

平成 30 年 9 月 8 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07910

研究課題名(和文)瞬目反射条件付けを用いた学習獲得における意識状態の役割の解析

研究課題名(英文)The role of awareness in learning acquisition during eyeblink conditioning

研究代表者

岸本 泰司(Kishimoto, Yasushi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：90441592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：瞬目反射条件づけを学習系として、学習獲得および発現に対する覚醒状態の役割について解析を行なった。サルにおける実験では、覚醒レベルにかかわらず潜在学習が発現されたのに対し、マウスでは覚醒状態と瞬目反射条件づけの条件反射の発現の間に明瞭な相関関係があることが明らかとなった。また、周囲への知覚や注意の度合いが学習の獲得と発現に強く関連していることも示した。各種モデル動物をこの実験系に適応することにより、脳神経疾患を克服する治療戦略の開発に繋げる方法論の開発を試みた。この過程で、MGLやMDGA1、MDGA2などの機能分子の脳高次機能における生理機能を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：By using eyeblink conditioning, we analyzed the role of awareness/attention on learning acquisition and expression. Experiments in monkeys revealed that latent learning occurred regardless of arousal level, whereas in mice, there was a clear correlation between the arousal state and the expression of conditioned eyeblink responses. We also showed that the perception of surroundings and the degree of attention were strongly correlated with acquisition and expression of learning. By adapting various model animals to this experimental system, we attempted to develop a methodology leading to the development of a therapeutic strategy to overcome neurodegenerative diseases. In this process, we were able to elucidate the physiological role of monoacylglycerol lipase, MDGA1, and MDGA2 in the higher brain functions.

研究分野：神経科学

キーワード：瞬目反射条件づけ 意識 睡眠 条件反射 学習 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

従来の記憶の生物学的研究では、通常内的環境としての意識を切り離して解析が進められてきた。例えば、遺伝子改変マウスを用いた学習実験では、通常、訓練時にも評価時にも、被験動物を覚醒させた状態で行い、また通常、課題遂行中の注意の度合いについても議論の俎上から外す。研究代表者は主にマウスを実験動物として、「瞬目反射条件づけ」を中心に記憶学習の分子機構について20年近く一貫して研究してきた。瞬目反射条件づけとは、音を条件刺激(CS)、眼瞼への刺激を無条件刺激(US)とした時、両刺激の組み合わせにより音を聴いただけで瞬きの条件応答(CR)が出現するようになるパブロフ型の連合学習である。CSとUSの時間間隔によって、潜在的学習が顕在的学習のいずれにもなるという特性も持つ。

2. 研究の目的

瞬目反射条件付け等の各種行動課題を指標として、学習の獲得および発現に対する「覚醒や注意といった意識状態」の役割・寄与を明らかにすることを目的として研究を開始した。マウス、サル、それぞれの動物種の利点を生かし、意識状態が学習に対する与える影響について、分子から個体までのレベルにわたった統合的な理解を目指した。なお、意識状態の評価には、瞼の開眼状態、脳波計測法等を使用する。さらに、モデル動物をこの実験系に適應することで、意識と学習の分子基盤との相関を明らかにし、アルツハイマー病(AD)、統合失調症、自閉症に代表される、(広義の)意識障害や意識変容を症状とする脳神経疾患を克服する治療戦略の開発に繋げることをも目指した。

3. 研究の方法

モンキーチェアにサルを座らせ、高速ビデオカメラ法と眼輪筋 (orbicularis oculi muscle) の筋電図 (EMG) 法を組み合わせることによって、サルの瞼の動きを定量的かつ高感度に検出する方法を確立した。さらにCSとしてスピーカーからの音刺激とUSとしての空気刺激の両刺激をコンピュータで出力制御することで条件づけシステムを構築した。なお、ビデオカメラ法は瞼の位置を物理的にトラッキングする方法であり、本システムでは1 kHzという非常に時間解像度に優れたセンサーを利用することで微細な瞼の動きを捉えることを可能としている。またカメラで取得される眼の画像の解析により、動物の覚醒の度合いも判定することも可能である。一方、眼輪筋の筋電図法は、瞬目の主動筋である眼輪筋の筋電位を捉えるもので、非常に有効で感度の高い瞬目の検出法と考えられている。サルにこの方法論を導入するにあたっては、左下眼瞼と外眼角部の体毛を剃り肌を露出し、この部位に銀皿電極を装着することで解決を見た。マウスにおいては、頭

