

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590133

研究課題名(和文)可逆的遺伝子機能制御による忘却の分子神経機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular/neural mechanisms for memory extinction by inducible and reversible gene expression

研究代表者

岸本 泰司(Kishimoto, Yasushi)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：90441592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬理学的手法に加え、Tet On/Off システムなどの可逆的遺伝子操作を組み合わせ、記憶が失われるという現象、すなわち“忘却(消去)”の分子・シナプス機構を解明することを研究目的とし研究を遂行した。学習行動の指標としては、主に人間と実験動物で共通の課題が適応できる「瞬目反射条件付け」を用いた。(1)記憶の短期消去メカニズムの解明、(2)記憶の短期消去メカニズムの解明、(3)脳神経疾患に起因する記憶消去メカニズムの解明、の3つのテーマに分け研究を行った。内在性カンナビノイドや代謝型グルタミン酸受容体が、(小脳依存性)瞬目反射条件づけの消去に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The neural mechanisms of memory extinction were investigated by using pharmacological analysis and various mouse models (inducible and reversible KO mice, Alzheimer's disease (AD) model mice, prion protein KO mice, KO mice of monoacylglycerol lipase (MGL), the major hydrolyzing enzyme of 2-AG, and so on). The main results obtained in the study are summarized in the following points: (i) To determine the sites for extinction of eyeblink memory in the cerebellum, we used mGluR1-conditional KO mice bearing inducible and reversible expression of mGluR1 specifically in cerebellar Purkinje cells (PCs). We found that extinction of eyeblink memory was slightly impaired without mGluR1 in PCs. (ii) MGL KO mice showed impaired extinction of eyeblink memory, though fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition significantly impaired memory acquisition. (iii) In the AD model mice, the impairment of trace memory acquisition preceded impairment of the memory extinction.

研究分野：行動遺伝学

キーワード：瞬目反射条件づけ 消去 内在性カンナビノイド 代謝型グルタミン酸受容体 運動学習 アルツハイマー病 プリオン 加齢発達

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者はパブロフ型の連合学習として知られる瞬目反射条件づけの研究を 10 年余に渡り一貫して研究してきた。近年ではある種のフォスファターゼや CB1 受容体といった機能分子が本学習獲得に必須であることを見出し(Kishimoto & Kano, J. Neurosci. 2006; Kakizawa *et al.*, EMBO. J. 2007; Kina *et al.* Eur. J. Neurosci. 2007)、また海馬や小脳の特定神経回路が記憶獲得に果たす機能も明らかにしてきた (Kishimoto *et al.*, J. Neurosci. 2006; Wada *et al.*, PNAS 2007, Miyata & Kishimoto *et al.*, J. Neurosci. 2011)。このように申請者は、これまでに瞬目反射条件づけ学習の「記憶獲得」における分子機構については相当程度明らかにしてきた。

(2) しかしながら、学習には記憶が獲得されるという事象のほかに、記憶が失われるという重要な過程が存在する。忘却は損なわれても逆に過剰にはたらいても、生活の質に深刻な影響を生む。この、一度獲得された瞬目反射条件付けの記憶が失われる分子機構については、未だ手がつけられていない状況にある。近年、記憶の消去に関しては、世界中の神経科学者の間で注目が高まりつつあり、特に恐怖条件付け記憶の消去については、心的外傷の文脈で大きなトピックスとなっている。しかしながら、忘却とは恐怖記憶のように強烈で忌避的な事象のみに起こるものではなく、むしろ中性的ないし好ましい記憶が失われることこそがしばしば大きな脅威となる。例えば、認知症の患者では、日常生活に必要、あるいは人生そのものに意味のある記憶が失われてしまうことこそが、自身のアイデンティティーに危機をもたらす。

2. 研究の目的

薬理学的手法に加え、Tet On/Off システムなどの可逆的遺伝子操作を組み合わせる手法により、記憶が失われるという現象、すなわち「忘却(消去)」の分子・シナプス機構を解明することを研究目的とした。学習行動の指標としては、特に人間と実験動物で共通の課題が適応できる「瞬目反射条件付け」を用いた。アルツハイマー病(AD)に代表される、健忘を症状とする脳神経疾患を克服する治療戦略の開発につなげることをも目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物: 野生型マウスに加え、可逆的 mGluR1 ON/Off マウス、AD モデルマウス、prion protein KO マウス、モノアシルグリセロールリパーゼ(MGL) KO マウスなどの各種遺伝子操作マウスを使用した。

(2) 使用薬物: mGluR1 antagonist, CB1 受容体 antagonist, 2-AG 分解酵素阻害薬、FAAH 分解酵素阻害薬等を使用した。

