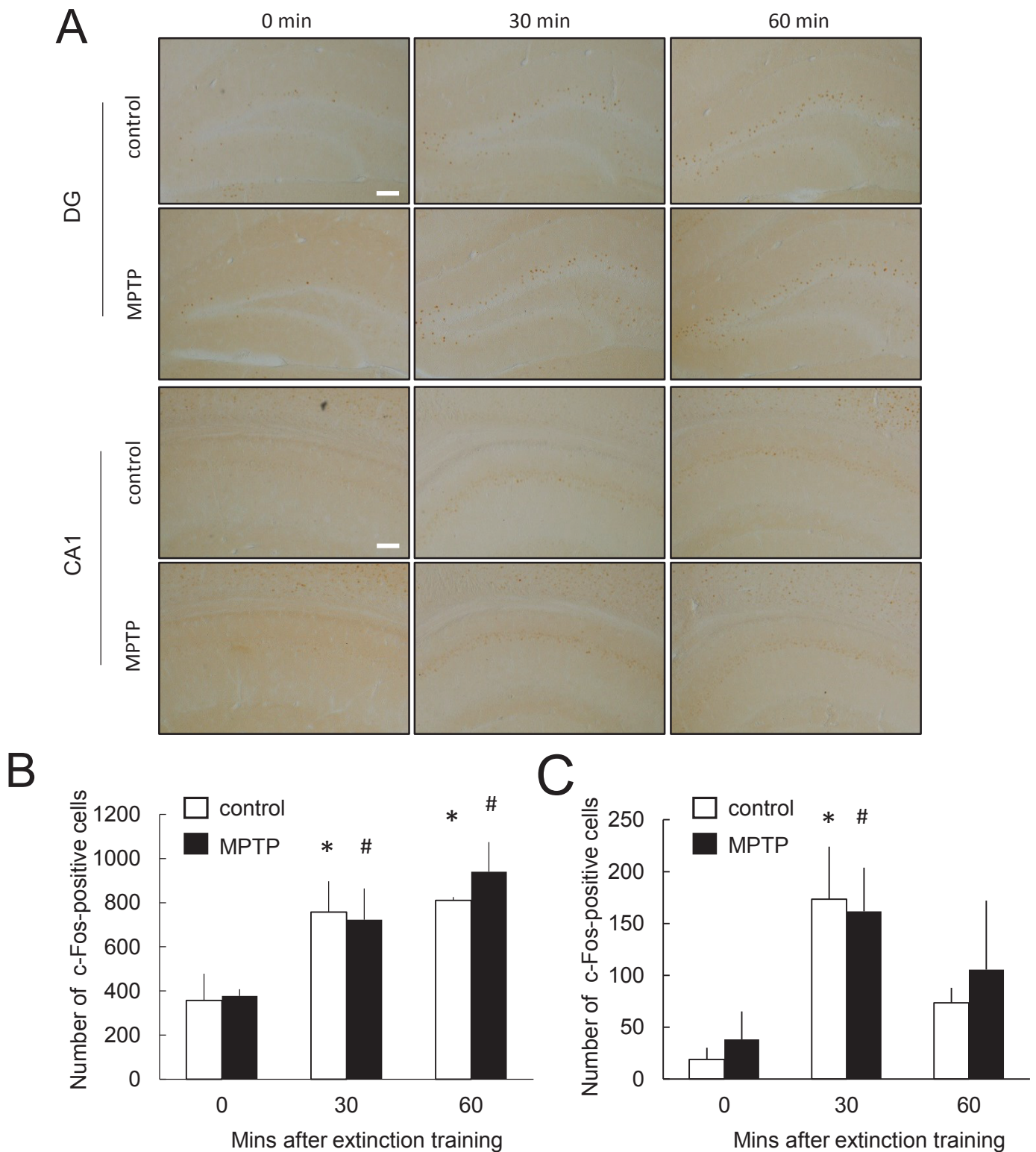


Fig. 10 Number of c-Fos positive cells in hippocampus after contextual fear extinction.

(A) Photomicrograph images of c-Fos immunostaining in the hippocampal DG and CA1 immediately, 30 and 60 mins after fear extinction. (B, C) Number of c-Fos positive-cells in DG (B) and CA1 (C). $n = 3$ per group. Data are mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control-0 min, # $p < 0.05$ vs. MPTP-0 min by student's t test. Scale bar = 100 μ m.

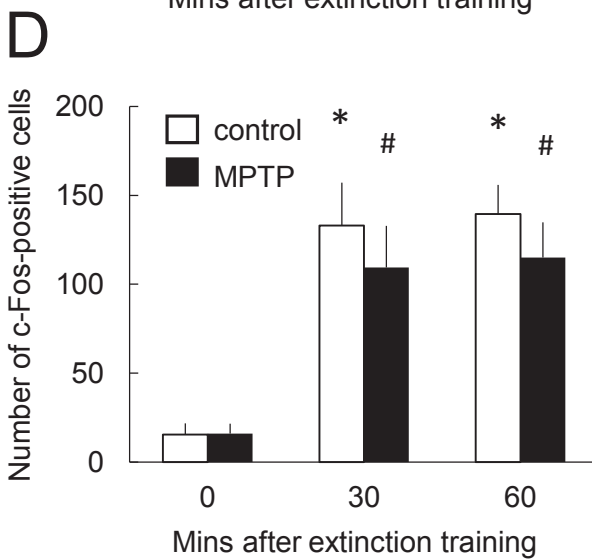
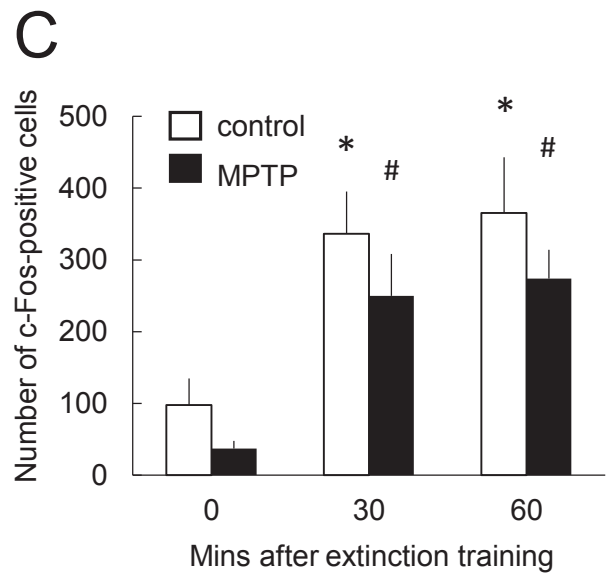
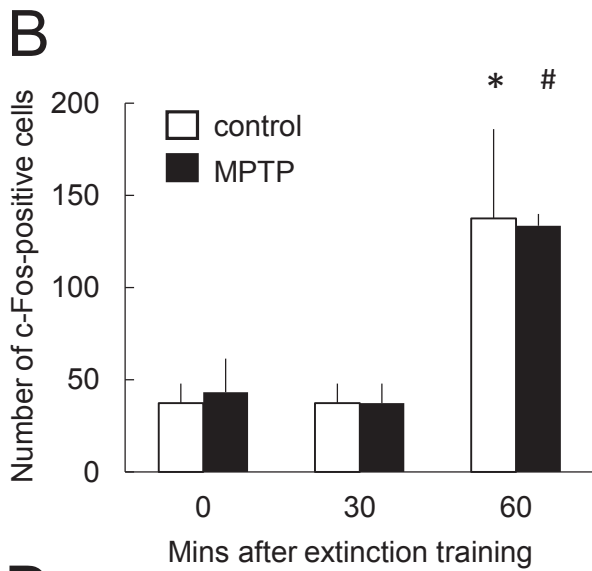
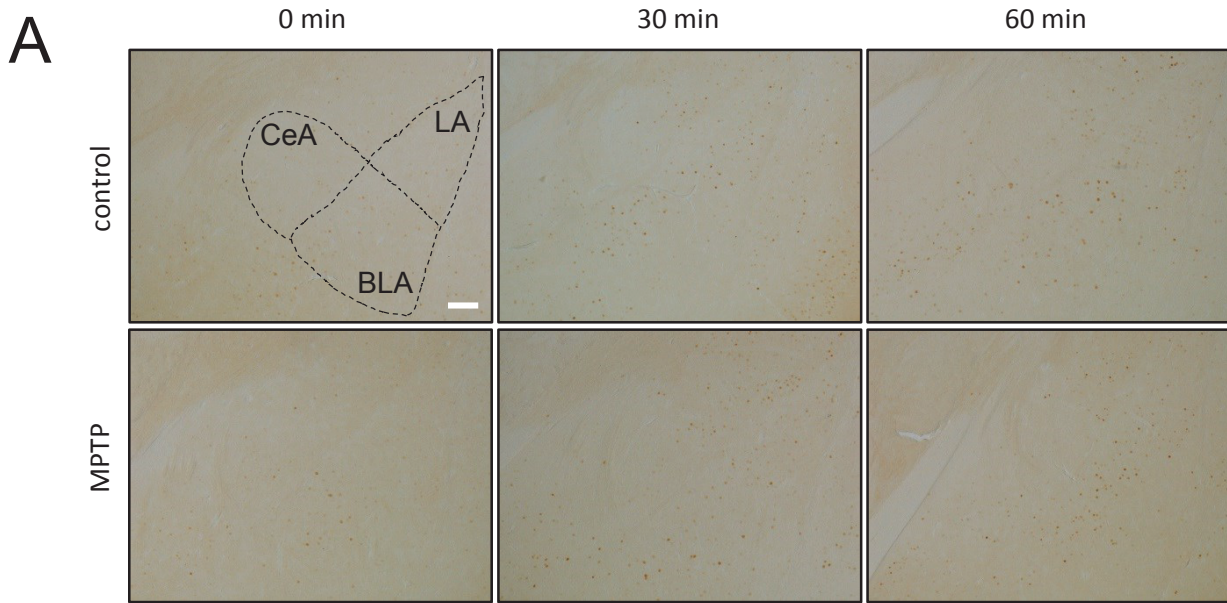


