

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590068

研究課題名(和文)サル瞬目反射条件付けに伴う脳内変化のPETによる検出と解析

研究課題名(英文) An Attempt to Detect a Neural Activity Change during Eyeblink Conditioning in Monkeys with PET Imaging

研究代表者

桐野 豊 (KIRINO, YUTAKA)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：10012668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：サルの瞬目反射条件付け(EBC)に伴う神経活動変化のPETによる検出を試みた。まず、サルのEBC計測システムを初めて開発した。この系を用いて、サルでは覚醒レベルにかかわらず潜在学習が行われることを初めて示すことができた。並んで、EBCに必須のカンナビノイド受容体サブタイプ1(CB1R)のPETイメージングを目指して、CB1R特異的PETリガンド[¹¹C]CB-119の前駆体を合成した。これをサルに投与して、PET画像を取得し、得られた画像がCB1Rの活動を反映したものであることの検討を行った。しかし、サルおよびPET試薬が高価であるため、十分な量の実験を行うことができず、今後の課題となった。

研究成果の概要(英文)：We developed a system which enables us to measure eyeblink conditioning in a monkey species (*Macaca mulatta*) with a brain size suitable for PET imaging. Eyeblinking was monitored simultaneously by orbicularis oculi electromyographic measurements and a high-speed camera. This system based on the two different principles yielded an interesting finding that the probability of observing a conditioned response in a given trial was not influenced by whether the monkeys closed their eyelids just before conditioned stimulus, suggesting that this memory could be expressed independently of wakefulness. We tried to gain PET imaging using a selective agonist cannabinoid-1 receptor tracer [¹¹C]CB-119. However, the attempt was not completed due to the limited availability of expensive animals and PET ligands. Nevertheless, this study presents a novel system for cognitive assessment in monkeys that will be useful for elucidating the neural mechanisms of implicit learning in nonhuman primates.

研究分野：神経科学

キーワード：生物物理化学 瞬目反射条件付け 学習・記憶 サル PET

1. 研究開始当初の背景

瞬目反射条件付け (eyeblink conditioning, EBC) は、関与する神経回路が脊椎動物の学習系として最も詳細に同定されているものである。それを裏付ける知見のほとんどは、脳の部分的損傷実験、あるいは脳機能分子のノックアウトによる「破壊実験」の結果に基づいており、実際に学習の過程でどの部位がどのように活動しているのかについてはほとんど検証されていない。すなわち、破壊実験法においては、脳のある領域を破壊後にも学習が可能であることが示された場合、その領域は学習に必須ではないと結論されるが、intact 動物が学習するときその領域を使っていないという証拠にはならない。一例を挙げると、遅延瞬目反射条件付け (delay eyeblink conditioning) は海馬が無くても可能であるが、intact 動物が遅延条件付け学習を行っているときに海馬が活発に活動していること (電気生理学的知見) また、変調を来した海馬の存在は学習を妨げることが示されている。従って、「破壊実験」のみでは学習・記憶の神経機構を解明することはできず、動物が学習を行うときに脳のどの部位がどのように活動しているかを観測することが必須である。

学習中の動物の脳内神経活動を非侵襲的に計測する方法としては電気生理学的方法があるが、これは、特定の領域の少数の神経細胞活動を記録するものであり、より広範な神経回路レベルの活動の計測は不得意である。これに対し、近年発展が著しい3次元イメージング法である、機能的MRI (functional magnetic resonance imaging) と PET (positron emission tomography) が有用性を増しつつある。PETの方が高感度であり、目的にかかわらず、装置が大掛かりであり、設置されている施設も数少ない。中でもサル用のPET装置を備えているのは、浜松ホトニクス社のみである。本研究の開始前に、浜松ホトニクス社に対して研究意義や方法を説明し、協力を得られることとなった。

2. 研究の目的

本研究は、アカゲザルを対象として、学習を行うときに脳のどの部位がどのように活動しているかを観測することにより、学習・記憶の神経基盤を解明しようとするものである。動物個体の脳の活動を非侵襲的に計測する方法として、陽電子放射断層撮影法 (Positron Emission Tomography, PET) は優れている。そこで、浜松ホトニクス社のPETの専門家と協議した結果、脳のサイズの大きいサルを対象とすれば、瞬目反射条件付け (eyeblink conditioning, EBC) の学習の獲得、消去、再学習などに伴う脳内活動変化を検出できる可能性があるかと推察されたので、本研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) サルに対する瞬目反射条件付けシステムの確立

無麻酔のサルに、EBCを行うことができる実験システム(ハードウェア、ソフトウェア)を開発する。

(2) PETイメージングとして、どのようなPETプローブを用いて何を観ればよいか過去のデータ等を検討した結果、EBCに必須の分子である、カンナビノイド受容体サブタイプ1 (CB1R) に対するアゴニストをプローブとして、CB1Rの活動を観測することとした。実験は、浜松市の浜松ホトニクス株式会社PETセンターにて行う。

