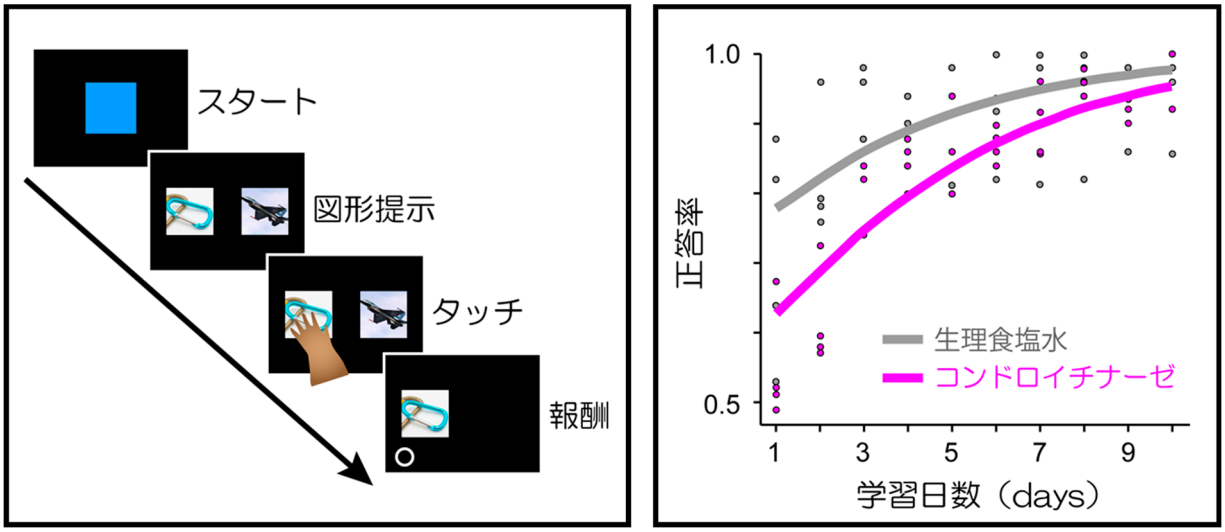
127　運動・認知スキルを担う大脳基底核メカニズムの解明	網田　英敏

【目的】大脳基底核疾患の一つであるパーキンソン病患者では、新規の学習やスキル習得が困難になる症状が見られる。そのメカニズムはいまだよくわかっておらず、新規治療法の開発のためにも大脳基底核回路におけるスキル形成メカニズムの解明が求められる。これまでの研究から「尾状核―黒質外側部」経路が視覚探索スキルの形成に重要であることが示唆されている。この黒質外側部には、シナプスを物理的に保護するペリニューロナルネット（PNNs）と呼ばれる細胞外マトリックス構造が顕著に存在していることから、黒質外側部の PNNs が視覚探索スキル形成に関わっているのではないかと考えた。そこで本研究では、構造的にも機能的にもヒトと類似した脳をもつアカゲザルを用いて黒質外側部の PNNs 分解を行い、スキル習得への影響を調べる実験を行った。

【方法】アカゲザルに対し、「報酬ディスペンサ付きタッチパネル装置」を用いて、飼育ケージ内で「図形―報酬」連合学習を実施した（左図）。「図形―報酬」連合学習では、タッチパネル上に一対の視覚図形を提示し、どちらかの図形をサルにタッチさせて選ばせた。片方の図形は報酬と結びついており、触れると正解音とともに報酬が与えられた（正解図形）。もう一方の図形は触れてもブザーのみで報酬は与えられなかった（不正解図形）。このような正解図形と不正解図形のペアを無作為に提示し、正解図形をタッチした割合を正答率として求めた。まず、コントロール条件として、生理食塩水を黒質外側部に注入し、注入後から 10 日間にわたって新規の図形ペアに対する正答率を調べた。つづいて、PNNs を分解するための薬剤（コンドロイチナーゼ ABC）を黒質外側部に注入し、注入後から 10 日間にわたって新規の図形ペアに対する正答率を調べた。生理食塩水とコンドロイチナーゼ ABC 注入後の正答率を比較することにより、PNNs 分解によるスキル習得への影響を調べた。

【結果】コンドロイチナーゼ ABC 注入後、「図形―報酬」連合学習において学習の遅延が認められた（右図）。とくに、注入後 1～3 日目は何度も同じ図形ペアにおいて不正解図形を選ぶ様子が確認された。10 日間にわたる反復学習によって正答率は徐々に上昇していったものの、生理食塩水を注入したときに比べて約 2.5 日の学習遅延が見られた。一方、PNNs 分解前に学習した図形ペアについては、PNNs 分解後も高い正答率を示した。また、摂食行動、歩行、リーチング動作、視覚的注意、情動表出などの行動については PNNs 分解後も変化がなかった。

