

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31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570161

研究課題名（和文） 学習記憶メカニズムの多重性と階層的制御機構の解明

研究課題名（英文） A Study on the multiplicity and hierarchical control of the mechanism for learning and memory.

研究代表者

川原 茂敬 (KAWAHARA SHIGENORI)

富山大学・大学院理工学研究部（工学）・教授

研究者番号：10204752

研究成果の概要（和文）：本研究では比較的神経回路が良くわかっている運動学習課題（瞬目反射条件付け）を用いて、小脳が果たす役割および上位中枢が果たす役割を検討した。その結果、ラットでは、この学習が条件付ける目と同じ側の小脳に大きく依存して記憶の獲得および発現をすることが明らかとなった。また、野性型マウス（C57BL/6 マウス）とは対照的に、海馬を含む上位中枢に異常を持つマウス系統（DBA/2 マウス）では、ラットやウサギと同様に、同側の小脳深部核に大きく依存して学習することも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the roles of cerebellum and the higher nervous systems in a motor learning task, the classical eyeblink conditioning, in which the basic neural circuit has been elucidated in rabbits. We found that the acquisition and retention of the memory in this task depend on the ipsilateral cerebellum in rats, similarly in rabbits. We also examined the cerebellar dependency in DBA/2 mice, which have an abnormal higher nervous system. DBA/2 mice showed a similar dependency on the ipsilateral cerebellum, which was different from the results reported in C57BL/6 mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：行動神経科学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：脳・神経系の情報処理、学習、記憶、階層性、代償性

1. 研究開始当初の背景

瞬目反射条件付けは、音（CS）とまぶたへの侵害刺激（US）の組み合わせにより、音を聞くだけでまぶたを閉じるようになる（条件応答：CR）連合学習である。この学習は主にウサギを用いた実験から、その構成要素となる下位神経回路が比較的良くわかっていることが特徴である。この単純な運動反射の獲

得および維持には小脳および脳幹が最も重要な役割を果たし、さらに、CSとUSの時間関係を変えるだけで海馬を含むに対する依存性が増大することが報告されている。

しかしながら、これまで行ってきた小脳機能に障害を持つミュータントマウス（GluRδ2欠損マウス）の実験から、少なくともマウスにおいては、従来ウサギを用いた実験結果に

基づいて提唱されてきた小脳依存的な学習メカニズム以外に、小脳にそれほど依存せず、上位中枢に大きく依存して学習するメカニズム（代償的学習メカニズム）が存在する可能性が出てきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでマウスにおいて見出してきた小脳依存的な学習メカニズムと小脳非依存的な学習メカニズム（学習メカニズムの多重性）の詳細を検査することを目的としている。

3. 研究の方法

マウスおよびラットを用いて、学習前もしくは学習後（記憶獲得後）に小脳を部分的に破壊し、回復後に瞬目反射条件付けにおける学習能力および記憶保持能力を検査した。

4. 研究成果

(1) ラットにおける同側小脳依存性の検討

①背景

近年、同側小脳以外の領域にも瞬目反射学習の記憶痕跡が存在する可能性が指摘され始め、記憶痕跡の場所を再検討する必要性が出てきた。本研究では、ラットを用いて、条件応答(CR)および瞬きのタイミングにおける同側小脳の役割を検査した。本研究では、学習前に小脳半球を破壊した動物の学習能力を調べるとともに、学習後（記憶獲得後）に小脳半球を除去した場合の影響も調べた。

②方法

学習前破壊実験（記憶獲得）では、条件付け前に同側小脳を吸引除去し、3週間の回復期間の後7日間条件付けを行って学習能力への影響を検査した。また、対照群（偽手術群：sham）および小脳破壊群ともに、ランダムに刺激提示する偽条件付け (unpaired conditioning) も行った。

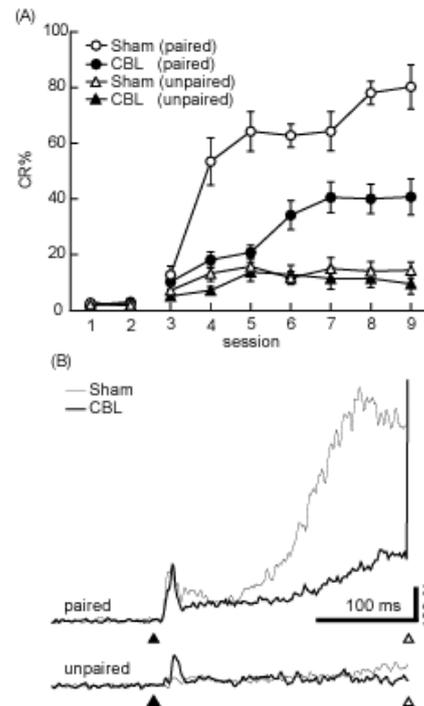
学習後破壊実験（記憶保持）では、あらかじめ7日間の条件付けを行い、その後、良く学習したラットの同側小脳を除去し、3週間の回復後に再度条件付けを行って、記憶保持と再学習能力を検査した。

