

審査の結果の要旨

氏名 宮本 大祐

覚醒時には、様々な感覚情報や運動情報を受容する。触覚は、五感の中でも特に運動と強く関連している。触覚の受容には、出力領域である運動皮質と入力領域である感覚皮質の連携が重要であると考えられる。実際、触覚の主要な入力領域である体性感覚皮質は、運動皮質と相互投射しており、運動皮質-体性感覚皮質間の情報連絡が注目されている。覚醒時に受容した情報を記憶するには、睡眠が重要である。睡眠時には、外部入力による攪乱を受けないため、機能の異なる脳領域間が、脳本来のリズムで同期して活動して情報を処理する。そのため、「触覚記憶は睡眠時に運動皮質と体性感覚皮質間の情報連絡により固定化される」、との仮説が考えられる。しかし、触覚記憶の固定化機構は殆ど解明されていない。これは、マウスの触覚学習・記憶試験には、複数回のトレーニングを要してきたことが主な原因として挙げられる。複数回のトレーニングを行うと、実験効率が低だけでなく、2回目以降のトレーニング後に記憶の再固定化と不安定化過程が混入するため、記憶の固定化に焦点を当てることができない。また、睡眠による記憶固定化の研究の多くは、睡眠時に人為的な刺激を与えることにより検討されてきた。そのため、自然な睡眠時に、脳のどの様な自発活動が記憶を固定化するかは、良く分かっていない。そこで、本研究は1回のトレーニングで成立する触覚学習・記憶試験を開発し、睡眠時における自発的な運動皮質と体性感覚皮質間の情報連絡が触覚記憶に果たす役割を解明することを目的とした。

1回のトレーニングで成立する触覚学習・記憶試験の開発

1回のトレーニングで触覚記憶を成立させるために、マウスが新奇性のある物体を選好する性質を利用した。触覚手がかりとして床を利用し、物体を床面により弁別させる物体-床面認識試験を開発した。箱の中に平坦な「つるつる」又は平行のスリットを有する「でこぼこ」の白いプラスチック板を敷き、それぞれの床上に1個の物体を設置した。そして、マウスが各床上の物体を探索する時間を比較した。

1日目に「つるつる」と「でこぼこ」の床の上を自由探索させると、床の選好性は生じなかった。2日目に同じ床のペアを自由探索させた場合も、床の選好性は生じなかった。即ち、マウスは、両床の経験の有無が一致している場合、床の選好性を有さないと考えられる。次に、1日目の床を左右共に「つるつる」にして、2日目の床を「つるつる」と「でこぼこ」にすると、「でこぼこ」の床に選好性が生じた。1日目の床を左右共に「でこぼこ」の床にして、2日目の床を「つるつる」と「でこぼこ」の床にすると、「つるつる」の床に選好性が生じた。なお、硬さの異なるゴムシートを用いた場合も、2日目において、新奇床への選好性が生じた。これらのことより、マウスはトレーニング時の床を学習・記憶し、テスト時に新奇床を弁別していると考えられた。

床が触覚手がかりではなく、視覚手がかりとなっている可能性を検討した。そのために、暗下

において実験を行った。暗下においても、マウスは新奇床に選好性を示したので、床は視覚手がかりではなく、触覚手がかりであると考えられる。つまり、今回開発した物体-床面認識試験は、触覚記憶を評価することができる。

触覚学習に関与する神経回路

物体-床面認識試験に関与する大脳皮質の領域の解明を試みた。後肢刺激に対して応答する領域である一次性感覚皮質 (S1) 及び二次運動皮質 (M2) の物体-床面認識試験への関与を検討した。S1 は、触覚情報の主要な入力領域である。運動の企画や準備に関与する高次領域である M2 は感覚野の活動を調節する役割が考えられている。この S1 と M2 は長距離投射を介して、相互に投射している。

神経活動を操作するために、光活性化型のプロトンポンプであるアーキドロプシン T (ArchT) を用いた。ArchT は緑色光の照射のタイミングに応じて、高い時間精度で、神経活動を強力かつ可逆的に抑制できる。S1 又は M2 にアデノ随伴ウイルスを注入し、ArchT を S1 の細胞体又は M2-S1 経路の軸索に発現させた。そして、S1 を光照射することにより、S1 又は M2-S1 経路の活動を抑制した。

1 日目のトレーニング時に S1 の神経活動を抑制すると、2 日目の新奇床への選好性が阻害された。これより、物体-床面認識試験は触覚依存的な学習であることが支持される。トレーニング時に M2-S1 経路の活動を抑制した場合も、2 日目の新奇床への選好性が阻害された。S1 や M2-S1 経路の活動を抑制すると、トレーニング時に床の触覚を認識できないために、テスト時にどちらが新奇の床であるかを弁別できていないと考えられる。これより、高次領域から感覚野へのトップダウン入力が触覚記憶の獲得に必要であることが示唆された。

