

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500304

研究課題名（和文） 幼弱期の学習行動と脳の可塑的発達

研究課題名（英文） Juvenile learning and plastic development of the brain.

研究代表者

浜崎 浩子（OHKI-HAMAZAKI HIROKO）

北里大学・一般教育部・教授

研究者番号：00211483

研究成果の概要（和文）：

刷り込み行動（インプリンティング）は、臨界期（学習が可能な時期）をもち、短時間の学習によって容易に成立する。また、ヒヨコでも観察されることから、幼少期の学習行動を研究するための良いモデルの一つとなっている。本研究では、この学習行動に関係するヒヨコ脳の神経回路を明らかにし、この回路の活性と刷り込み行動の成立が正に相関していること、この活性化には脳内の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体の一つであり、特に幼少期に多い NR2B サブユニット含有 NMDA 受容体が重要であることを解明した。

研究成果の概要（英文）：

Imprinting behavior is a good model for studying juvenile learning, because a critical period for learning is present, it can be established by an easy training and it occurs also in chicks. In this study, we have elucidated a neural circuit responsible for this behavior, and found that the activity of this circuit and performance of imprinting behavior was positively correlated. Moreover, the neural activity of this circuit depended on the NR2B-containing NMDA receptors, which dominate during the juvenile period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：行動神経科学、刷り込み行動、visual Wulst、IMM、NMDA 受容体、電気生理、記憶学習、ヒヨコ

1. 研究開始当初の背景

幼弱な子供の時期には、言語に代表されるような機能の獲得が容易である。このような学習による機能獲得学習が、神経系の発生や可塑的变化によってどのような機構で幼少期では容易に起こり、そしてその後は難しくなっていくのかについては、未だ未解明なところが多い。一方、幼弱ラットやマウスを用いた環境からの感覚情報による感覚系（大脳

皮質視覚野と体性感覚野）の修飾・可塑的発達を明らかにした一連の研究がある。この中では、幼弱期の感覚系において、環境刺激に対する受動的な反応の結果、シナプス再構築が起きることが示されている。成体（若い個体）における空間学習等の神経基盤は、この際にみられるシナプス可塑性と同様のメカニズムでおこることが示されてきている。しかし、非常に幼弱な時期における臨界期をも

つ能動的な学習による記憶の形成がどのような神経基盤に支えられ、またこれがどのようなメカニズムによって減弱あるいは消失していくのかについては、あまり調べられていない。この原因としては、ラットやマウスを用いた適切な実験系が希であることが挙げられる。また、大型哺乳類・霊長類を用いれば可能ではあるが、発育速度が遅いことや分子生物学的な研究の制約、個体数確保の難しさなどが研究を難しくしている。そこで申請者は、生育が比較的早く、孵化直後から実験動物として利用可能なニワトリを用いて、孵化後間もない時期から成立することが知られている刷り込み学習 (Lorenz, Auk, 54:245, 1937) をモデルとして、その成立や消失の神経基盤について明らかにすることで、この問いに答えることを目指している。

われわれはニワトリのヒナを用いて、視覚刺激による刷り込み行動(visual imprinting)を研究対象とした行動実験系をすでに確立している(Maekawa et al., BMC Neuroscience, 7:75, 2006)。鳥類の刷り込み行動に関しては、哺乳類の大脳皮質連合野に相当すると考えられる intermediate medial mesopallium (IMM) が必要であることが知られている(Horn, Nat. Rev. Neurosci., 5:108, 2004)。一方、鳥類で視覚に関連した学習には、哺乳類の visual cortex と機能的な類似性が認められ、終脳背側部にある visual Wulst (VW) という領域による視覚情報処理が必要なことが報告されている。われわれは、刷り込み学習が VW の神経細胞に可塑的な変化を与えることを、ヒヨコ脳の *in vivo* intrinsic optical imaging (光学的記録法) によって確認している。つまり、VW では青、緑、赤色に反応する領域が頭尾軸に沿って順に並んでいるが、刷り込み学習をいずれかの色をもった図形で行うと、その色に対して反応する領域が変化していた。さらに、VW を破壊すると刷り込み学習ができなくなることから、視覚的刷り込みの成立には VW の可塑的变化が必要であることが示唆されている(Maekawa et al., BMC Neuroscience, 7:75, 2006)。また、このような可塑的变化の分子的基盤としてはさまざまな神経伝達物質や受容体、栄養因子が関与していることが考えられたので、これら分子の終脳での発現を調べ、特に VW や IMM に発現している物質の網羅的解析を行った。その中で、ニューロペプチドの一つであるコレシストキニン(CCK)が VW と IMM、さらにこの二つの領域をつなぐ hyperpallium intercalatum (HI) 領域に特徴的に発現していることを発見した。さらに、CCK は神経細胞に発現しており、刷り込み学