Fig. 11 Number of c-Fos positive cells in amygdala after contextual fear extinction.

(A) Photomicrograph images of c-Fos immunostaining in the amygdala immediately, 30 and 60 mins after extinction. (B, C, D) Number of c-Fos positive-cells in LA (B), BLA (C) and CeA (D). $n = 3$ per group. Data are mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control-0 min, # $p < 0.05$ vs. MPTP-0 min by student's t test. Scale bar = 100 μ m.

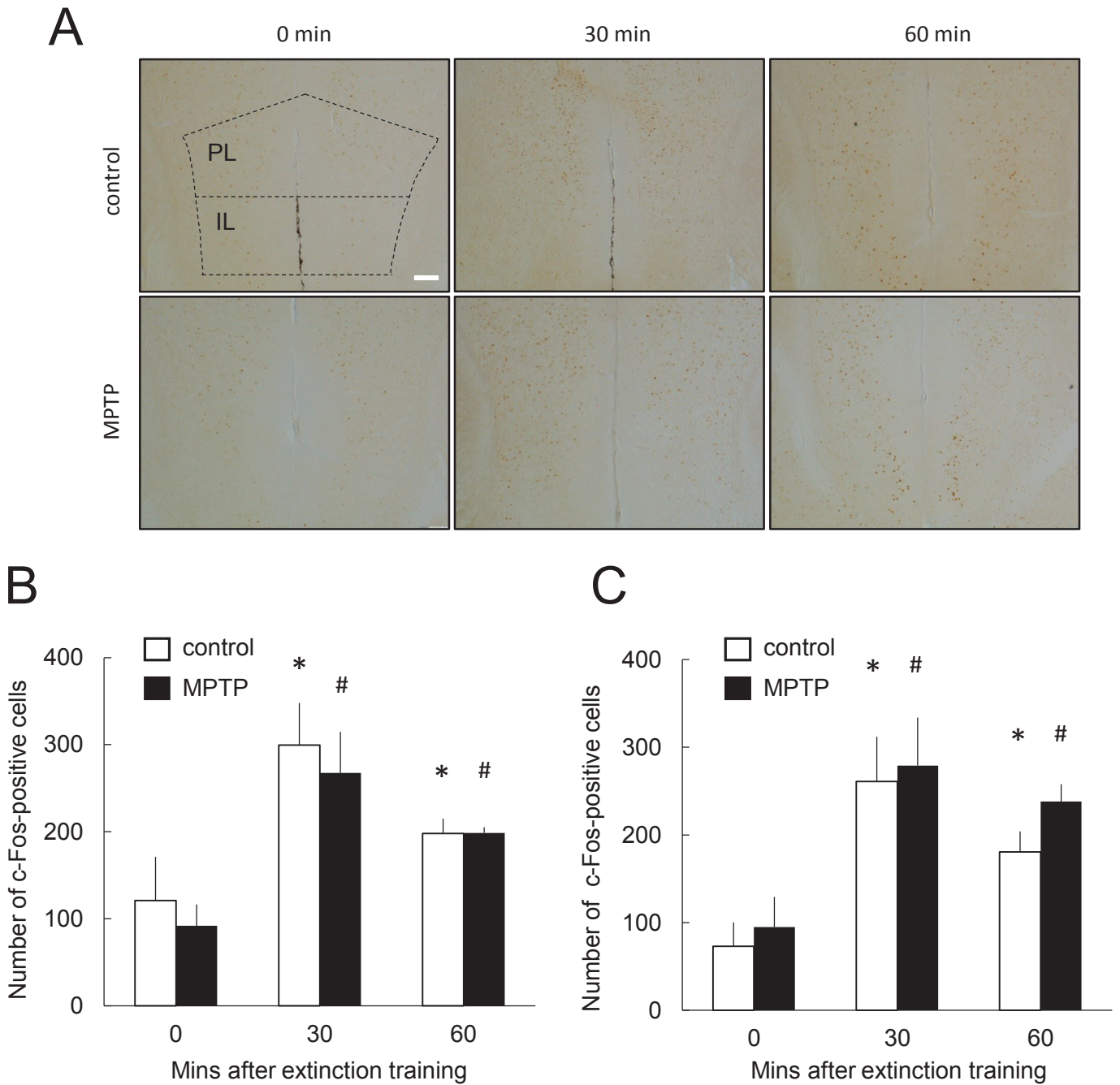


Fig. 12 Number of c-Fos positive cells in mPFC after contextual fear extinction.

(A) Photomicrograph images of c-Fos immunostaining in the mPFC immediately, 30 and 60 mins after extinction. (B, C) Number of c-Fos positive-cells in PL (B) and IL (C). $n = 3$ per group. Data are mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control-0 min, # $p < 0.05$ vs. MPTP-0 min by student's t test. Scale bar = 100 μ m.