「図形―報酬」連合学習（左図）とコンドロイチナーゼ ABC 注入（PNNs 分解）による学習への影響（右図）



127. 運動・認知スキルを担う大脳基底核メカニズムの解明

網田　英敏

*京都大学 霊長類研究所 統合脳システム分野

Key words：ペリニューロナルネット，学習，記憶，報酬，黒質外側部

緒　言

パーキンソン病に代表される大脳基底核疾患は新規の学習やスキルの習得を困難にさせる。例えば、パーキンソン病患者は、新しいスキルを習得する際、日内ではパフォーマンスの改善を示すが、翌日になると前日と同様のパフォーマンスレベルに戻ってしまう［1］。これまでにサルを用いた研究により、「視覚図形―報酬」の連合学習を何日も続けて行うと、大脳基底核において連合記憶が獲得され、その後数か月以上にわたって記憶が保持されていることが明らかになった［2］。さらに、この大脳基底核内の神経路は眼球運動を制御しており、報酬と結びついた視覚物体を素早く見つけるための「視覚探索スキル」を担っていることがわかってきた［3］。しかし、この神経路がどのようにして長期的な連合記憶を形成できるのかについては未だ解明されていない。

大脳基底核の視覚探索スキルを担う脳領域（黒質外側部）にはペリニューロナルネット（PNNs）と呼ばれる細胞外マトリックス構造が顕著に存在していることから、この構造がスキル習得に関わっているのではないかと考えた。この仮説を検証するために、本研究では、黒質外側部の PNNs を分解することによるスキル習得への影響を調べた。具体的には、PNNs 分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC（ChABC）をアカゲザル黒質外側部に局所注入し、タッチパネル装置を用いて「図形―報酬」連合記憶の形成と保持をテストし、PNNs 分解による行動への影響を評価した。

ChABC 注入後に記憶再認テストを行い、以前学習した「図形―報酬」連合記憶を保持しているかを確かめたところ、コントロール条件（生理食塩水注入後）の成績とほぼ変わりはなかった。同様に、ChABC 注入後に記憶形成テストを行い、新たに「図形―報酬」連合記憶が獲得できるかを確かめたところ、コントロール条件に比べて学習（記憶形成）の遅延が見られた。本研究により、黒質外側部の PNNs がスキルのための記憶形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

方　法

1. 実験動物

本実験にはアカゲザル 1 頭（Macaca mulatta、オス、9 歳齢、体重 10 kg）を用いた。本実験動物の飼育管理および実験手続きは京都大学・霊長類研究所・動物実験委員会によって承認されており、サル類の飼育管理ガイドラインに従って適正に行った。

2. 行動実験手続き

行動実験はすべてサル飼育ケージ内で行った。実験装置として、飼育ケージ扉に取り付け可能な「報酬ディスペンサ付きタッチパネル装置」（小原医科産業）（図 1a）を使用した。タッチパネルには赤外線走査方式 15 インチ液晶ディスプレイを使用した。報酬として、リボルバー式報酬ディスペンサにより卵ボーロ（大阪前田製菓、乳ボーロ）を与えた。本実験装置はソフトウェア（MathWorks：MATLAB）とマルチファンクション I/O デバイス（National Insstruments；USB-6501）によりプログラム制御した。

*現在の所属：京都大学 霊長類研究所 神経科学研究部門

行動実験として「図形―報酬」連合学習（図 1b）を用いた。このタスクでは、スクリーン上に一対の視覚図形を提示し、どちらかの図形をサルにタッチさせて選ばせた（図 1c）。片方の図形は報酬と結びついており、触れると正解音とともに報酬が与えられた。もう一方の図形は触れてもブザーのみで報酬は与えられなかった。1 回の実験セッションで 8 組の図形ペアを 50 試行無作為に提示した。注入実験前に 8 組の図形ペアを 6 セット（計 48 組の図形ペア）学習させた。