(2) 行動課題: 瞬目反射条件付けは、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連合学習である。一度学習した個体は、非常に長期間(数か月~1年以上)その記憶を良く保つが、CS のみを聞かせ続けると1時間以内に急速に CR の表出率を減少させていく。この現象がいわゆる実験的消去(extinction)である。この学習は、CS と US を同時に与える遅延課題では小脳依存的学习であるのに対し、CS と US に 500 ms の無刺激期間を置くトレース課題では海馬依存性の学習課題になることが知られている(Kishimoto *et al.*, J. Neurosci. 2001)。本研究では、トレース課題を人における陳述記憶のモデル、遅延課題を手続き的記憶のモデルとして用い、それぞれについて解析を行った。瞬きの定量的測定のために EMG 法を使用し、刺激としては電気刺激および空気刺激を用いた。学習を成立させ遺伝子発現の ON/OFF を切り替えた後、CS のみを与える消去試行を行った。また、他にモリス式水迷路試験や恐怖条件づけ、水探索学習など多様な行動パラダイムによる行動テストバッテリーも併用した。

4. 研究成果

(1) 記憶の短期消去メカニズムの解明<1>

瞬目反射条件付けの記憶は、成立後数ヶ月以上にわたって維持されるが、記憶成立直後に CS のみを聴かせると数十回程度で学習率が半以下にまで急速に低下する。この急速に消去される忘却を短期記憶の消去モデルとし、この機構を明らかにすることを試みた。具体的には、このタイプの消去に抵抗性あるいは亢進が見られるミュータントマウスを探索することにより、分子メカニズムを帰納した。内在性カンナビノイド 2-AG 分解酵素モノアシルグリセロールリパーゼ(MGL) KO において、瞬目反射条件づけの消去が障害されていること、また 2-AG 分解酵素の阻害薬で同様に消去が障害されることを示した。これらの結果は、内在性カンナビノイドの 2-AG が、小脳記憶をコントロールしていることを示すものとなった。なお、内在性カンナビノイドであるアナンナミド分解酵素阻害薬の投与によっては、瞬目反射条件づけの消去に影響はなく、学習獲得の亢進をもたらした。こうした研究結果は、複数の国際雑誌に発表または投稿中である(Kishimoto *et al.*, 2015, Front. Behav. Neurosci.)。

(2) 記憶の短期消去メカニズムの解明 1

小脳プルキンエ細胞(PC)の代謝型グルタミン酸 1 型(mGluR1)を特異的に欠失させることができる、「可逆的 mGluR1 ON/Off マウス」を用いて、瞬目反射条件づけの消去における mGluR1 の役割の検討を行った。手順

としは、学習成立後ドキシサイクリンを飲み水に混ぜて7週間投与したところ、続く消去課題で、学習率の有意な変化(障害)が認められた。このことから小脳皮質におけるmGluR1の発現は記憶の獲得とともに、消去においても重要な役割を果たしていることが考えられる。但しこの現象は mGluR1 antagonist である JNJ16259685 の投与では再現できなかったことを付記する。こうした研究結果については、現在複数の論文に投稿中および投稿準備中である。

(3) 発達・加齢による記憶の消去メカニズムの解明

申請者はこれまで適応が困難であった幼弱マウスに瞬目反射条件付けを行う手法を開発した(Miyata & Kishimoto et al., 2011)。この手法を用いて、野生型マウスに生後2週目で学習を行わせ、様々な薬理的・遺伝学的処置により adult (生後8週目) になってからその記憶が保持されているか、また改善されるかどうかを確かめた。その結果、一部の個体では、記憶が保持されていることが確認できたものの多くはCRの表出が見られなかった。この結果より、幼弱期の小脳記憶は、成体にまで引き継がれない(消去されてしまう)可能性が示された。また、8週齢の野生型マウスに対し、遅延課題およびトレース課題を条件づけ、記憶を成立させ、その後生涯にわたって飼育を行い、それぞれの課題に対し3か月後、6か月後、1年後の3時点で、どれだけ長期記憶が保持されているかをテストした。この実験は、加齢によって、手続き的記憶である遅延課題と宣言的記憶であるトレース課題のいずれがより早く忘却しやすいかを調べる意図のものである。その結果、遅延課題では1年後でも約70%の記憶が保持されていたのに対し、トレース課題では30%程度まで落ちることが明らかになった。これらの研究結果は、現在雑誌に投稿準備中である。