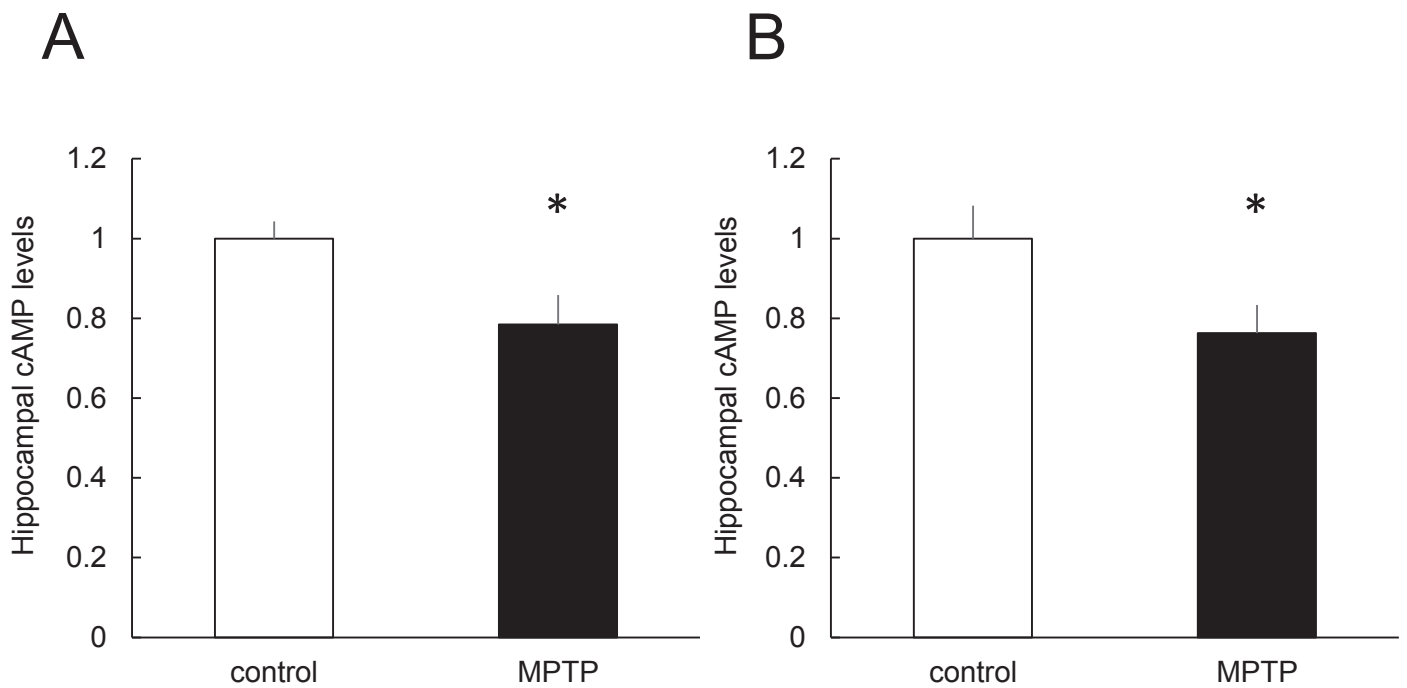


Fig. 13 Analysis of cAMP levels in hippocampus (A) before or (B) immediately after extinction training.

The hippocampal cAMP levels were detected without fear extinction (A) and immediately after extinction (B). The cAMP levels were represented as relative ratio of control. Data are mean \pm SEM; $n = 7$ for each group. * $p < 0.05$ by student's t test.

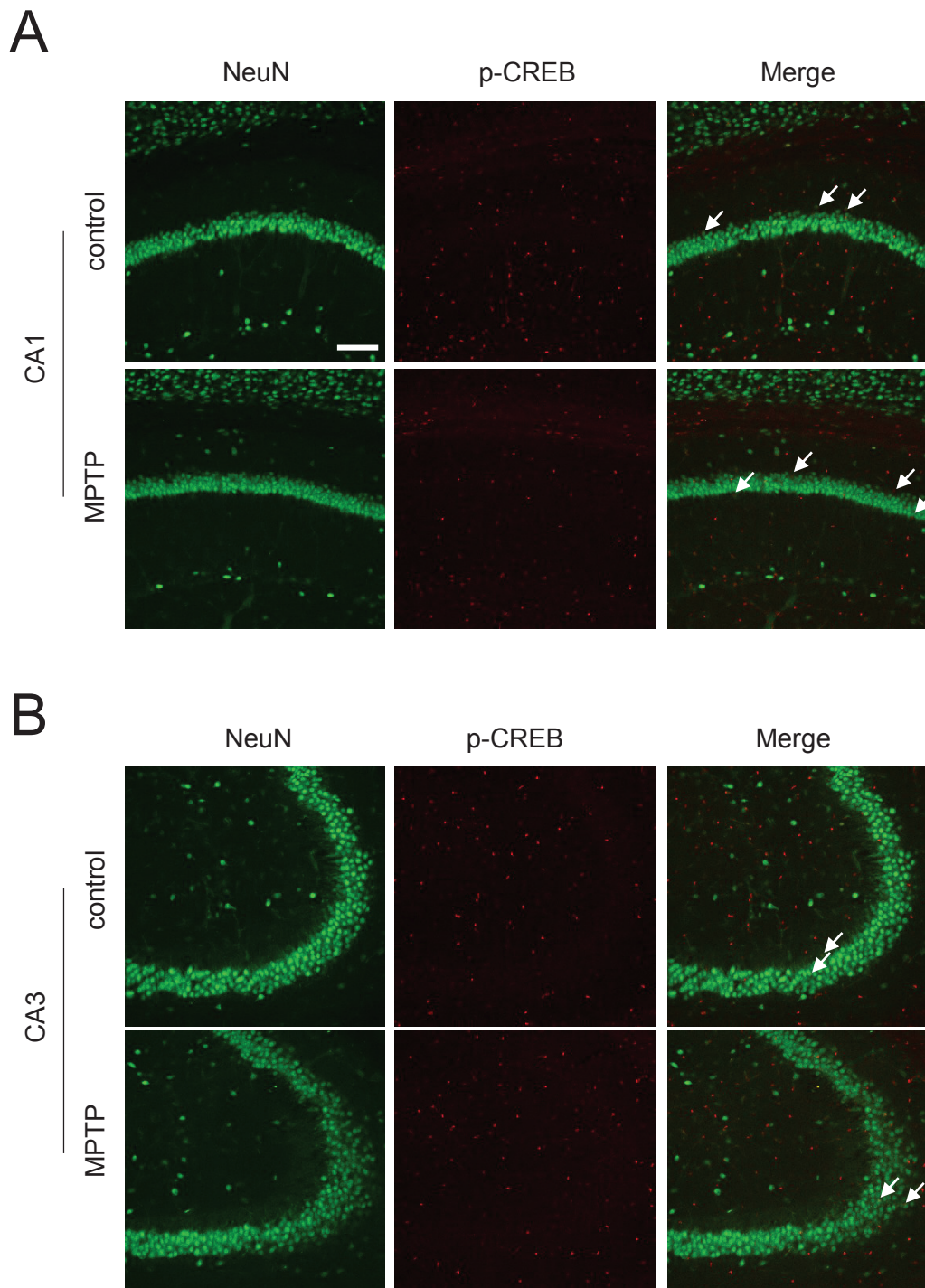


Fig. 14 Analysis of p-CREB expression in hippocampal CA1 and CA3 after fear extinction.

Immunohistochemistry for NeuN (green) and p-CREB (red) in the hippocampal CA1 (A) and CA3 (B) 30 mins after extinction. Arrows indicate p-CREB positive-cells. Scale bar = 100 μ m.

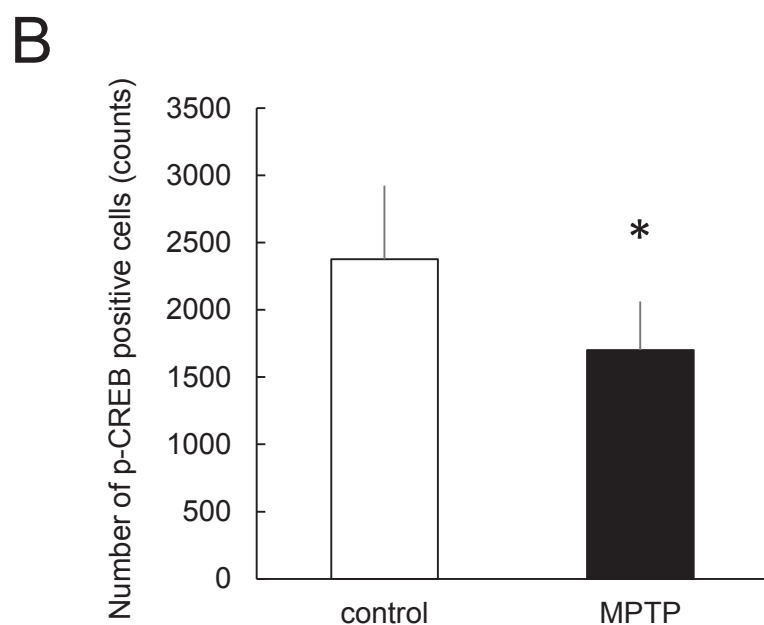
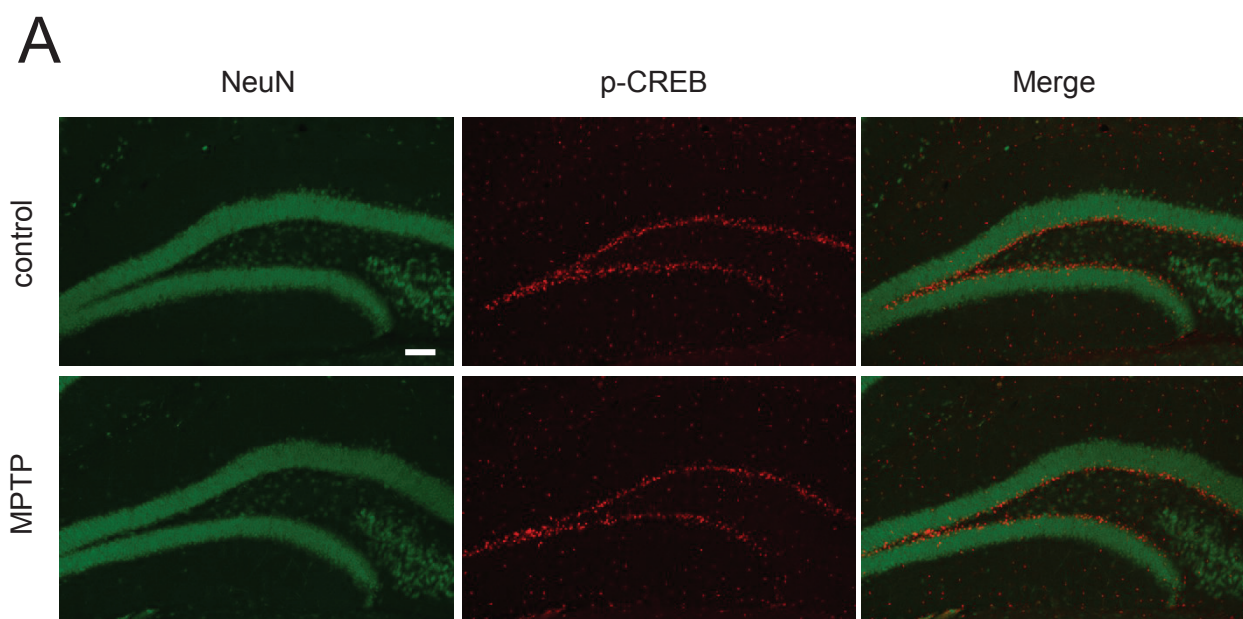