マウスは、物体-床面認識試験において、触覚手がかりである床だけではなく物体に対しても触覚を生じる。S1 が物体を用いた記憶試験全般に関与するのか、触覚手がかりを用いた記憶に選択的に関与するのかを検討した。そのため、視覚手がかりを利用して物体を弁別する物体-位置認識試験を行った。物体-位置認識試験は、新奇位置に移動した物体に対する選好性を評価する。トレーニング時の S1 の神経活動の抑制は、2 日目の新奇位置の物体に対する選好性に影響を与えなかった。すなわち、S1 は物体-位置認識試験の学習に関与していなかった。これらは、S1 が物体の有する新奇性全般の認識に関与するのではなく、触覚手がかりを用いた学習に選択的に関与することを示唆する。

触覚記憶の固定化機構

一回のトレーニングで成立する触覚記憶の開発に成功したので、次に、触覚記憶の固定化機構の解明に取り組んだ。まず、新規に開発した物体-床面認識試験と従来の学習・記憶試験が、記憶の固定化において、共通した分子機構を有するかどうか検討した。記憶の素過程であるシナプス可塑性に重要な NMDA 型グルタミン酸受容体に着目した。NMDA 受容体の選択的阻害薬である CPP をトレーニング直後に皮下投与すると、触覚記憶の固定化が阻害された。CPP をテスト 60 分前に投与しても、触覚記憶の想起に影響を与えなかった。これらのことより、触覚記憶は、NMDA 受容体依存的に固定化されると考えられる。つまり、物体-床面認識試験と従来の学習・記憶試験は、記憶の固定化において、少なくとも一部共通した分子機構を有していると考えられた。

マウスの睡眠時間は1日約12時間である。触覚記憶の固定化への睡眠の関与を検討した。目視でマウスの不動状態を判定して、不動状態の際に、断眠処置を行った。トレーニングの0-0.5時間後、6-7時間後の断眠処置は記憶の固定化に影響を与えなかった。トレーニングの0-1時間後の断眠処置は記憶の固定化を阻害した。目視判定では、マウスが触覚学習後にどのようなパターンで睡眠するかは分からない。そこで、自由行動下のマウスから脳波と筋電位を記録して、睡眠判定を行った。トレーニング0-0.5時間後には、覚醒:20分、ノンレム睡眠:10分、レム睡眠:0.2分であった。トレーニング0-1時間後は、覚醒:25分、ノンレム睡眠:34分、レム睡眠:0.5分であった。これより、トレーニング0-1時間後の断眠は、通常約30分間生じる睡眠を剥奪していると考えられる。トレーニング直後の10分相当の睡眠剥奪は記憶の固定化に影響を与えないが、30分相当の睡眠剥奪は記憶の固定化を阻害すると考えられる。

次に、睡眠による触覚記憶の固定化に関与する脳領域を検討した。物体-床面認識試験のトレーニング直後のノンレム睡眠をオンライン解析で自動判定し、ノンレム睡眠が生じる度に、トータルで30分間LEDを照射し、神経活動を抑制した。コントロールとして、M2-S1経路にGFPを発現したマウスにおいては、ノンレム睡眠時にLEDを照射しても、触覚記憶成績は正常であった。トレーニング直後のノンレム睡眠時にM2-S1経路を抑制したマウスは、触覚記憶の固定化が阻害された。一方、トレーニングの6時間後のノンレム睡眠時にM2-S1経路を抑制しても、触覚記憶成績に影響を与えなかった。この結果は、トレーニング直後のノンレム睡眠時におけるM2からS1への自発的な遠隔連絡が、触覚記憶の固定化に必要であることを示唆する。

物体-床面認識試験は、1回のトレーニングで学習が成立するため、高効率で安価である。また、学習成立には嫌悪刺激や食餌制限といったストレス負荷を必要としない。これらより、本行動試験は触覚記憶の研究への幅広い利用が期待できる。触覚手がかりを用いる物体-床面認識試験と視覚手がかりを用いる物体-位置認識試験を併用することで、視覚又は触覚手がかりを用いる学習・記憶試験に選択的に関与する脳メカニズムの解明に繋がると考えられる。

従来、睡眠の機能的意義を示すために、断眠が用いられてきた。しかし、断眠処置はストレスを伴うため、睡眠による影響であるのかストレスによる影響であるのかは議論となってきた。本研究では、断眠処置だけではなく、睡眠時における経路選択的な操作も用いて、睡眠の記憶の固定化への関与を示している。脳全体ではなく、一部の神経回路を選択的に操作しているため、ストレスが生じる可能性は少ないと考えられる。睡眠時選択的かつ神経回路選択的な操作は、今後、睡眠の機能的意義を示すスタンダードな実験手法となる可能性がある。

本研究は、睡眠時における大脳皮質の自発活動が記憶の固定化に必要であることを示した初の研究である。触覚学習に関与した大脳皮質領域が、睡眠による記憶の固定化に再び関与していた。睡眠時に出力、入力と異なる機能を担う大脳皮質領域間の直接経路を介した情報連絡が、触覚記憶の固定化に必要であった。睡眠時の自発活動の重要性を高い時間精度と経路選択性を有して示した本研究は、睡眠による記憶の調節機構を詳細に解明する端緒になると期待される。以上のことから、博士(薬学)の授与に値すると判断した。