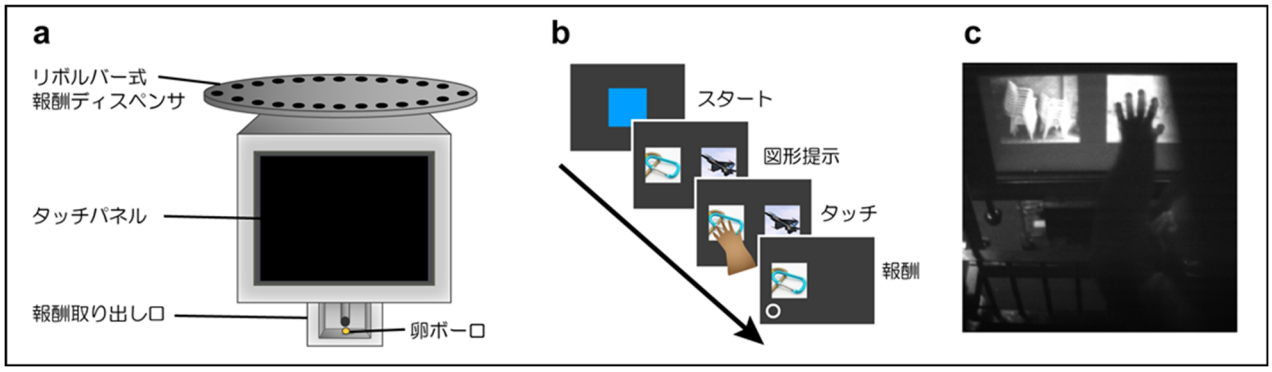


図 1. タッチパネルによる「図形―報酬」連合学習

a）報酬ディスペンサ付きタッチパネル装置。リボルバー式報酬ディスペンサによって報酬を自動的に供給する。タッチパネル下にある報酬取り出し口に報酬（卵ボーロ）が出る。

b）課題の流れ。スタート合図のあと、一対の視覚図形（図形ペア）が提示される。正解図形をタッチすると報酬が得られた。

c）実験の様子。手前のサルがタッチパネル上に提示された図形ペアのうち右の図形をタッチしている様子。

3. 薬剤注入実験

核磁気共鳴画像（MRI）を用いた脳座標ナビゲーションシステムにより、両側の黒質外側部の前後 2 か所に生理食塩水（2.0 μ L）を注入した。注入後 3 週間、「図形―報酬」連合課題による注入の影響を調べた。その後、同じ領域に PNNs を分解する薬剤、コンドロイチナーゼ ABC（Sigma-Aldrich：C3667）を 2.0 μ L（60 U/mL）ずつ注入した。注入後 3 週間、「図形―報酬」連合課題による注入の影響を調べた。注入の影響は、以下に述べる行動テストバッテリー（「記憶再認テスト」と「記憶形成テスト」）によって評価した。

記憶再認テスト：注入後から 3 週間のあいだ、1 週間おきに、注入前に学習した図形ペア（計 48 ペア/6 セット）を 1 セッション 48 試行繰り返しなしで提示し、正答率を計測した。

記憶形成テスト：注入後から新規の図形ペア（計 32 ペア/4 セット）を 1 日 1 セッション 50 試行ずつ行い、計 10 セッションにわたる学習成績の推移を調べた。

結果および考察

コンドロイチナーゼ ABC 注入による「図形―報酬」連合学習の阻害

生理食塩水注入後およびコンドロイチナーゼ ABC（ChABC）注入後の記憶再認テストの正答率を比較したところ、両者の間に明確な差は認められなかった（図 2a）。したがって、注入前に学習した連合記憶については、PNNs 分解後も保持されていたことが示唆される。一方、記憶形成テストの成績変化を比較したところ、ChABC 注入後に学習の遅延が認められた（図 2b）。したがって、注入後に学習した連合記憶の形成については、PNNs 分解によって阻害されたことが示唆される。とくに、1～3 セッション目の成績において、

ChABC 注入後の正答率の低下が顕著だった。しかし、ChABC 注入後も 10 セッション目までに正答率が 9 割に達していたことから、学習阻害の効果は一過的か部分的であり、完全に学習ができなくなったわけではないと考えられる。その一つ目の可能性として、PNNs が分解された後に回復した可能性がある。実際、ChABC 注入後の PNNs 分解範囲を解剖学的に調べた研究では、1～2 週間後には 50%ほどに範囲が縮小したことが示されている［4］。二つ目の可能性として、今回 PNNs 分解した領域が部分的だった可能性がある。三つ目の可能性として、他の領域が代償したために最終的に学習できた可能性がある。実際、黒質外側部の上流領域である尾状核尾部を破壊した実験でも学習遅延が起きたが、最終的には学習できたことが示されている［5］。なお、ChABC 注入後の摂食行動、歩行、リーチング動作、視覚的注意、情動表出などの行動には変化が見られなかったことから、今回の学習遅延はモチベーションの低下、視覚的注意の低下、運動障害によって起きたとは考えにくい。今後、さらに研究を進めることで、PNNs 分解による学習障害や回復過程のメカニズムについて明らかにしていきたい。