Fig. 15 Analysis of p-CREB expression in hippocampal DG after extinction training.

(A) Immunohistochemistry for NeuN (green) and p-CREB (red) in hippocampal DG 30 mins after fear extinction. Scale bar = 100 μ m. (B) The counts of p-CREB positive cells in hippocampal DG. Data are mean \pm SD; $n = 6$ for each group. * $p < 0.05$ by student's t test.

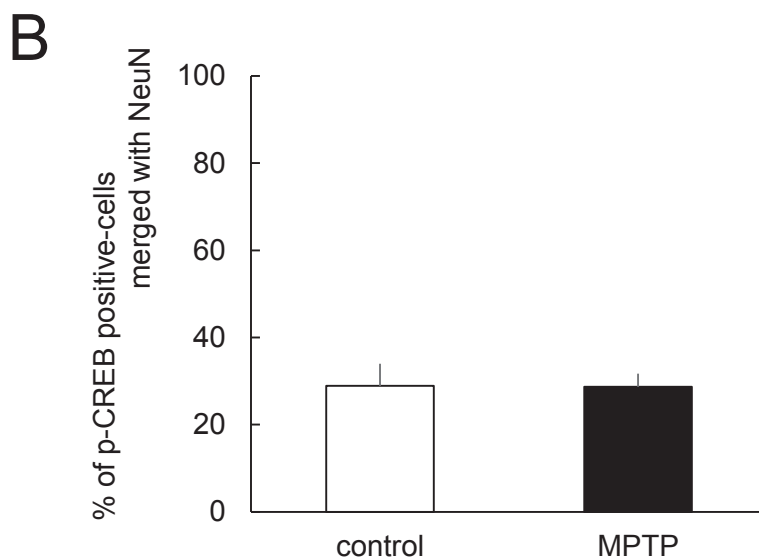
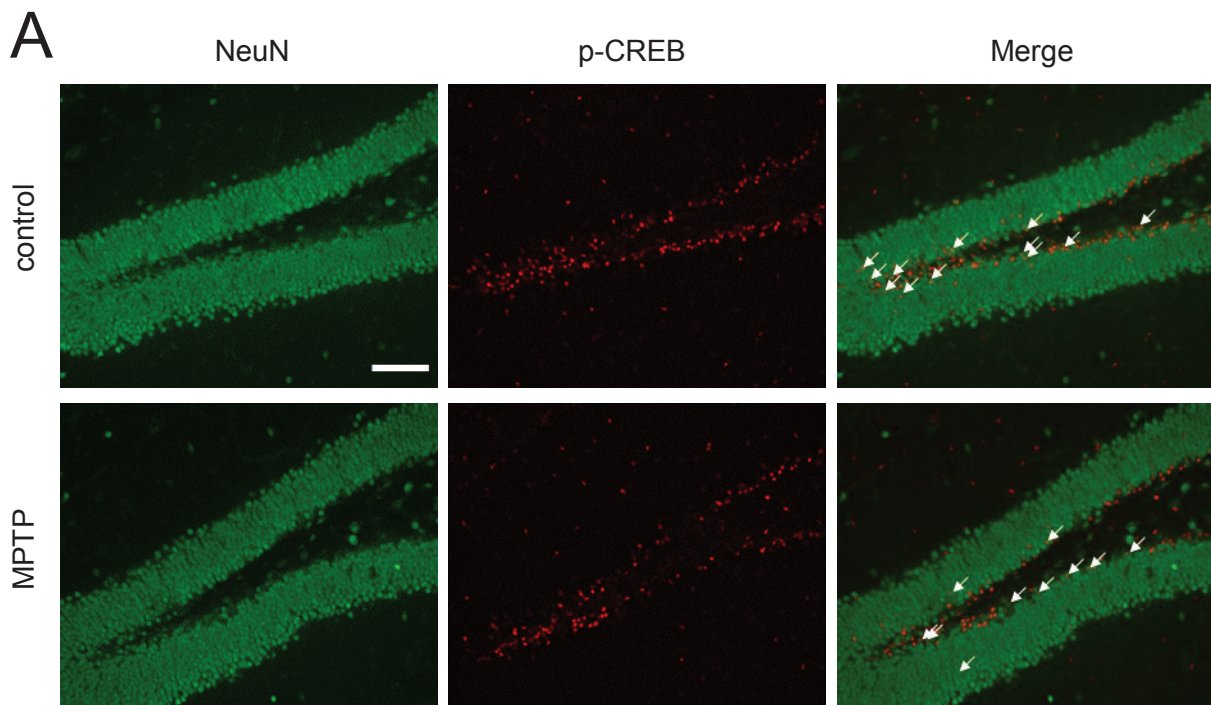


Fig. 16 Analysis of the percentage of p-CREB positive-cells positive for NeuN in hippocampal DG after extinction training.

(A) Immunohistochemistry for NeuN (green) and p-CREB (red) in hippocampal DG 30 mins after fear extinction. (B) Rate of p-CREB positive-cells positive for NeuN. Data are represented as (p-CREB positive-cells positive for NeuN/total of p-CREB positive-cells) × 100. There were no significance between control and MPTP mice (control: 28.01 ± 4.41%, MPTP: 26.88 ± 1.69%). Data are mean ± SD; n = 5 for each group. Scale bar = 100 μm. Arrows indicate p-CREB positive-cells merged with NeuN.