(4) 脳神経疾患に起因する記憶消去メカニズムの解明<1>

認知症の良いモデルと考えられる APP の変異モデルマウスを用い、APP 代謝経路に焦点を当て、その忘却の分子機構を明らかにし、さらにこの異常を改善する方法論を探索する。AD モデルマウスとしては APP と presenilin に変異が挿入された幾種かのマウス(Tg255/PS2Tg 等)を用いた。まず、これらの AD モデルマウスにおいて、様々な月齢で、遅延およびトレース課題の学習障害および消去の障害の有無を観察した。この結果、Tg2576 マウスでは約6ヶ月齢で、ダブルトランスジェニックマウスでは約4ヶ月齢でトレース課題の学習障害が顕れることが明らかになった。また、トレース課題消去の亢進については、前者は約8ヶ月、後者は約5ヶ

月で表出された。すなわち、AD モデルマウスでは瞬目反射条件づけの獲得の方が、消去の異常に先行して表れることが明らかとなった。なお様々な薬物を与えて、これら学習や消去の障害を回復させるかどうかについても検討を行った。AD 治療薬であるメマンチンの投与により、学習および消去双方の改善を見ることが明らかとなった。これらの結果の一部は国際雑誌にて発表済みである(Kishimoto et al., Neurosci. Lett. 2012; Kishimoto and Kirino, Brain Res. 2013)。

(5) 脳神経疾患に起因する記憶消去メカニズムの解明<2>

正常型プリオンタンパク質の認知機能への関与を発見した。クロイツフェルト・ヤコブ病を代表とするプリオン病は、痴呆を主な症状とする脳の病気で、体の中に通常存在している「正常型」プリオンタンパク質が、「異常型」に変化することで発症すると考えられてきた。しかし、正常型プリオンタンパク質そのものの生理的役割(特に認知機能に関する生理機能)は多くが不明なままであった。そこで、我々は、遺伝子操作により正常型プリオンタンパク質が全く合成されないマウス(PrP KO マウス)に対して、小脳が重要な役割を果たす運動の記憶能力を瞬目反射条件付けの実験系により調べた。まず、野生型マウスに音の合図を聞かせた一定時間後に目の周辺に電気刺激を与えると、1週間後には、その音を聞いただけで、約7割のマウスが正しいタイミングでまばたきをするようになったのに対し、PrP KO マウスでは3割以下にとどまった。この結果は、正常型プリオンタンパク質が無いと、新しい運動パターンを正確に覚えられなくなることを示すものとなった。本研究は、正常型プリオンタンパク質そのものが、運動の記憶に必要であることを初めて示すものであり、プリオン病による認知機能障害に新たな視点をもたらすものとなった。ただし、記憶の消去についてはこのミュータントマウスで異常は見られず、本結果よりは瞬目反射条件づけにおける記憶の獲得と消去は異なる分子基盤によることが示唆された。本結果は国際誌にて発表済みであり(Kishimoto et al., 2013, PLOS ONE)、また成果の一部は朝日新聞科学欄(2013年4月18日)でも紹介された。

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)

岸本 泰司、山本 茂幸、鈴木 一隆、豊田 晴義、狩野 方伸、塚田 秀夫、桐野 豊、Implicit memory in monkeys: Development of delay eyeblink conditioning system with parallel electromyographic and high-speed

video measurements. PLOS ONE、査読有、印刷中
doi: 10.1371/journal.pone.0129828

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、Task-specific enhancement of hippocampus-dependent learning in mice deficient in monoacylglycerol lipase, the major hydrolyzing enzyme of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*、査読有、Vol.9、2015、Article 134、doi: 10.3389/fnbeh.2015.00134

大谷 義昭、宮田 麻理子、橋本 浩一、橋田端 俊英、岸本 泰司、深谷 昌弘、加勢 大輔、葛西 秀俊、中尾 和貴、平田 たつみ、渡辺 雅彦、狩野 方伸、饗場 篤、The synaptic targeting of mGluR1 by its carboxyl-terminal domain is crucial for cerebellar function、*Journal of Neuroscience*、査読有、Vol.34、No.7、2014、pp.2702 - 2712、doi: 10.3389/fnbeh.2015.00134

岸本 泰司、桐野 豊、Presenilin 2 mutation accelerates the onset of impairment in trace eyeblink conditioning in a mouse model of Alzheimer's disease overexpressing human mutant amyloid precursor protein. *Neuroscience Letters*、査読有、Vol.538、2013、pp.15 - 19、doi: 10.1016/j.neulet.2013.01.025.

日浅 未来*、磯田 裕美子*、岸本 泰司*、齋藤 健太、木村 康明、金井 求、柴崎 正勝、畠山 大、桐野 豊、葛原 隆 (* equal contribution)、Inhibition of MAO-A and stimulation of behavioural activities in mice by the inactive prodrug form of the anti-influenza agent oseltamivir. *British Journal of Pharmacology*、査読有、Vol.169、No.1、2013、pp.115 - 129、doi: 10.1111/bph.12102.