習が可能な臨界期中に刷り込み学習 (トレーニング) を行うことにより、CCK 発現細胞の数が増加、かつ活性化されて c-fos を発現すること、また、CCK の働きを薬理的に阻害すると刷り込みが成立しなくなることを見いだしている。このことから、可塑的变化には CCK ニューロンが関与していることを報告している(Maekawa et al., J. Neurochem., 102:1645, 2007)。

これらの結果は IMM のみでなく VW やその両領域をつなぐ HI 層においても神経活動応答性に可塑的变化が起きていることを示しており、視覚的刷り込み成立には VW で処理された刷り込み刺激の視覚情報が IMM に伝達されることが必須と考えられる。本研究ではその情報がどのような経路で実際に伝達されているのか、その伝達効率と刷り込みの成立にはどのような関係があるのか、さらに、VW などにおける可塑性の実体は何かについて分子レベル、細胞レベルでさらに詳しく調べることをめざす。

2. 研究の目的

ヒトを含めた生物では、言語取得能力に代表されるようないくつかの学習能力は幼弱な時期に高く、その後は減弱していくことが知られている。このように非常に幼弱な時期に臨界期をもつ学習が、神経系の発生や可塑的变化によってどのように成立し、その後どのような機構で減弱あるいは消失していくのかについて明らかにすることが本研究の目的である。

以下の項目について明らかにすることを本研究ではめざした。

(1) VW から IMM への神経連絡とその変化について

大脳皮質視覚領と類似性をもつ VW から大脳皮質連合野に相当する機能をもつといわれる IMM への入力様式と、この回路の孵化後の発達、さらに刷り込み学習によるこの回路における神経伝達効率の変化を、脳スライスを作製して電位感受性色素を用いた光学的記録法によって調べる。また、VW と IMM の各々に DiI や逆行性・順行性トレーサーを注入することで、二領域間の神経連絡について解剖学的にも明らかにしていく。

(2) Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) の発現を用いた、広い領域を対象とした可塑的变化の解析

上記の光学的記録法では、細胞レベルでの変化を捉えることができないので、それを補うために、最初期遺伝子であり可塑性との関連が知られている Arc/Arg3.1 の発現変化を用

いる。刷り込み学習に伴う Arc/Arg3.1 の発現変化を調べることにより、これに関与する神経細胞を明らかにする。また、上述のように赤色あるいは青色の図形を刷り込み学習の刺激とした時、それぞれの場合において VW で活性化される部位が異なっていることが intrinsic な光学的記録法によって明らかになっている。これについて、Arc/Arg3.1 遺伝子の発現を見ることで細胞レベルでの活性化細胞の分布を詳細に調べて明らかにする。

(3) グルタミン酸受容体の発現変化

可塑的变化には、NMDA 型や AMPA 型のグルタミン酸受容体の発現変化が関わっていることが考えられるので、免疫組織化学や *in situ hybridization* により、各受容体発現の孵化後と刷り込み学習に伴う変化について明らかにする。

(4) VW, IMM における単一神経細胞レベルでのシナプス応答変化

VW における可塑的变化において、視床からの視覚情報入力とそれを受容する神経細胞間におけるシナプス伝達に変化がおきること、あるいは VW 内での二次シナプスにおいてシナプス伝達の変化がおきることが考えられる。この点についてパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析によって明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 光学的イメージングと電気生理学による神経活動の測定