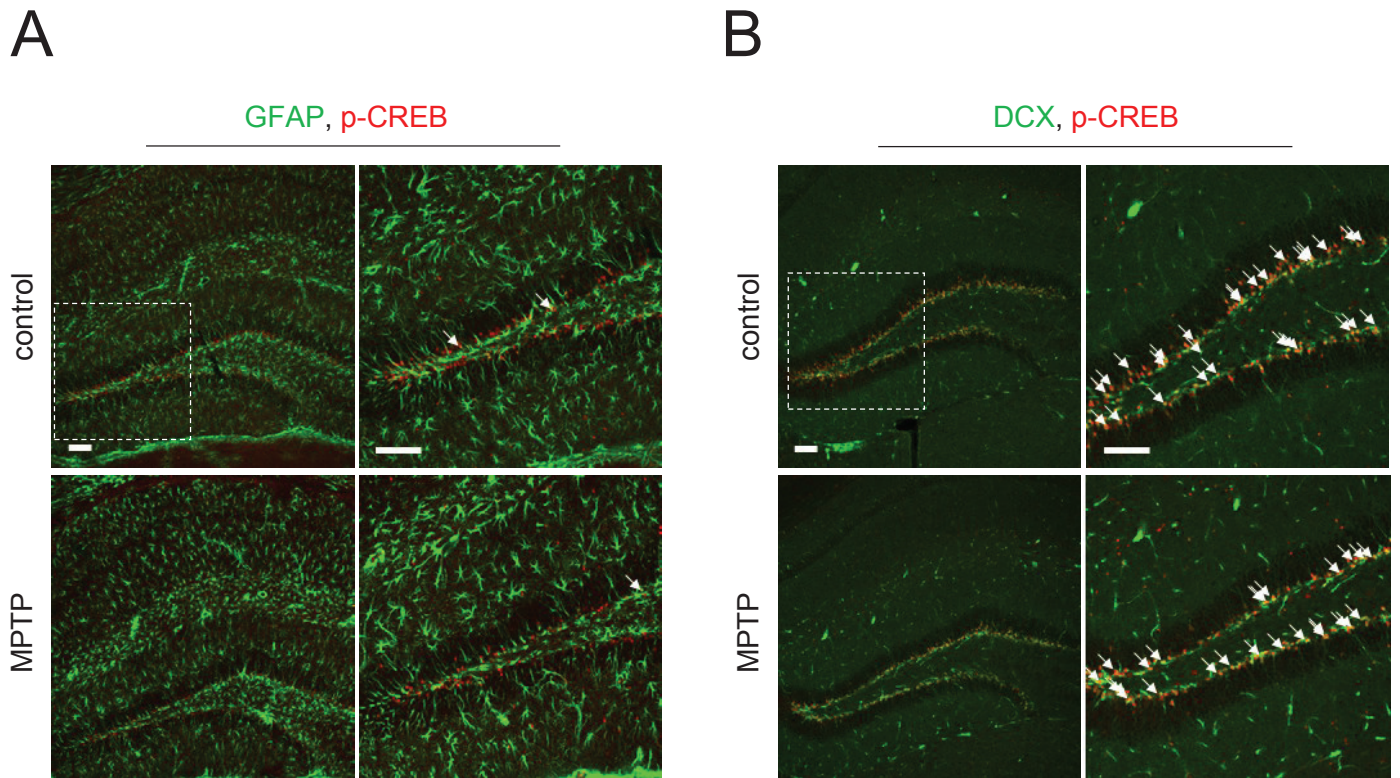


Fig. 17 Analysis of p-CREB expression in the astrocytes or immature cells.

Immunohistochemistry for GFAP (green) marker of astrocyte and p-CREB (red) (A), or DCX (green) marker of immature cell and p-CREB (red) (B) in the hippocampal DG 30 mins after extinction. Scale bar = 100 μ m. Arrows indicate p-CREB positive cells merged with GFAP (A) or DCX (B).

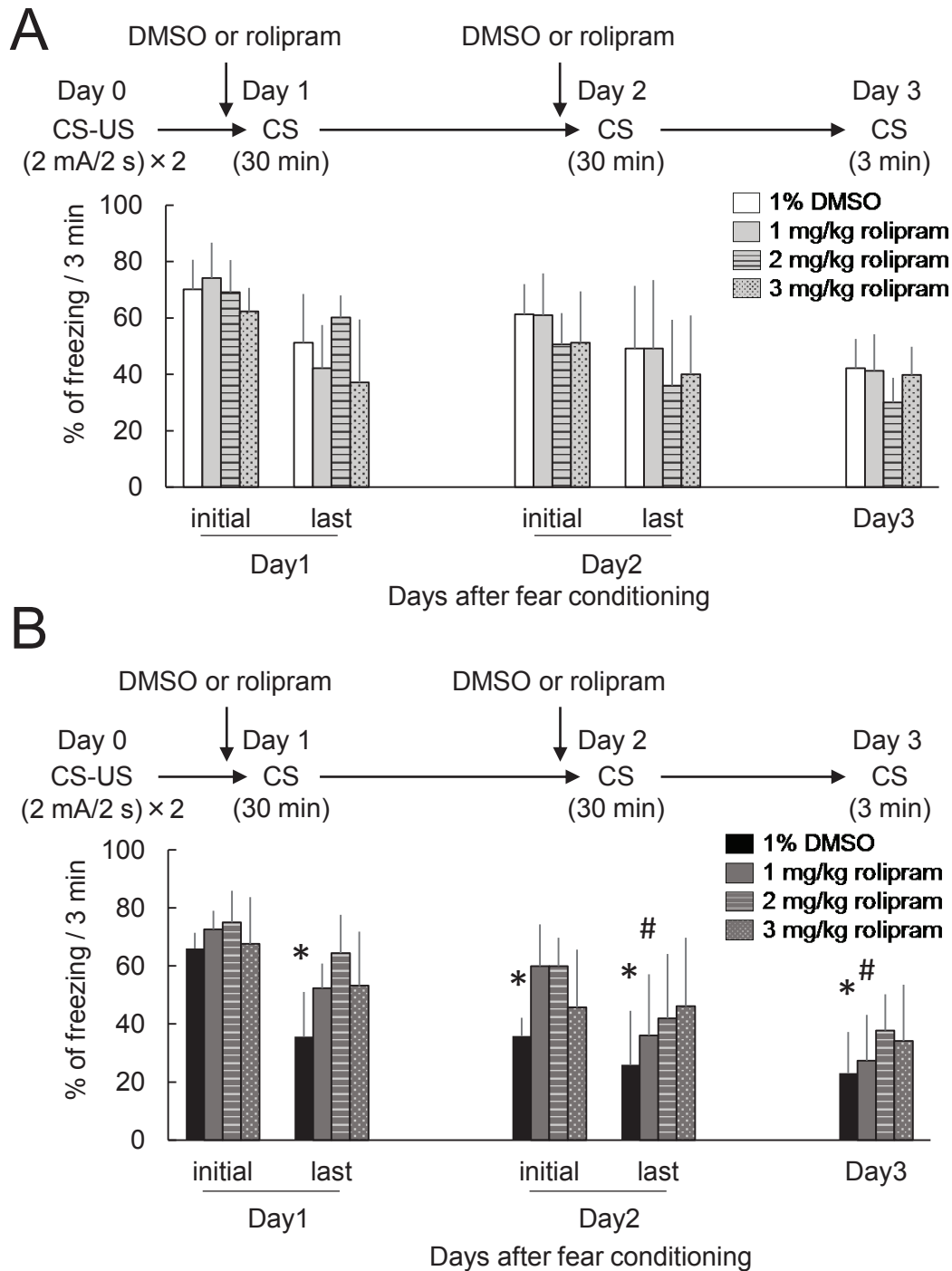


Fig. 18 Effect of rolipram on the contextual fear extinction in mice.

Rolipram was administrated 2 h before extinction training at dose of 1, 2 or 3 mg/kg.

(A) Effect of rolipram on fear extinction in the control mice. Data are mean \pm SD; $n = 6 - 7$.

(B) Effect of rolipram on fear extinction in the PD mice. Data are mean \pm SD; $n = 5 - 7$. * $p < 0.05$ vs. MPTP-DMSO-Day1, # $p < 0.05$ vs. MPTP-1 mg/kg rolipram-Day1 by two-way

ANOVA with repeated measures followed by Tukey's post hoc tests.