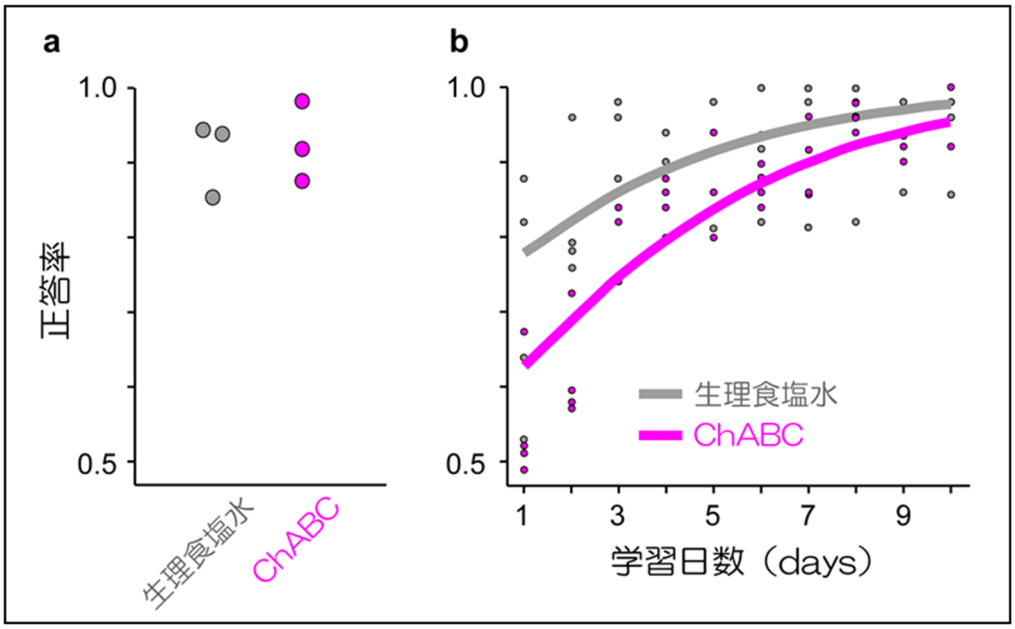


図 2. 薬剤注入後の「図形―報酬」連合学習の成績

a）記憶再認テストの結果。各シンボルは 1 セッションごとの 48 試行中の正解試行数の割合（正答率）を示す。灰色は生理食塩水注入条件、マゼンタはコンドロイチナーゼ（ChABC）注入条件を示す。

b）記憶形成テストの結果。各シンボルは 1 セッションごとの 50 試行中の正解試行数の割合（正答率）を示す。横軸は学習日数を示す。灰色は生理食塩水注入条件、マゼンタは ChABC 注入条件を示す。各曲線はロジスティック関数に当てはめた学習曲線を示す。

共同研究者・謝辞

本研究は、京都大学霊長類研究所の髙安環さん、Gaoge Yan さん、木村慧さん、高田昌彦教授とともに共同で実施しました。また、アメリカ国立衛生研究所（NIH）の彦坂興秀博士からご助言をいただきました。本研究に対しご支援を賜りました上原記念生命科学財団にこの場をお借りして深謝いたします。

文　献

1) Marinelli L, Quartarone A, Hallett M, Frazzitta G, Ghilardi MF. The many facets of motor learning and their relevance for Parkinson's disease. Clin Neurophysiol. 2017 Jul; 128(7):1127-1141. Epub 2017 Apr 9. PMID: 28511125 DOI: 10.1016/j.clinph.2017.03.042.

2) Yasuda M, Yamamoto S, Hikosaka O. Robust representation of stable object values in the oculomotor basal ganglia. J Neurosci. 2012 Nov 21; 32(47):16917-32. PMID: 23175843 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3438-12.2012

3) Amita H, Kim HF, Inoue K, Takada M, Hikosaka O. Optogenetic manipulation of a value-coding pathway from the primate caudate tail facilitates saccadic gaze shift. Nat Commun. 2020 Apr 20;11(1):1876. PMID: 32312986 DOI: 10.1038/s41467-020-15802-y

4) Mueller A, Davis A, Carlson SS, Robinson FR. N-acetylgalactosamine positive perineuronal nets in the saccade-related-part of the cerebellar fastigial nucleus do not maintain saccade gain. PLoS One. 2014 Mar 6; 9(3):e86154. PMID: 24603437 DOI: 10.1371/journal.pone.0086154.

5) Fernandez-Ruiz J, Wang J, Aigner TG, Mishkin M. Visual habit formation in monkeys with neurotoxic lesions of the ventrocaudal neostriatum. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27; 98(7):4196-201. PMID: 11274442 DOI: 10.1073/pnas.061022098.