ヒヨコの脳スライスを作製して電位感受性色素を用いた光学的記録法を用いて、VW を刺激したときのシグナル伝達を調べる。この回路の孵化後の発達を調べた上で、刷り込み学習を行った個体と行っていない個体について、この回路の変化を検討する。そしてどのようなグルタミン酸受容体が機能しているかについて、また、抑制性シナプスの影響について調べるために、NMDA 受容体のアンタゴニストである APV、あるいは非 NMDA 受容体アンタゴニストである CNQX、さらに GABA(A)受容体を阻害する Bicuculline を添加したときの反応を調べる。伝達の変化のみならず、高倍率で記録することにより、各受容体に反応する成分(割合)の変化としても捉える(Momose-Sato et al., J. Neurosci., 24:1366, 2004 らの方法)。

(2) 色素やトレーサーを用いた神経回路の可視化と解剖学的解析

光学的記録法を用いる他、VW と IMM 間の神経連絡については、各々に DiI やトレーサーを注入することで可視化する。固定した

ヒヨコ脳の VW、IMM、さらに VW へ入力する細胞がある視床の DLA (nucleus dorsolateralis anterior thalami) に脂溶性の蛍光物質である DiI の小結晶をおき、2ヶ月後に切片を作製して神経線維がどこに到達しているかを観察する。これによりおおまかな投射先の分布を明らかにした後に、麻酔したヒヨコを脳定位固定装置に固定し、空気圧又はイオントフォレシスにより、順行性に運ばれる BDA (biotinylated dextran amine) や逆行性に運ばれる蛍光ビーズ、あるいは CTB (コレラトキシン B サブユニット) をそれぞれの領域に注入する。その後脳の切片を作製し、組織化学法や免疫組織化学法を用いてトレーサーを含有する神経を可視化して観察することで、これらの領域間の神経連絡について解剖学的に調べる。

(3) 最初期遺伝子である Arc/Arg3.1 やグルタミン酸受容体の発現変化を指標とした、細胞レベルでの可塑的变化の解析

Arc/Arg3.1 遺伝子は、神経細胞が活性化されると直後に発現が始まるばかりでなく、この遺伝子の発現は AMPA 受容体によって制御されていることなどから、可塑性への関与が示唆されている(Tzingounis & Nicoll, Neuron, 52:403, 2006)。そこで、刷り込み学習後のヒヨコ、あるいは学習をさせない対照群のヒヨコの終脳における Arc/Arg3.1 遺伝子の発現を調べることにより、刷り込みに関与する神経細胞を明らかにする。また、Arc/Arg3.1 遺伝子は、神経細胞の活性化後3分で核に発現が見られ始め、15分後では細胞質での発現が見られるため、個々の細胞活性化の「経歴」を知ることができる(Guzowski et al., Nature Neurosci., 2:1120, 1999)。そこで、赤色または青色を刷り込み学習の刺激とした時、それぞれの場合において VW で活性化される細胞の分布を明らかにする。

VW や IMM における可塑性には、グルタミン酸受容体の発現変化によるシナプス伝達の変化が関わっている可能性が大きい。そこで、受容体のサブタイプ特異的な抗体を用いた免疫組織化学、あるいは特異的な cRNA を用いた *in situ hybridization*(Wada et al., J. Comp. Neurol., 476:44, 2004)によって、孵化後から臨界期終了までの約1週間のこれらの分子(遺伝子)の発現変化と、刷り込み学習に伴う発現変化について明らかにする。

(4) 電気生理学的方法を用いたシナプス伝達変化の解析

Arc/Arg3.1 やグルタミン酸受容体のうち特に NMDA 受容体を発現する細胞の情報、さらにトレーサー実験で明らかになった視床

から入力を受ける細胞に対してホールセルパッチを行い、入力線維を刺激することで細胞の応答を調べる。グルタミン酸受容体サブタイプに対するアンタゴニストを作用させることで、薬理学的特性を明確にする。次に、この応答の孵化後の変化や刷り込み学習の有無による変化を明らかにする。さらに、VWに細胞体があり、IMMへ線維をのびしている神経細胞がトレーサー実験で明らかになる予定なので、この細胞へのホールセルパッチを行い、VWの一次細胞の線維を刺激したときの応答を記録する。これについても孵化後の反応の変化、刷り込み学習の影響を調べた後、高頻度刺激を行ったときに長期増強が起きるかどうか等、シナプス伝達の効率変化などについて調べる。