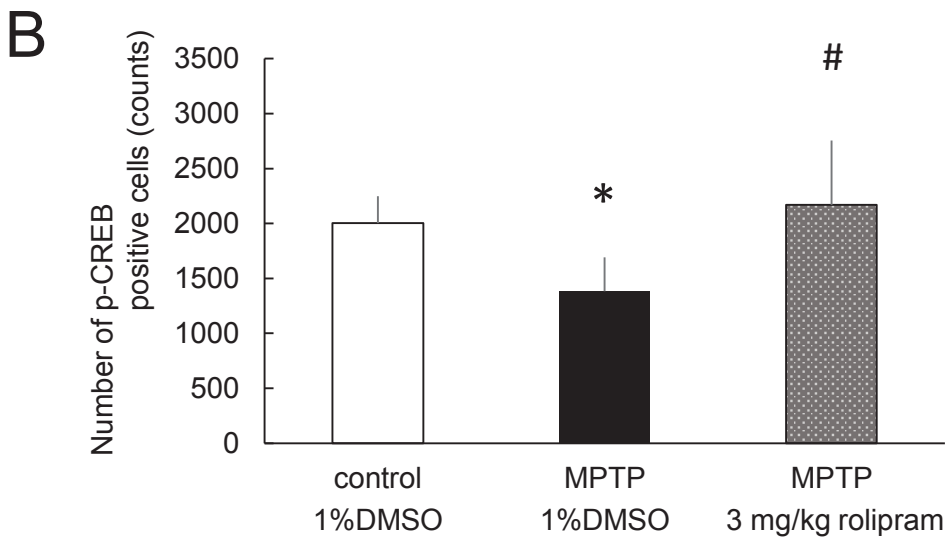
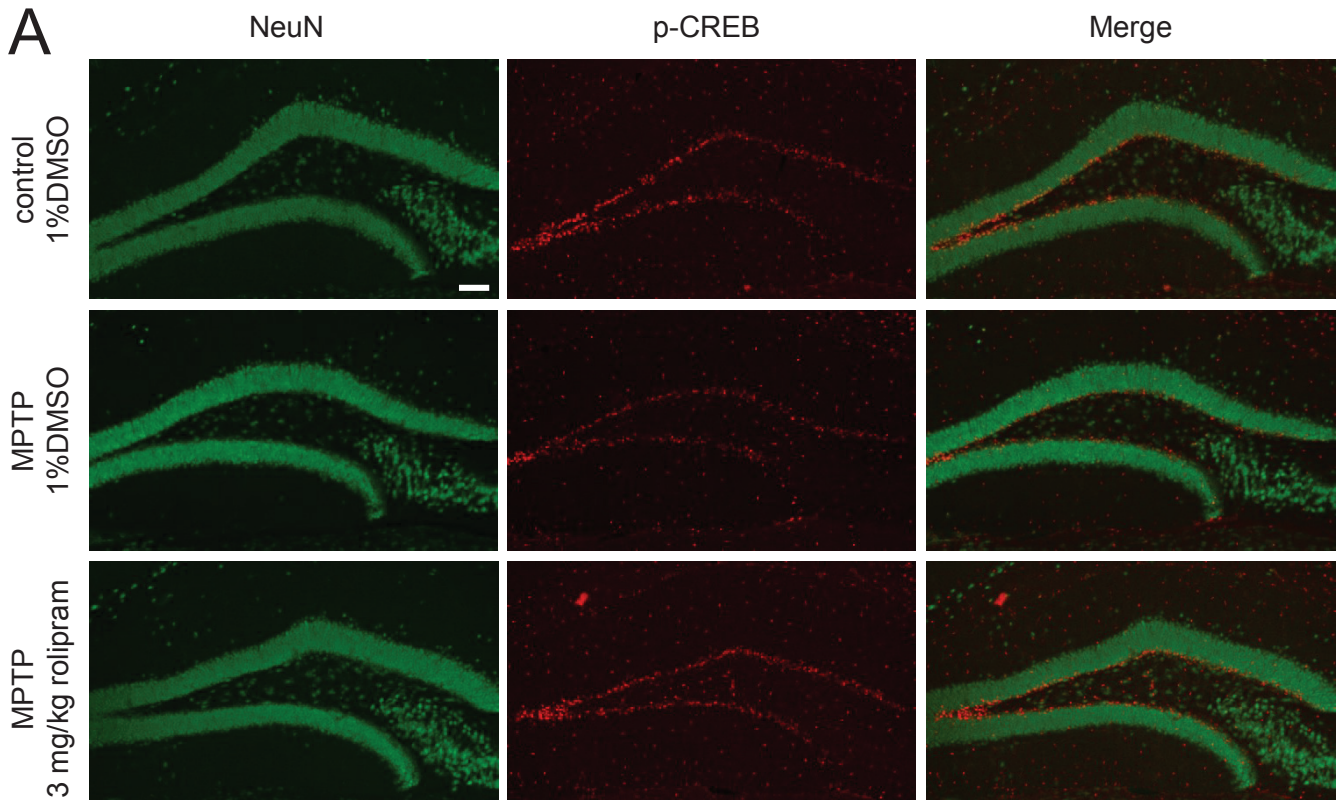


Fig. 19 Effect of rolipram on p-CREB expression in hippocampal DG after fear extinction.

(A) Immunohistochemistry for p-CREB (red) and NeuN (green) in hippocampal DG after fear extinction. Scale bar = 100 μ m. (B) Counts of p-CREB positive cells in hippocampal DG. Data are mean \pm SD; $n=7-9$. * $p < 0.05$ vs. control-DMSO, # $p < 0.05$ vs. MPTP-DMSO by Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney U-tests.

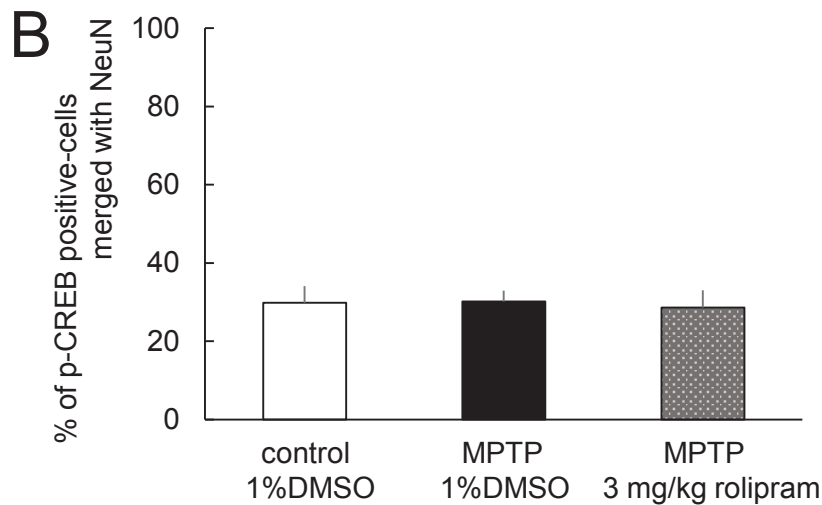
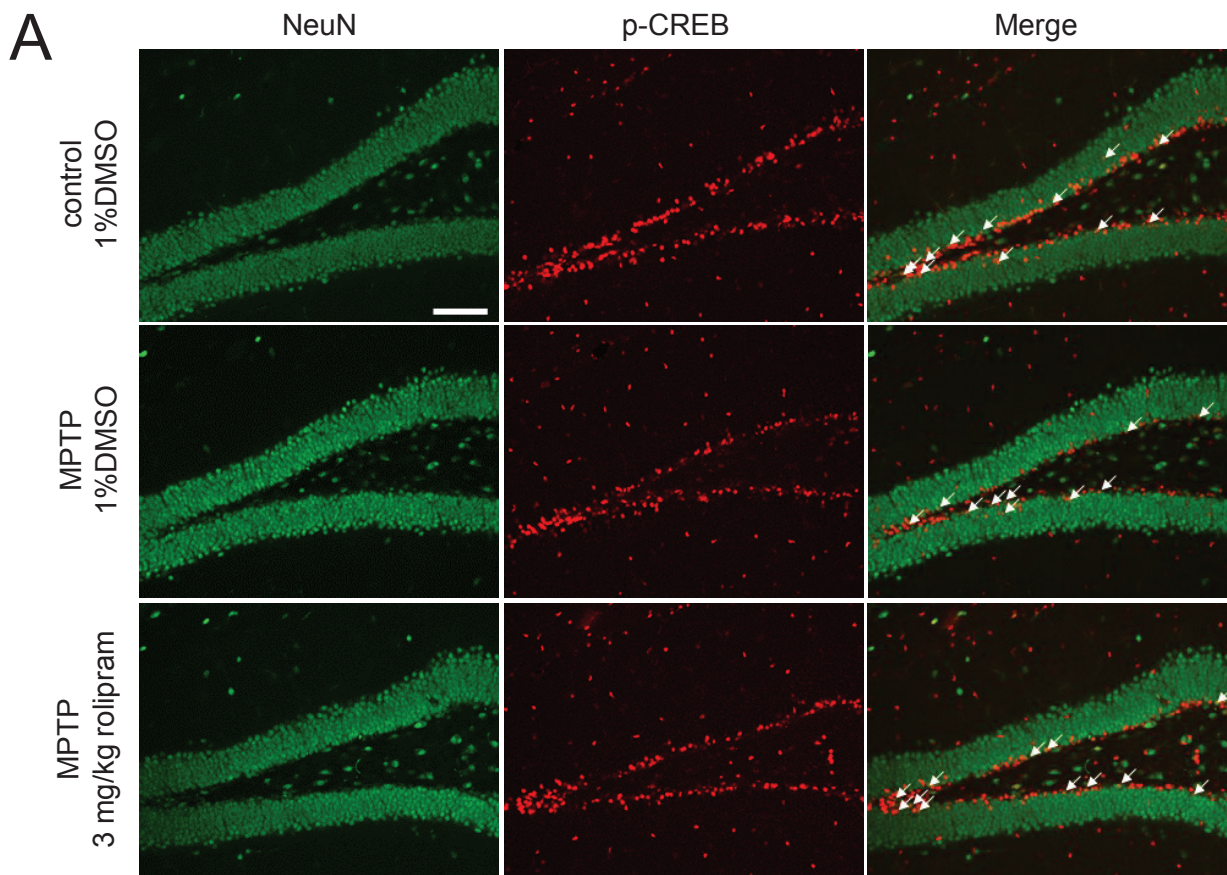
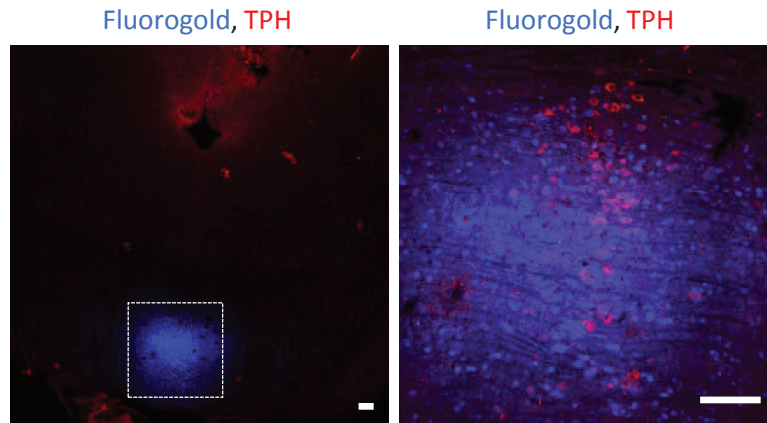