③結果

1) 学習前小脳半球破壊の影響

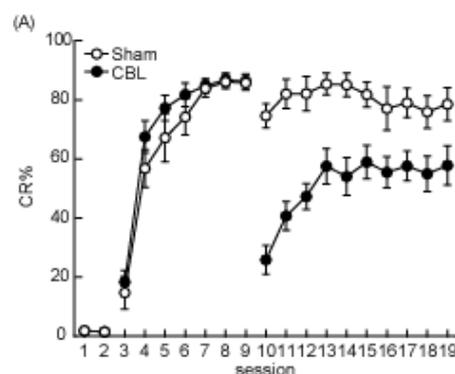
記憶獲得の小脳依存性を調べる実験では、小脳破壊群 (CBL 群) は対照群 (sham 群) よりも学習率は低いものの、ある程度は学習することが明らかとなった。また、偽条件付けにおいて小脳破壊群および対照群ともに学習しなかったことから、今回用いた条件下での記憶獲得は、音に対する驚愕反応の小脳半球除去による増強などの非連合的学習ではないことが示唆された。

さらに、小脳破壊群が獲得した CR のタイミングは偽手術群と比べて差は認められなかった。



2) 学習後小脳半球破壊の影響

獲得した記憶の保持における小脳半球の役割を調べる実験では、破壊前 (session 9) と比べ再条件付け初日 (session 10) の学習率が大きく低下することが明らかとなった。この再条件付け初日 (session 10) の学習率は、破壊前の条件付け初日 (session 3) の学習率とは有意な差は認められなかった。この結果は、同側小脳破壊により破壊前に獲得した記憶の保持が強く障害されることを示唆した。



しかしながら、その後条件付けを繰り返すことにより小脳破壊群はある程度まで再学習し (session 10-19)、また再獲得した CR のタイミングは sham 群と比べて差が認められなかった。

④考察

以上の結果から、ラットにおいては、intactの状態では、ウサギと同様に同側小脳に依存して記憶を獲得し、また、その記憶を保持していることが明らかとなった。しかしながら、ウサギでの報告とは異なり、同側小脳半球がない状態においても、ある程度は記憶を獲得することが可能であり、また、獲得したCRのタイミングも正常であることが明らかとなった。この事は、ラットにおいても瞬目反射条件付けの学習メカニズムが複数あり、小脳が障害を受けた場合には小脳以外の領域（おそらくは上位中枢）に依存して学習することが可能であることを示唆している。従って、これまでマウスにおいて見出してきた学習メカニズムの多重性は、動物種を越えて一般性を持つことが強く示唆された。

(2) 上位中枢に障害を持つマウス (DBA/2 マウス) における同側小脳依存性の検討

①背景

瞬目反射条件付けは、ウサギにおいては無条件刺激を提示する目と同側の小脳に依存することが報告されているが、C57BL/6 マウスには小脳依存のメカニズム以外の学習メカニズムが存在することが本研究室で見つかり、他の研究者による同様の報告もなされている。一方、海馬や前頭前野を含む上位中枢に機能不全を持つDBA/2マウスはウサギと同様に同側小脳除去により学習が障害されることを示唆する結果を得ている。そこで、このDBA/2マウスを用いて、マウスにおける小脳依存のメカニズムをさらに詳細に検討した。

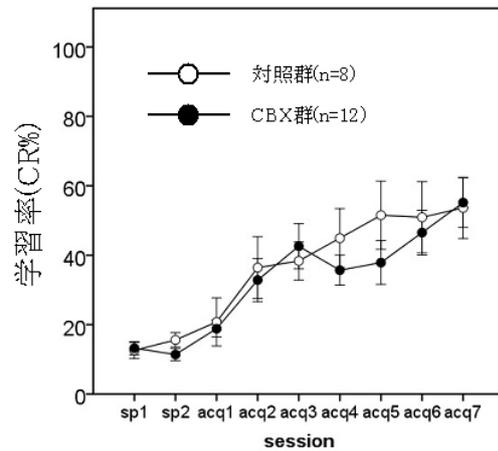
小脳の主な解剖学的構造としては小脳皮質と小脳核がある。ウサギにおいて小脳皮質 (lobule HVI) は瞬きのタイミングに関与し、一方、小脳核は学習の獲得に関与すると考えられている。そこで、DBA/2マウスのそれぞれの小脳領域を局所的に破壊し、学習への関与を調べた。

②方法

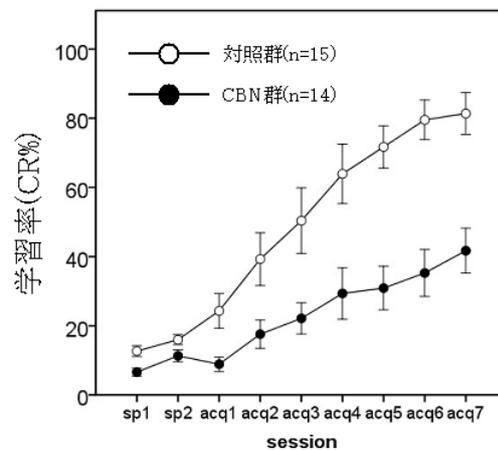
局所破壊は学習前に行い、条件付ける目と同側の小脳皮質 (CBX 群) もしくは小脳核 (CBN 群) を電気破壊した。対照群のマウスには破壊手術を施さなかった。また、条件付け課題として、音 (90 dB, 1 kHz, 350 ms) とまぶたへの刺激 (100 Hz, 100 ms) による遅延課題を用いた。