部にコネクタを固定し、瞼裏に電極を埋め込む眼輪筋の筋電位を取得し、これを学習行動の測定に用いた。また、覚醒状態は、ビデオカメラによる瞼の状態および、EEG/EMG システム(PINNACLE technology Inc.)による脳波測定により判定を行なった。睡眠/覚醒状態判定は、脳波が覚醒(W)、徐波睡眠(S)、レム睡眠(R)のいずれかにあるかを判断して行った。

4. 研究成果

サルにおける実験では、瞼を閉じていても完全に瞼が開いていても、学習が再現する頻度には全く違いがないことが明らかとなった(むしろ閉眼中の学習率の方が高い傾向にさえあった)(図1)。この結果は、覚醒レベルにかかわらず潜在学習が発現されることを示したものである。一方、野生型マウスにおいては、睡眠状態と判定された時間における試行では、覚醒状態と判断される時間に比べ、学習(条件反射)の発現が明らかに抑えられることが明らかとなった($p = 0.021$)。この違いは動物種差によるものかもしれない。

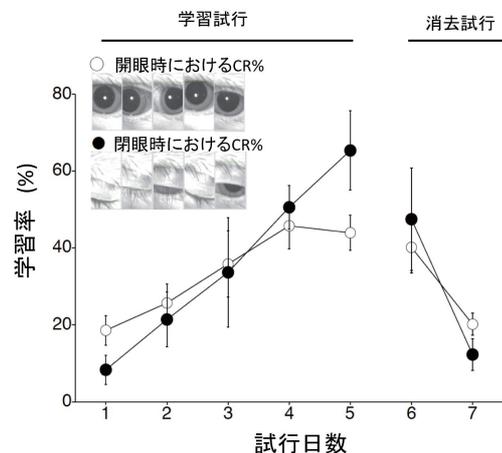


図1 サルにおける覚醒度合と学習率との関係

また、試行中に外部からCSとは異なるブザーで動物に対して環境に対する注意を喚起すると、瞬目反射条件付けの学習率が高くなるという現象を観察し、周囲への知覚・運動的意識(注意)の度合いが学習の獲得と発現に強く関連していることを示した。

なお、本実験系を、様々な神経疾患モデルマウスに適應するに当たって、認知機能や社会性といった行動学的解析自体に重要な知見を得る可能性が生じたため(さらには人を利用した研究に困難が生じたため)、一部当初予定を変更し、各種疾患モデルマウスに対し、瞬目反射条件づけをはじめとして詳細な認知機能解析を行なった。その結果の一部を以下に記載する。