Fig. 20 Analysis of the percentage of p-CREB positive-cells positive for NeuN in hippocampal DG after extinction training.

(A) Immunohistochemistry for p-CREB (red) and NeuN (green) in hippocampal DG after fear extinction. Scale bar = 100 μ m. Arrows indicate p-CREB positive-cells merged with NeuN. (B) Rate of p-CREB positive-cells merged with NeuN. Data are represented as (p-CREB positive-cells positive for NeuN/total of p-CREB positive-cells) \times 100. There were no significance among. Data are mean \pm SD; n = 5 - 6.

A



B

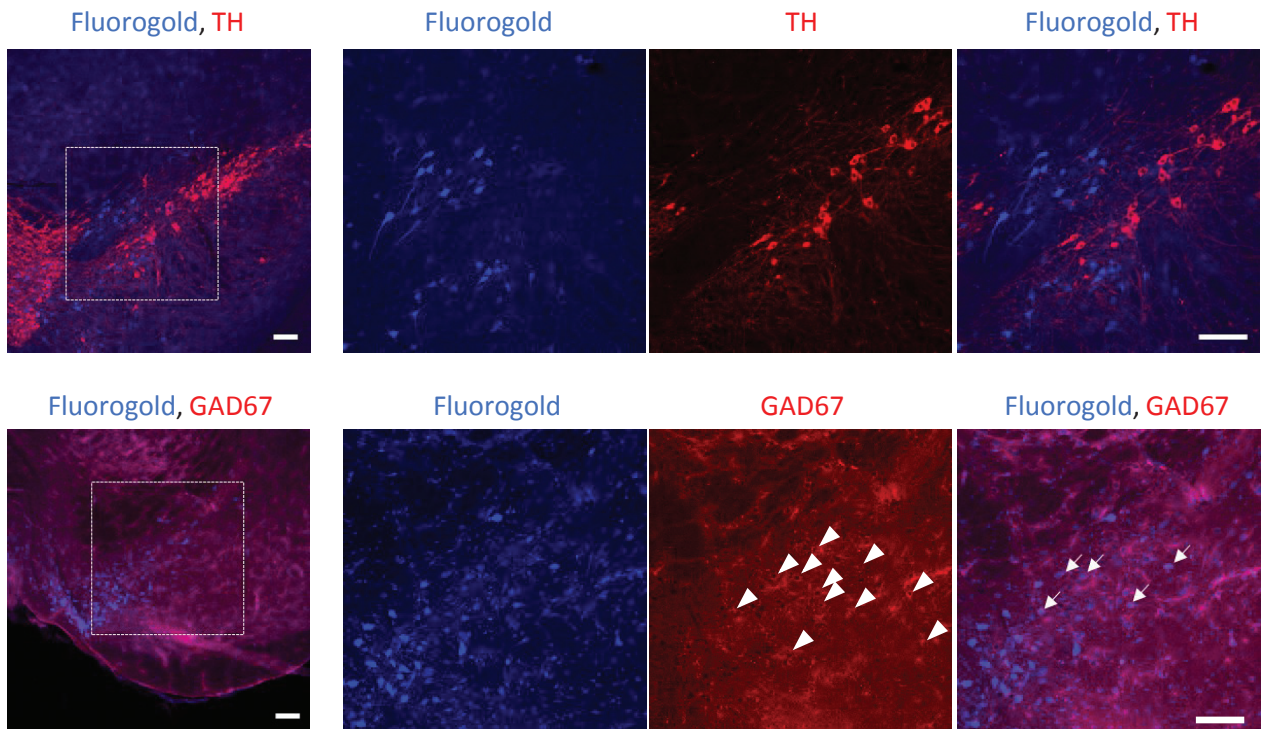


Fig. 21 Analysis of the neuronal inputs to MRN from SNpc.

Immunohistochemistry for fluorogold (blue) and TPH (red) in MRN where is injection site of 2%fluorogold. (B) Immunohistochemistry for fluorogold (blue) and TH (red) (upper), and for fluorogold (blue) and GAD67 (red) (lower) in SNpc. Arrow heads indicate GAD67-positive cells. Arrows indicate fluorogold merged with GAD67-positive cells. Scale bar = 100 μm .

学位論文和文要旨

パーキンソン病 (parkinson's disease: PD) は進行性の神経変性疾患で、黒質線条体のドパミン (dopamine: DA) 神経が変性することにより、錐体外路症状と呼ばれる運動障害を引き起こす疾患である。また、運動障害以外にも認知障害を併発することが多いが、PD に認知障害が併発する機構は解明されておらず、現在 PD に併発する認知障害に対する有効な治療薬は存在しない。そこで、本研究は PD モデルマウス (PD マウス) を用いて認知機能を解析することにより、PD に併発する認知障害の発症機構を解明し、得られた研究成果から、新規治療薬を開発するための手がかりを見出すことを目的に実験を行った。

第 1 章では PD マウスの作出及び評価を行った。PD マウスは黒質の DA 神経を特異的に破壊する 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の急性投与 (20 mg/kg, 2 時間おきに 4 回腹腔内投与) により作出し、組織学的及び行動学的に評価を行った。その結果、PD マウスの黒質緻密部において、DA 神経細胞のマーカーとなる tyrosine hydroxylase (TH) 陽性細胞数が生理食塩水を投与した control マウスと比較し有意に減少していた。PD マウスの線条体においても抗 TH 抗体での染色性の低下や TH 含量の低下が認められた。次に、運動協調性を評価する目的でローターロッドテストを行ったところ、PD マウスは control マウスと比較しロッドから落下するまでの時間が有意に短縮した。一方、一般行動や情動行動を評価するホールボードテストでは、全ての評価項目において両群間に有意な変化は認められなかった。以上の結果から、MPTP 急性投与により作出した PD マウスは PD 患者と同様、黒質線条体の DA 神経が減少し運動協調性の低下が認められた。