また、刷り込み学習を行っていないヒヨコ脳スライスを用いて、高頻度刺激によって長期増強を起こせるかどうか、また、この応答は臨界期が終了した後のヒヨコ脳スライスではどのように変化するのかについて明らかにすることで、刷り込みの成立とシナプス伝達変化についての知見を得る。

4. 研究成果

(1) ヒヨコ終脳のVWの尾側にあるcore region of the hyperpallium densocellulare (HDCo)と名付けた領域の神経細胞が、IMMの背側にあるperiventricular part of the hyperpallium densocellulare (HDPe)の細胞群に軸索を伸ばし、さらにこの細胞がIMMの細胞に軸索を伸ばしていた(図1)。

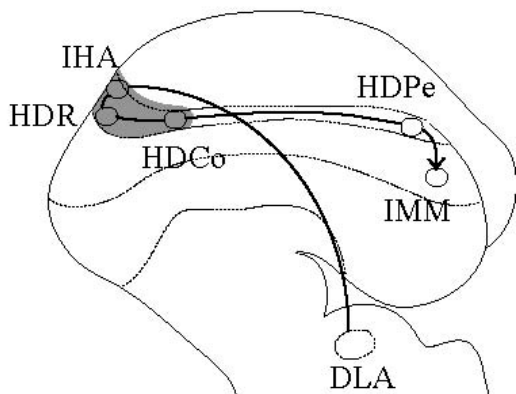


図1. ヒヨコ終脳における、視覚的刷り込み行動に関わる神経回路。灰色の領域がVW。図の左側と上側がそれぞれ脳の前側と背側を表す。

(2) 刷り込みの臨界期中にあたる孵化後1~4日(P1~4)のヒヨコから、終脳の急性スライスを作製して光学的神経活動記録法を用いて調べると、このVW-IMM回路における神経活動シグナルの伝達が観察できたが、臨界

期終了後のP7では観察できなかった。

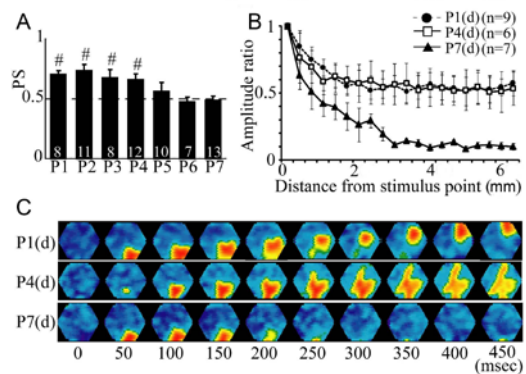


図2. 発達に伴う刷り込み成立の変化と終脳における神経伝達の変化。A. P4までが刷り込み行動の臨界期である。B. 光学的記録法の結果を数値化したもの。C. 光学的記録の結果。P4まではVWからIMMへの神経伝達が見られる。

(3) P1で刷り込みを行ったヒヨコでは、P7においてもこの回路での神経伝達が観察できた。

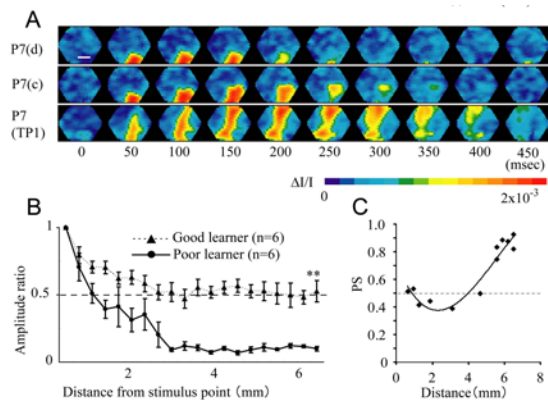


図3. 刷り込みによる神経回路の活性化。A. 光学的記録の結果と、B. それを数値化したもの、C. 神経情報の伝達距離と刷り込みの成績には正の相関がみられる。

(4) このVW-IMM回路の神経伝達には、HDCo細胞の機能が特に重要であった。

(5) NMDA受容体は、NR1とNR2サブユニットから構成されており、ヒヨコ終脳のNR2サブユニットとしては、P1ではNR2Bの発現が多いが、P7頃になるとNR2Aの発現が主要であった。