1) 2-AG 分解酵素モノアシルグリセロールリパーゼ欠損マウスにおける課題依存性学習障害 脳マリファナの成分であるカンナビ

ノイド系に関する生物学は近年大きく進展し、カンナビノイド系に作用する薬剤は様々な病態への治療薬として期待されている。生体内には内在性カンナビノイド(エンドカンナビノイド)が結合する CB1 と CB2 の 2 種類の受容体が存在する。このうち CB1 受容体を介したエンドカンナビノイドシグナリングが、様々な行動や学習、特に海馬依存性の記憶の消去に重要である事がこの 10 年余の研究で明らかにされてきた(たとえば、脳内エンドカンナビノイド系は恐怖条件づけ実験で不快記憶の消去を促進させる方向に働く。そのことから CB1 受容体を賦活する薬剤が恐怖症、PTSD などの不安障害治療薬として期待されている)。内在性カンナビノイドの代表的な候補に、アナンダミド(anandamide)と 2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)がある。しかしながら、実際にどちらが、記憶学習に重要な役割を担っているかについては明らかでなかった。そこで、2-AG を分解する酵素であるモノアシルグリセロールリパーゼを欠損させたノックアウトマウスで、自発活動性と併せ、5 種類の海馬依存性課題、1) 新規物体認知記憶試験、2) 文脈性恐怖条件づけ、3) モリス式水迷路試験、4) 瞬目反射条件づけ痕跡課題、5) 水探索試験、を解析し、海馬記憶における 2-AG の役割を明らかにする事を目的とした。行動解析の結果、2-AG が海馬依存性の各種課題において、様々な課題依存性の役割を担っていることを明らかにできた(Kishimoto et al., 2015 Front. Behav. Neurosci.).

2) MDGA1 および MDGA2 mutant mice の行動解析

MDGAs (MAM-domain containing glycosylphosphatidylinositol anchors)は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する GPI アンカー型の細胞外タンパク質であり、MDGA1 と MDGA2 の 2 種のファミリー分子よりなる。MDGA1 は大脳皮質や海馬など、認知機能に重要な脳領域で強く発現し、神経細胞の位置やシナプス形成を制御していることが明らかとなっている。一方、MDGA2 はその機能の解析があまり進んでいないが、MDGA1 よりも広い脳領域で発現が見られる。また、近年のゲノム解析により、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の患者において MDGA1 の遺伝子の変異が見られることから、精神・認知機能に MDGAs が重要であることも示唆されている。しかしながら、MDGAs の遺伝子変異が、行動をどのように変化させるかについては、未だ報告がない。そこで本研究では、MDGA1 および MDGA2 のノックアウト(KO)マウスを用いて、各 MDGAs の遺伝子欠損でどのような行動変化が実際に生じるのかを、特に社会的行動に焦点を当てて解析した。その結果、MDGA1 KO マウスでは、空間学習をはじめとした海馬学習に障害が見られるとともに、瞬目反射条件づけの学習獲得にも障害を呈すことを明

らかにした。また、MDGA2 hetero マウスでは、非社会的刺激物に対する関心に変化はなかったが、社会性認知試験において、刺激マウスとの交流時間の減少が見られ、この結果から、MDGA2 は社会性機能に重要な役割を持つことが示された。さらに MDGA2 ヘテロマウスでは、瞬目反射条件づけにおける条件反射のタイミングに攪乱が観察された。これらの結果は、ある種の精神・認知疾患(例えば自閉症スペクトラム障害)で見られる症状(社会的相互交渉やコミュニケーション能力障害)と一致する行動をモデル動物で再現し、MDGAs が正常な社会的行動に重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

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 7 件)

Connor S.A, Ammendrup-Johnsen I, Kishimoto Y, Tari PK, Cvetkovska V, Harada T, Ojima D, Yamamoto T, Wang Y.T, Craig A.M. (2017) Loss of synapse repressor MDGA1 enhances perisomatic inhibition, confers resistance to network excitation, and impairs cognitive function. Cell Reports 21 (13) 3637-3645.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221112471731793X?via%3Dihub>

Kishimoto Y, Fukumoto K, Nagai M, Mizuguchi A, Kobashi Y (2017) Early contextual fear memory deficits in a double-transgenic amyloid- precursor protein/presenilin 2 mouse model of Alzheimer's disease. Int. J. Alz. Dis.2017, 8584205.