第 2 章では文脈的恐怖条件付け試験を用いて PD マウスの記憶の固定・再固定・消去機能を解析した。この試験は装置にマウスを入れ (conditioned stimulus: CS), 嫌悪刺

激となる電気刺激 (unconditioned stimulus: US) を与えることにより CS に対して恐怖を学習させるものである。獲得後固定された記憶は CS 再提示によって一度不安定な状態となる。CS の再提示が短時間の場合、記憶の再固定が誘導され恐怖記憶は保存されるが、CS を長時間提示すると消去が誘導され恐怖記憶は減弱する。本研究では US に比較的弱い刺激 (1 mA/2 秒, 1 回) と強い刺激 (2 mA/2 秒, 2 回) を用いて、PD マウスの固定・再固定・消去の解析を行った。その結果、弱刺激時では全ての試験において両群間で有意な変化は認められなかった。一方、強刺激時では、PD マウスの記憶の固定・再固定は control マウスと同等であったものの、記憶の消去テストにおいて PD マウスは control マウスより早期からフリージング行動の減少が認められ、記憶の消去が亢進していることが分かった。同様に PD マウスの記憶の保持機能を評価したところ、control マウスよりも早期からフリージング行動の減少が認められ、PD マウスの記憶の保持機能は低下していることが分かった。以上の結果から、MPTP 誘発性 PD マウスは記憶の固定・再固定は正常であるものの、記憶の消去が亢進し、記憶の保持機能が低下していることが明らかとなった。

第 3 章では PD マウスにおける記憶の消去亢進メカニズムの解析を行った。海馬における cAMP-CREB シグナルは文脈的恐怖記憶に重要な役割を担っていることから、恐怖記憶消去時の海馬における cAMP, CREB の発現解析を行った。その結果、消去誘導の前後において PD マウスは control マウスと比較し、海馬 cAMP 発現量が有意に減少していた。また、PD マウスのリン酸化 CREB (phosphorylated CREB: p-CREB) 発現は消去誘導の 30 分後の海馬歯状回 (dentate gyrus: DG) において、control マウスと比較し有意な減少が認められた。その際、p-CREB 発現の多くは成熟神経細胞やグリア細胞ではなく未熟細胞に多く認められた。この結果を受け、ホスホジエステラーゼ IV 阻害薬であるロリプラムを腹腔内投与し、PD マウスの海馬 cAMP を増加させた場合の記憶の消去亢進に対する改善効果を検討した。消去誘導の 2 時間前にロリプラムを腹腔

内投与し消去機能を評価したところ、PD マウスの消去亢進はロリプラムの用量依存性 (1, 2, 3 mg/kg) に改善した。また、消去誘導後において高用量のロリプラム (3 mg/kg) は PD マウスの海馬 DG の p-CREB 減少を control マウスレベルにまで回復させた。

以上の結果から、黒質線条体 DA 神経傷害は海馬歯状回の cAMP-CREB 経路の減弱を誘導し、その結果、記憶の消去亢進を引き起こすことが示唆された。また、ロリプラムは減弱した cAMP-CREB 経路を補うことで、PD マウスにおける記憶の消去亢進を改善することが明らかとなった。

學位論文英文要旨

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic (DAergic) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and DA content in the striatum. Although PD exhibits movement-related behavioral deficits such as tremor, rigidity and akinesia as the most obvious symptom, thinking and retrieval deficits often arise from cognitive impairment. However the mechanism of cognitive deficits in PD remains largely unknown, and there are no effective therapies and drugs for cognitive deficits in PD. In the present study, I investigated the mechanism of cognitive deficits in PD mice resulting from loss of the nigrostriatal DAergic neurons and explored the novel drug for cognitive impairment for PD.

In the first chapter, I produced PD model mice (PD mice) by administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (four intraperitoneal injections of a single dose of 20 mg/kg every 2 hours), which results in loss of nigrostriatal DAergic neurons and causes PD like symptoms in the primates and rodents, and evaluated the loss of nigrostriatal DAergic neurons and movement-related behavioral deficits. Immunohistochemical analysis showed that tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells in the SNpc of PD mice, which is the marker of DA neuronal cell, were significantly decreased than control mice. Moreover, the low intensity of positively staining with anti-TH antibody and a decrease in TH-positive cells were observed in the striatum of PD mice. Next, I evaluated the motor coordination in PD mice by the rotarod test. PD mice showed a significant reduction of latency fall from the rod compared with control mice. On the other hands, in the hole board test that assess the general behavior and emotional behavior, there were no significant differences in locomotion, rearing behavior and head-dipping behavior between control and PD mice. These results suggested that MPTP administration using my methods causes both PD-like symptom such as deficit of the motor coordination and pathology such as loss of

nigrostriatal DAergic neurons in mice.

In the second chapter, I evaluated the cognitive function, including memory consolidation, reconsolidation and extinction, by the contextual fear conditioning test in the PD mice. In this test, mice were placed in the conditioning box (context) as a conditioned stimulus (CS) and applied an un-signalized foot shock as an unconditioned stimulus (US). As the results, mice learn the fear to the CS. The consolidated memory after fear conditioning becomes an unstable state by re-exposure to CS and/or memory retrieval. If mice are re-exposed to CS for a short term, unstable memory become stable state again via the reconsolidation process. On the other hands, in the case of prolonged re-exposure to CS, consolidated memory is attenuated via an extinction process. In this study, I conducted the test using weak US (1 mA/2 s, single) or intense US (2 mA/2 s, twice) and evaluated memory consolidation, reconsolidation and extinction using short re-exposure to CS (3 min: reconsolidation training) or long re-exposure (30 min: extinction training) without US 24 h after fear conditioning. These memories were assessed by evaluation of freezing behavior that is fear behavior of mice. When I conducted the test using a weak US, there were no significant differences between control and PD mice in all memory tests. Similarly, memory consolidation and reconsolidation in PD mice normally occurred under an intense US. When I conducted the extinction test using an intense US, however, PD mice showed a significant reduction in freezing rate earlier than control mice. Furthermore, fear memory in PD mice was also attenuated earlier than control mice in the memory retention test conducted by repeated short re-exposures to CS (3 min) every 24h. These results suggests that MPTP-induced PD mice facilitate the memory extinction and attenuate the memory retention, whereas consolidation and reconsolidation are normally occurred.

In the third chapter, I analyzed the molecular mechanism of facilitation of extinction in PD mice. In the hippocampal neurons, the intracellular cascade involving cAMP/CREB signaling pathway plays a critical role in memory extinction and memory retrieval. I examined whether the cAMP-CREB

cascade in the hippocampus is involved in facilitation of fear extinction in PD mice. The enzyme-linked immunosorbent assay showed that the hippocampal cAMP levels in PD mice were significantly decreased before and after extinction training compared to control mice. Moreover, p-CREB-positive cells were significantly decreased in the hippocampal DG in PD mice compared to control mice 30 min after the second extinction training. The p-CREB-positive cells partly expressed in the mature cells and mostly expressed in the immature cells but not the astrocyte. Therefore, I examined whether rolipram, the phosphodiesterase IV inhibitor, can improve facilitation of fear extinction in PD mice via increasing in hippocampal cAMP levels. Intraperitoneal administration of rolipram (a single injection at 1, 2, or 3 mg/kg) 2 h before both extinction training prevented facilitation of the contextual fear extinction in PD mice in a dose-dependent manner, whereas there were no effect on the fear extinction in control mice. Moreover, administration of higher dosage of rolipram (3 mg/kg) to PD mice significantly restored the number of p-CREB-positive cells in the hippocampal DG to the level in control mice. These results suggest that facilitation of memory extinction in PD mice may be due to the attenuation of cAMP-CREB signaling in hippocampal DG, and rolipram improve the facilitation of extinction in PD mice by restoring the cAMP-CREB signaling pathway.

The present study revealed that loss of the nigrostriatal DA neurons causes attenuation of the cAMP-CREB signaling pathway in the hippocampal DG, resulting in the facilitation of memory extinction. Moreover, I strongly suggest that rolipram may be potentially useful as a therapeutic drug to treat cognitive deficits in PD by improving the cAMP-CREB signaling pathway in the hippocampal DG.