③結果

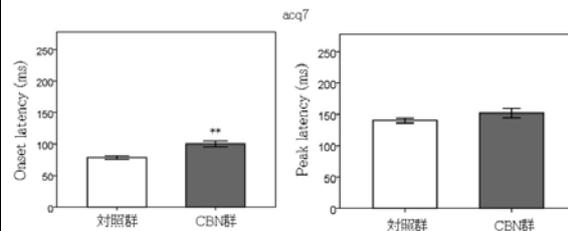
小脳皮質破壊群では、対照群と比較して学習率および瞬きのタイミングに違いはなかった。



一方、小脳核破壊群は顕著な学習障害を示した。



さらに、瞬きのタイミングの異常を検討したところ、瞬き開始時刻 (onset latency) に有意な差が認められた。



組織学的解析に基づき、小脳核破壊群を吻側破壊群、吻側+尾側破壊群に分けて解析したところ、onset latencyにおいて対照群との顕著な差が両群で確認できた。また、最も強く瞬きする時刻 (peak latency) においては、吻側破壊群のみ対照群との有意な差を示した。

④考察

本実験により、同側小脳皮質に比べて同側小脳核がマウスの瞬目反射条件付け学習に重要な役割を果たすことが明らかとなった。ウサギにおいては、HVI領域は瞬きのタイミ

ングに参与すると報告されていたが、DBA/2マウスのHVIを含む小脳皮質破壊ではタイミングへの影響は認められなかった。一方、吻側小脳核破壊により瞬きのタイミングへの影響が認められた。したがって、吻側小脳核が学習の獲得と瞬きのタイミングに重要な役割を果たすことが示唆された。

今回の結果は、上位中枢に異常を持つDBA/2マウスは、正常なC57BL/6マウスとは異なり、ウサギと類似の学習メカニズムを持つことを示唆している。今後、DBA/2マウスの神経機構を詳細に調べることにより、小脳・脳幹にある基本的学習回路の解明が進むことが期待される。また、同時に上位中枢が正常なC57BL/6の学習メカニズムと比較解析することにより、小脳以外の領域(上位中枢)に対する依存性が高い学習メカニズムの詳細を明らかにすることが出来ることが期待される。

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2件)

- ① Shigenori Kawahara, Erasing fear memories - key receptor and essential time frame discovered. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32:1-2 (2011)、査読有
- ② Takahiro Horiuchi, Shigenori Kawahara, Effects of ipsilateral cerebellum ablation on acquisition and retention of classically conditioned eyeblink responses in rats. *Neuroscience Letters*, 472:148-152 (2010)、査読有

[学会発表] (計11件)

- ① 臼井弘児、Image analysis of eyeblink conditioning in mice、Society for Neuroscience、2011年11月16日、Washington DC, USA.
- ② 臼井弘児、拘束下マウスにおける古典的瞬目反射条件付けの画像解析、海馬と高次脳機能学会、2011年10月8日、金沢
- ③ 中村陽一、Eyeblink conditioning in DBA/2 mice depends on the ipsilateral cerebellar nuclei、日本生物物理学会、2011年9月18日、姫路
- ④ 佐藤大地、同側小脳破壊マウスにおける瞬目反射条件応答の獲得と表出へのNMDA受容体の関与、日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜
- ⑤ 川原茂敬、文脈依存的瞬目反射弁別学習における海馬シータ波依存性、海馬と高次脳機能学会、2010年11月21日、金沢

⑥ 堀内嵩大、ラット瞬目反射学習における同側小脳と対側小脳の役割の違い、日本生物物理学会、2010年9月21日、仙台

⑦ 川原茂敬、マウス瞬目反射条件づけに見られる学習メカニズムの多重性(招待講演)、日本薬学会、2010年3月29日、岡山

⑧ Shigenori Kawahara、Roles of the prefrontal cortex and the cerebellum in mice eyeblink conditioning (招待講演)、日本生物物理学会、2010年11月1日、徳島

⑨ Shigenori Kawahara、Dependence on the cerebellum and the medial prefrontal cortex in mouse eyeblink conditioning、Society for Neuroscience、2009年10月18日、Chicago, USA.

⑩ 川原茂敬、マウス瞬目反射条件付けにおける小脳および内側前頭前野依存性、日本神経科学大会、2009年9月18日、名古屋

⑪ 臼井弘児、マウスにおける痕跡課題瞬目反射条件付けの画像解析、日本神経科学大会、2009年9月18日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 茂敬 (KAWAHARA SHIGENORI)

富山大学・大学院理工学研究部

(工学)・教授

研究者番号：10204752