<https://www.hindawi.com/journals/ijad/article/8584205/>

Connor S.A*, Ammendrup-Johnsen I*, Chan A.W*, Kishimoto Y*, Murayama C, Kurihara N, Tada A, Ge Y, Lu H, Yan R, LeDuc J.M, Matsumoto H, Kiyonari H, Kirino Y, Matsuzaki F, Suzuki T, Murphy T.H, Wang Y.T, Yamamoto T, Craig A.M. (*Co-1st authors) (2016) Altered cortical dynamics and cognitive function upon haploinsufficiency of the autism-linked excitatory synaptic suppressor MDGA2. Neuron 91 (5) 1052-1068.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627316305086?via%3Dihub>

Kishimoto Y, Shishido H, Sawanishi M, Toyota Y, Ueno M, Kubota T, Kirino Y, Tamiya T, Kawai N. (2016) Data on amyloid precursor protein accumulation, spontaneous physical activity, and motor

learning after traumatic brain injury in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Data in Brief 9, 62-67.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235234091630542X?via%3Dihub>

Shishido H, Kishimoto Y, Kawai N, Toyota Y, Ueno M, Kubota T, Kirino Y, Tamiya T. (2016) Traumatic brain injury accelerates amyloid-beta deposition and impairs spatial learning in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 629, 62-67.

Kishimoto Y, Cagniard B, Yamazaki M, Nakayama J, Sakimura K, Kirino Y, Kano M. (2015) Task-specific enhancement of hippocampus-dependent learning in mice deficient in monoacylglycerol lipase, the major hydrolyzing enzyme of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Front. Behav. Neurosci.* 9 134. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451424/>

Kishimoto Y, Yamamoto S, Suzuki K, Toyoda H, Kano M, Tsukada H, Kirino Y. (2015) Implicit Memory in Monkeys: Development of a Delay Eyeblink Conditioning System with Parallel Electromyographic and High-Speed Video Measurements. *Plos One* 10(6) :e0129828. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0129828>

〔学会発表〕(計 15 件)

岸本泰司「記憶と心のメカニズム - 遺伝子改変マウスを用いた実験から - 」第 138 回日本薬学会中国四国支部例会、2018 年 1 月 27 日、徳島文理大学、さぬき市。

山本融、Connor A Steven、岸本泰司、Ammendrup-Johnsen Ina、栗原直和、村山千明、尾嶋大喜、Hossain Razib、鈴木利治、Craig Ann Marie「シナプス形成抑制因子 MDGA 2 のヘミ欠損は興奮/抑制バランスの興奮側へのシフトによる ASD 様の社会性行動異常をもたらす」第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日-7 月 23 日、幕張メッセ、千葉市。

岸本泰司「プラセボ反応の脳内メカニズム (公募シンポジウム プラセボ効果とは何かー心理学と神経科学からのアプローチ)」、日本心理学会第 81 回大会、

2017 年 9 月 20 日-9 月 22 日、久留米シティプラザ、久留米市。

多田篤史、福本絵、天野翔太、尾嶋大喜、山本融、岸本泰司「Mdga2 遺伝子ヘミ欠損マウスの学習障害に対する R-Baclofen の効果」第 56 回日本薬学会日本薬剤師会日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2017 年 10 月 21 日-10 月 22 日、徳島大学、徳島市。

Yutaka Kirino, Hajime Shishido, Nobuyuki Kawai, Yasunori Toyota, Takashi Tamiya, Takashi Kubota, Masaki Ueno, Yasushi Kishimoto. "Traumatic brain injury accelerates amyloid- β deposition and impairs learning and memory in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease" *Neuroscience 2017* (北米神経科学学会), 2017 年 11 月 11 日-11 月 15 日、Washington, D.C., U.S.A.

山本融、Connor A Steven、岸本泰司、Ammendrup-Johnsen Ina、栗原直和、村山千明、尾嶋大喜、Hossain Razib、鈴木利治、Craig Ann Marie「MDGA 2 は興奮性シナプス形成抑制因子であり、そのヘミ欠損は興奮性の亢進と ASD 様の行動異常をもたらす」日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 - 27 日、仙台国際会議場、仙台市