(6) P1のトレーニング前にNR2B含有NMDA受容体の阻害剤をHDCoに投与すると、P7ではこのVW-IMM回路の情報伝達が見られなくなるとともに、刷り込み行動も起こらなくなった。

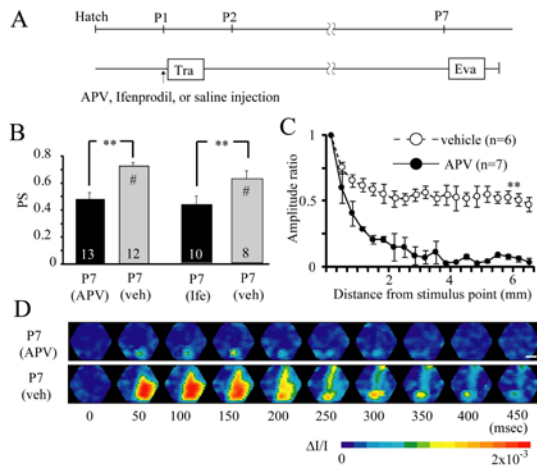


図4. NMDA型受容体阻害の刷り込みと神経伝達に与える影響。A, トレーニング前に阻害剤を脳に注入し、P7で刷り込みを判定し、神経活動を調べた。B, 阻害剤投与群では、刷り込みはおこらない。C, D, 阻害剤投与群では、脳内の神経伝達も抑制されている。

(7) 刷り込みのトレーニングを行うと、その6時間後には、NR2B含有NMDA受容体を発現するHDCo細胞が増加していた。

(8) Arc/Arg3.1の発現を調べると、VWの細胞のうち、トレーニング時に特定の色の図形に反応した細胞は、テスト時にも同じ色に反応することが分かった。異なる色の図形に反応する細胞は、VW内での分布も異なることが示唆された。

(9) 刷り込み直後のHDCo細胞では、長期増強が起きていることがわかった。しかし、トレーニングを行っていない個体の脳スライスを用いて、電気的な高頻度刺激により引き起こした長期増強の反応とは、その発生機序が異なることが示唆されるデータが得られた。

これらのことから、ヒヨコ終脳にはVW-IMM回路が存在し、その活性と刷り込みの成立には正の相関があることが明らかになった。また、刷り込みの成立とこの回路の活性には、VW領域内背側部にあるHDCo領域の細胞が発現するNR2Bの機能が必須であることも解明された。

本研究は幼弱な時期における視覚学習により、脳が機能的に可塑的発達をする変化を生理学的・組織学的にとらえることに成功した。この研究が進むことにより、ヒトの幼児における認知・学習の発達やその障害の発生機序に関する基礎的知見が提供される可能性がある。この点で脳の高次機能の理解ばかりでなく臨床的応用も期待できるので、脳科学の推進に貢献できると考えられる。

さらに、本研究でモデル動物として扱う鳥

類は昼行性であり視覚に依存する割合が高いので、ヒト視覚系と多くの共通点を有する。従って、ラット・マウスを用いた従来からの研究に加えて、鳥類をモデルとした本研究からも新しい知見が得られれば、視覚学習と脳の可塑性を対象とした研究分野に新たな道を開くと期待できる。

本研究の特色は、幼弱な個体における学習に伴う脳の可塑的発達に関する知見が得られた点である。また制約はあるものの、マウスを用いた研究のように、遺伝子から分子、個体レベルでの行動までを有機的に結ぶという大きな特徴を持つ。さらに、ここで扱う行動は明確で、孵化後一週間の間に臨界期を持つので、可塑性の大変良いモデルであり、学習成立に関する新しいメカニズムの解明が期待できる。また、分子生物学的手法、ニワトリ胚への遺伝子導入の技術を使って、遺伝子操作によって刷り込み成立の神経機構について明らかにすることも次のステップとして可能である。

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4件)

① 浜崎 浩子 (2012) 査読無

インプリンティング (刷り込み記憶) の神経科学

BRAIN and NERVE, 64: 657-664.