4. 研究成果

(1) 1年目(平成24年度)

まず、我々はアカゲザル (*Macaca mulatta*) を対象とした「瞬目反射条件付け (EBC) 課題遂行中のサル脳内PET計測システム」を独自に開発した。このシステムを用いて、無麻酔のアカゲザルに対して瞬目反射遅延条件付け実験法を確立した。条件応答 (Conditioned Response, CR) としての瞬目の検出には、鈴木 (浜松ホトニクス) らが開発した高速ビデオカメラを用いた「Intelligent Vision Sensor」法と、岸本 (徳島文理大学)・山本 (浜松ホトニクス) らが開発した、瞼の筋電位を測定する方法 (Kishimoto et al., 2001) を比較し、それぞれの特長を明らかにした。具体的には、両方法とも再現性良く条件応答 (CR) を検出できたが、筋電位方式の方がEBCをより鋭敏 (より早期) に検出できた。このシステムを用いて、これまで全く報告の無かった「サルのdelay eyeblink conditioning」に初めて成功した。すなわち、瞬目反射遅延条件付けを4匹のアカゲザルに対して行い、十分な検討を加えて、信頼性の高いデータ取得に成功した。これらの結果は、平成25年6月に開催された日本神経科学学会大会にて発表を行ない、多くの聴衆を得た。

また、PETによる神経伝達物質受容体イメージングの準備を行った。我々は、げっ歯類において瞬目反射条件づけの学習成立に重要であることが示されている、内在性カンナビノイド (エンドカンナビノイド) シグナリング (eCB) に特に着目した。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eCB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eCB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)。eCBの役割をサルで確

かめ、これがサルにおいても EBC に重要であることがわかれば、脳内で eCB の PET プローブで学習前後の受容体の機能変化を明らかにすることが可能であると考えた。CB1R を介したカンナビノイド信号系が EBC 遅延課題に必須であることは、CB1R-KO マウスを用いた岸本らの実験等により明らかにされており、社会的重要性も高い(Kishimoto and Kano, 2006)。そこで、本研究では、CB1R を対象として、瞬目反射条件付け (EBC) 課題遂行中のサル脳内 PET 計測を確立するために、CB1R 特異的な PET リガンド、 $[^{11}\text{C}]$ CB-119 の前駆体の合成を行った。これをサルに投与して、PET 画像を取得し、PET 画像取得の最適条件を検討した。

(2) 2 年目 (平成 25 年度)

昨年度に確立した「サル瞬目反射条件づけシステム」を用いて得られたデータを詳細に解析した。この学習では、拘束された上で報酬が与えられるわけではなく、何ら自発的な行動も取る必要もないので、サルは条件づけ実験中、しばしばまどろむことがあったが、我々はあえてサルを起こさずにそのまま実験を続行した (通常の人間の学習実験であれば被験者を起こすか、実験を中止する)。その結果、我々はサルが明らかにうとうととしている状態 (目を閉じている状態) であっても、CS が与えられると瞼がぴくりと動く現象 (CR) が頻繁に生じることに気づいた。そこで、さらに我々は、CS を与える直前にサルが目を閉じていたか否かで、CR の発現率に変化があるかどうかについてデータを再調査することにした。結果として、驚くべきことに、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)。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初めて示したものであり、顕在記憶と潜在記憶を分ける意識の境界線がアウェアネスの有無にあるという従来の定説に、ある意味再考を促すものとなった。この結果を受けて、我々はさらにサルを多数使った行動実験に進もうとしたが、本研究は、浜松市の浜松ホトニクス (株) の研究協力者と私どもの共同研究であり、実験は、研究分担者等が浜松市に出張して、1 週間から 10 日間連続で行う必要がある。そのため、浜松ホトニクス (株) の研究協力者と当方の都合、及び、サルの供給状態の 3 拍子揃ったところで実験を開始する必要があるが、当該年度はその条件が整わず、残念ながら、これ以上は実施されずに終了した。その間、これまでのデータの整理と論文原稿執筆を行い、また、本研究の基盤となる実験を、マウスを用いて行った。具体的には、マウスに対して、学習、および消去試行を繰り返すことにより、何度もほぼ同一の学習-消去曲線が得られることと、CB1R アンタゴニストである Rimonabant

の投与は、この繰り返しの学習試行における CR 獲得を再現性良く障害させることを明らかにした。

(3) 3-4 年目 (平成 26, 27 年度)

高速ビデオカメラ方式により、まどろみ状態のサルにおいても、明確に開眼している状態と同様に EBC が行われることを発見した結果を、国際学術誌である PLOS ONE で発表した (Kishimoto et al., 2015)。本成果は、一般新聞紙上でも紹介された (睡眠学習も夢じゃない!? 読売新聞 2015 年 9 月 8 日、サル睡眠中も条件反射解明 毎日新聞 2015 年 7 月 7 日)。