岸本泰司「記憶・忘却・社会性の分子機構」2017 年 1 月 10 日、第 9 回バイオナノシステムズ研究会、徳島文理大学香川薬学部、さぬき市。

岸本泰司「脳の『行き過ぎ』を抑えるしくみ」第 8 回 3 大学学術交流会プログラム「うどん県で健やかに暮らそう～健康寿命を延ばす～」、2016 年 12 月 10 日、徳島文理大学村崎サイホール、さぬき市。
山本融、Connor S、岸本泰司、Ina A-J、栗原直和、村山千明、尾嶋大喜、Hossain R、鈴木利治、Craig AM「シナプス形成

抑制因子 MDGA2 のヘミ欠失マウスは興奮性入力の亢進によりもたらされる自閉症スペクトラム障害のモデルとなる」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜、横浜市。

Connor S.A., Ammendrup-Johnsen I, Chan AW, Kishimoto Y, Murayama C, Kurihara N, Tada A, Ge Y, Yan R, LeDue J, Matsumoto H, Kiyonari H, Kirino Y, Matsuzaki F, Suzuki T, Ojima D, Murphy T.H., Wang Y, Yamamoto T, Craig A. "Haploinsufficiency of the neuronal surface protein MDGA2 enhances excitatory synapse development, alters cortical circuit dynamics and yields behavioral phenotypes consistent with autism in mice" Neuroscience 2016 (北米神経科学学会), 2016 年 11 月 12 日-12 月 16 日、San Diego, CA, U.S.A.

岸本泰司、栗原直和、村山千明、多田篤史、桐野豊、山本融 "Altered social and cognitive functions upon haploinsufficiency of the excitatory synaptic suppressor MDGA2 in a mouse model of autism" 日本生物物理学会第 8 回中国四国支部大会 2016 年 5 月 28 日-5 月 29 日、高松テルサ (高松勤労者総合福祉センター)、高松市。
栗原直和、桐野豊、窪田剛志、岸本泰司 「All-trans レチノイン酸の短期的投与がアルツハイマー病モデルマウスの認知・行動に及ぼす効果」日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日-3 月 28 日、神戸学院大学、神戸市。

澤西真由美、岸本泰司、豊田康則、田宮 隆、河井信行、桐野豊 「AD モデルマウスの認知機能に対する慢性脳低灌流の影響」日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日-3 月 28 日、神戸学院大学、神戸市。

Yasushi Kishimoto, Barbara Cagniard, Maya Yamazaki, Junko Nakayama, Kenji Sakimura, Yutaka Kirino, Masanobu Kano 「Task-specific impairment of

hippocampus-dependent learning in mice deficient in monoacylglycerol lipase」第 53 回日本生物物理学会年会 2015 年 9 月 13 日-9 月 15 日、金沢大学、金沢市。

栗原直和、村山千明、山本融、岸本泰司 「マウス MDGAs 遺伝子の欠損は社会性行動を減少させる」第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2015 年 10 月 31 日-11 月 18 日、神戸市文化プラザ、高知市。

〔図書〕(計 2 件)

岸本泰司 (2016) 瞬目反射条件づけ 脳科学辞典 DOI : 10.14931/bsd.6400

岸本泰司 サルの学習実験による「無意識の記憶」の再評価 (2015) 香川県薬剤師会会誌 42-45.

〔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://kp.bunri-u.ac.jp/kph/index-7.htm>
|
<https://researchmap.jp/read0109518/>

新聞報道等

岸本泰司 ASD 解明や治療に道 四国新聞 2016 年 9 月 1 日

岸本泰司 自閉症の一因解明 徳島文理大研究グループ 特定のタンパク質関与 徳島新聞 2016 年 9 月 13 日

岸本泰司 ASD 治療法 確立に光 読

売新聞 2016年9月14日
岸本泰司、桐野豊 睡眠学習も夢じゃない!? 読売新聞(31面) 2015年9月8日
岸本泰司 研究の現場から サル睡眠中も条件反射解明 毎日新聞(27面) 2015年7月7日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本泰司 (KISHIMOTO, Yasushi)
徳島文理大学・香川薬学部・教授
研究者番号: 90441592

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()