② 浜崎 浩子 (2011) 査読無

幼弱期の学習メカニズムの解析～ヒヨコの刷り込み行動 (インプリンティング) を用いて～

日仏生物学会誌, 51: 57-60.

③ Nakamori, T., Sato, K., Atoji, Y., Kanamatsu, T., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2010) 査読有

Demonstration of a neural circuit critical for imprinting behavior in chicks

J. Neurosci., 30:4467-4480.

④ Murakami, S., Ohki-Hamazaki, H., Watanabe, K., Ikenaka, K. and Ono, K. (2010) 査読有

Netrin 1 provides a chemoattractive cue for the ventral migration of GnRH neurons in the chick forebrain.

J. Comp. Neurol., 518:2019-2034.

[学会発表] (計9件)

① Tomoharu Nakamori, Katsushige Sato, Kohichi Tanaka, Hiroko Ohki-Hamazaki (2011)

NR2B-dependent neural activation is indispensable for visual imprinting.

第34回日本神経科学大会、横浜 2011年9月16

日 ポスター (P3-o03)

② Keiko Suzuki, Kohichi Tanaka, Hiroko Ohki-Hamazaki (2011)

BDNF promotes imprinting behavior in chicks.
第34回日本神経科学大会、横浜 2011年9月16日
ポスター (P3-n21)

③ Hayato Sugiyama, Kohichi Tanaka, Hiroko Ohki-Hamazaki (2011)

Role of noradrenaline in visual imprinting
第34回日本神経科学大会、横浜 2011年9月16日
ポスター (P3-n17)

④ Keiko Suzuki, Hiroko Ohki-Hamazaki, Kohichi Tanaka (2010)

Genetic approach to dissect the role of BDNF on visual imprinting in chicks.
第33回日本神経科学大会、神戸 2010年9月4日
ポスター (P3-I02)

⑤ Tomoharu Nakamori, Katsushige Sato, Kohichi Tanaka, Hiroko Ohki-Hamazaki (2010)
NR2B dependent LTP is required for the visual imprinting.

第33回日本神経科学大会、神戸 2010年9月3日
ポスター (P2-I08)

⑥ 杉山 勇人、浜崎 浩子(2009)

視覚的刷り込みにおけるノルアドレナリンの働き

Role of noradrenaline in visual imprinting.

日仏生物学会第171回例会、京都

2009年11月28日

⑦ Tomoharu Nakamori, Katsushige Sato, Kohichi Tanaka, Hiroko Ohki-Hamazaki (2009)

Activation of a telencephalic circuit is critical for visual imprinting in chicks

第32回日本神経科学大会、名古屋 2009年9月17日
口頭 (O1-J4-1)

⑧ Tomoharu Nakamori, Katsushige Sato, Kohichi Tanaka, Hiroko Ohki-Hamazaki (2009)

A telencephalic neural circuit critical for visual imprinting in chicks

第36回国際生理学会

The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009)

京都 2009年7月28日
ポスター (P1PM-6-9)

⑨ 鈴木 啓子、浜崎 浩子 (2009)

ヒヨコの刷り込みにおけるBDNFの役割

Role of the BDNF in the neural plasticity of chick visual imprinting.

日仏生物学会第170回例会、東京 2009年6月13日

[その他]

ホームページ

<http://www.clas.kitasato-u.ac.jp/bio/personal/hamazaki/index2a.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浜崎 浩子 (OHKI-HAMAZAKI HIROKO)

北里大学・一般教育部・教授

研究者番号：00211483

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

佐藤 勝重 (SATO KATSUSHIGE)

駒沢女子大学・人間健康学部・教授

研究者番号：80291342

研究協力者：大学院生5名、実験補助者1名。