EBC に必須の分子であるカンナビノイド受容体サブタイプ 1 (CB1R) の PET リガンド $[^{11}\text{C}]$ CB-119 の前駆体を合成し、その PET 画像を取得したものの、それが CB1R に特異的な画像であることを示す必要がある。CB1R のアンタゴニストを用いて、その結合サイトの特異性の検討を行ったが、十分な特異性を得ることができず、これ以上の PET 計測実験の進展には、大量の実験を必要とすることが判明した。そこで、サルの薬理実験に注力することにしたが、これらの実験においても、マウスのように多数の動物を利用することは困難 (使用できるサルの例数には限りがある) であることから、同一サル個体に繰り返し条件づけを行うことのできるパラダイムを探索した。その結果、5 回の学習試行-5 回の消去試行を繰り返しても再現性よく、ほぼ同一の学習曲線を得ることを確認できた。また、CB1 受容体拮抗薬である Rimonabant の投与は、それぞれの学習過程で障害を及ぼすことが確認された。本結果より、サルでも EBC に eCB が重要な役割を担っていることが示唆された。

ところで、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はなかった。そこで、eCB の EBC における分子メカニズムをさらに明らかにする意図のもと、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 (MGL) を欠損させたノックアウトマウスで、瞬目反射条件づけを解析した。その結果、MGL KO マウスでは、学習曲線に影響は見られなかったものの、消去に抵抗性が見られることが判明した。また、薬理的に 2-AG 合成酵素を失活させても同様に、瞬目反射条件づけ遅延課題の消去に障害が生じた。これらの結果は、少なくとも EBC の学習機構の少なくとも一部の過程に、2-AG が内在性カンナビノイドとしてはたらくしていることを示すものとなった。この結果の一部は、国際オープンアクセス誌に発表済みであり (Kishimoto et al., Front. Behav. Neurosc. 2015)、今後サルでも、内在性カンナビノイドとしての 2-AG の学習にお

ける寄与を確かめる契機となると考える。

(4) 結論

サルの EBC 実験系の開発に初めて成功した。この系を用いて、サルの覚醒レベルにかかわらず、潜在学習が行われることを初めて示すことができた。サル及び PET プローブが高価であることから、同一個体で繰り返し実験が可能である実験系を模索し、EBC の消去・再学習の繰り返し実験が有望であることを示した。しかしながら、当初の目標の達成にはさらに大量の実験を行う必要があり、これは、本研究で利用可能なリソースを大きく超えるもので、今後の課題である。

<引用文献>

Kishimoto Y, Kano M. Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. *J Neurosci.* 2006; 26: 8829–8837.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

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*, DOI: 10.1371/journal.pone.0129828, June 12, 2015.

Kishimoto, Yasushi; Cagniard, Barbara; Yamazaki, Maya; Nakayama, Junko; Sakimura, Kenji; Kirino, Yutaka; Kano, Masanobu, "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 (2015).

[学会発表](計 4 件)

Yasushi Kishimoto, Barbara Cagniard, Maya Yamazaki, Junko Nakayama, Kenji Sakimura, Yutaka Kirino, Masanobu Kano
「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」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.

桐野 豊、山本茂幸、鈴木一隆、豊田晴義、狩野方伸、塚田秀夫、岸本泰司「サルにおける瞬目反射条件付け: 筋電位測定法と高速イメージング法を用いた瞬目反射条件づけ方法の開発とその評価」第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会合同大会、2013 年 6 月 20 日-6 月 23 日、国立京都国際会館、京都市.

岸本泰司、Barbara Cagniard、山崎真弥、中山順子、崎村建司、桐野 豊、狩野方伸
「モノアシルグリセロールリパーゼ欠損マウスにおける海馬依存性記憶機能の包括的評価」第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会合同大会、2013 年 6 月 20 日-6 月 23 日、国立京都国際会館、京都市.

岸本泰司、山本茂幸、鈴木一隆、塚田秀夫、桐野 豊「高速ビデオカメラによるサル瞬目反射条件付けシステムの開発」第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日-9 月 24 日、名古屋大学、名古屋市.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

[その他]

新聞報道
睡眠学習も夢じゃない!? 読売新聞 2015 年 9 月 8 日
サル睡眠中も条件反射解明 毎日新聞 2015 年 7 月 7 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桐野 豊 (KIRINO, Yutaka)

徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号：10012668

(2)研究分担者

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

(3)研究分担者

窪田剛志 (KUBOTA, Takashi)
徳島文理大学・香川薬学部・助教
研究者番号：90412402

(4)連携研究者

山本茂幸 (YAMAMOTO, Shigeyuki)
浜松ホトニクス(株)・中央研究所・研究員
研究者番号：10382201

(5)連携研究者

鈴木一隆 (SUZUKI, Kazutaka)
浜松ホトニクス(株)・中央研究所・研究員
研究者番号：20394190