岸本 泰司、東原 絵里奈、福田 明子、長尾 明、桐野 豊、Early impairment in a water-finding test in a longitudinal study of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Research*、査読有、Vol.1491、2013、pp.117 - 126、doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.066.

岸本 泰司、奥 郁子、西川 あつ子、西本 晶子、桐野 豊、Impaired long-trace eyeblink conditioning in a Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*、査読有、Vol.506、No.1、2012、pp.155 - 159、doi: 10.1016/j.neulet.2011.10.071.

〔学会発表〕(計 17 件)

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 134 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還流の影響」日本薬学会第 134 年会、2015 年 3 月 25 日-3 月 28 日、神戸学院大学、神戸市。

桐野 豊、岸本 泰司「Accelerated impairment of learning and memory by presenilin 2 mutation in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease」*Neuroscience 2014* (北米神経学学会)、2014 年 11 月 15-19 日、Washington, DC, U.S.A.

岸本 泰司、宍戸 肇、河井 信行、上野 正樹、窪田 剛志、田宮 隆、桐野 豊「アルツハイマー病モデルマウスの認知機能に対する外傷性脳損傷の影響」第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日-9 月 13 日、パシフィコ横浜、横浜市。

柿澤 昌、岸本 泰司、宮崎 太輔、田中 碧、村山 尚、渡辺 雅彦、飯野 正光、竹島 浩「新規カルシウム放出機構一酸化窒素依存的カルシウム放出の小脳運動学習消去機構への関与」第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日-9 月 13 日、パシフィコ横浜、横浜市。

岸本 泰司、宍戸 肇、窪田 剛志、上野 正樹、田宮 隆、河井 信行、桐野 豊「アルツハイマー病モデルマウスの認知機能に対する外傷性脳損傷の影響」日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日-3 月 30 日、熊本大学、熊本市。

岸本 泰司、廣野 守俊、新 竜一郎、坂口 末廣、吉岡 亨、片峰 茂、窪田 剛志、桐野 豊「アルツハイマー病およびプリオン病モデルマウスを用いた瞬目反射条件付けの解析」第 2 回香川大学・徳島文理大学合同 神経研究 EXPO、2013 年 3 月 14 日、香川大学医学部、香川県三木町。

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。

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、松村 政久、佐藤 加奈、長井美佳、桐野 豊「PS2Tg2576 アルツハイマーモデルマウスの認知機能障害に対するメマンチンの効果」第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師中国四国支部学術大会、2013 年 10 月 26 日-10 月 27 日、松山大学、松山市。

岸本 泰司、窪田 剛志、桐野 豊、穴戸 肇、田宮 隆、河井 信行、上野 正樹「外傷性脳損傷に伴うアルツハイマー病誘発の分子機構の解明」第 6 回特色のある教育・研究全学発表会、2013 年 10 月 11 日、徳島文理大学香川キャンパス、さぬき市。

穴戸 肇、河井 信行、岸本 泰司、桐野 豊、田宮 隆「3xTg mouse を用いた頭部外傷後の認知機能の変化」第 36 回日本脳神経外傷学会、2013 年 3 月 8 日-3 月 9 日、ウインクあいち(愛知県産業労働センター)、名古屋市。

桐野 豊、岸本 泰司「アルツハイマー病モデルマウスにおける瞬目反射条件付けの解析」第 4 回日本生物物理学会中国四国支部大会、2012 年 6 月 14 日-5 月 15 日、山口大学、山口市。

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。

岸本 泰司、「Development and application of classical eyeblink research (瞬目反射条件付け研究の展開と応用)」Physical Concepts of Medical Science Symposium. 2012 年 5 月 19 日、Kaohsiung Medical University (高雄医科大学), Kaohsiung (高雄), Taiwan (台湾)。

桐野 豊、奥 郁子、西川 あつ子、西本 晶子、岸本 泰司、「Impaired long-trace eyeblink conditioning in an aged Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease」Neuroscience 2012 (北米神経学学会)、2012 年 10 月 13-17 日、New Orleans Morial Convention Center, New Orleans, USA。

岸本 泰司、穴戸 肇、河井 信行、桐野 豊「外傷性脳損傷に伴うアルツハイマー病誘

発の分子機構の解明」第 5 回特色のある教育・研究全学発表会、2012 年 10 月 19 日、徳島文理大学 25 号館メディアラウンジ、徳島市。

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
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.html>

http://sky.geocities.jp/kis_cosmo/kis_publication2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 泰司 (KISHIMOTO, Yasushi)

徳島文理大学・薬学部・准教授

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：