

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01987

研究課題名(和文) 情動性記憶の脳内処理プロセスの解明

研究課題名(英文) Brain process for memory formation of emotional experiment

研究代表者

石川 淳子 (ISHIKAWA, Junko)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30570808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リップル様イベントの波形解析により、リップル様イベントがエピソード経験の情報をコーディングしていることや、海馬CA1の神経活動がエピソード経験の種類によって特異的に変化することが明らかとなった。また、扁桃体基底外側核が拘束ストレス後に起きるCA1の神経活動やその記憶成立に関わっているが、雌との初接触エピソードの記憶形成にはほとんど関わっていないという結果を得た。本研究では、経験の種類特異的な記憶形成の神経機構があることが解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
エピソード経験の記憶メカニズムに海馬CA1が関わっていることは解っていたが、それに関わるCA1神経活動特性はあまり解っていない。本研究では、エピソードの種類によって記憶形成機構が異なることを示すことが出来た。これは、記憶形成の強弱の問題や、記憶のコーディング様式を解明するにあたって重要な知見である。更なる解析を進めることで、将来的には記憶のデコーディング実現化につながる可能性があり、この研究領域を発展させ重要な研究課題の1つである。

研究成果の概要(英文)：Feature analysis of ripple-like event indicate that ripple-like events encode memory information, and multi-unit recording in the hippocampal CA1 of male rats revealed episode-type specific alteration of hippocampal CA neural activity. Additionally, we found that basolateral nucleus amygdala (BLA) strongly influence on restraint stress-related CA1 neural activity and its memory formation, but does not significantly affect memory formation for a contact with female rat. The present study shows episode-specific CA1 neural activity and memory mechanism.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 情動 海馬CA1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

恐怖や喜びを伴う情動性の経験は、強固に記憶形成されるが、その生体内メカニズムはあまり解っていない。記憶形成には、海馬 CA1 が関わっていると推測されるため、記憶形成過程におけるこの領域の神経活動特性を明らかにすることは、メカニズムを解明するために必要である。研究代表者はこれまでに、強い情動が起きる拘束ストレスと異性(雌ラット)との初接触経験について、その記憶形成過程における雄ラット海馬 CA1、前頭前野の神経活動記録を行い、次のことを発見した。情動性経験の開始直後から海馬 CA1 で超高頻度発火が起き、その後、リップル波が増加する。超高頻度発火の総潜時とリップル波の増加率には正の相関がある。超高頻度発火発生のタイミング、回数、潜時は経験の種類により異なる。リップル波の発生頻度がピークになるタイミングは経験の種類により異なる。リップル波の形や大きさが経験の前後で異なる。経験の種類により、リップル波形が異なる。上記の現象は、同性(雄ラット)や新奇物体との交流経験ではあまり顕著に起きない。本研究では、これらのデータをもとに仮説を立て、その立証を試みるとともに、上記した神経活動特性の発生機序や生理学意義を追及することで、情動性経験の記憶形成機構の全貌解明を目指す。

### 2. 研究の目的

これまでの実験データで、リップル波には記憶情報がコーディングされていることが示唆されている。本研究では、経験後に発生するリップル波には、その経験情報が含まれていることを立証するためにリップル波の波形解析を行う。また、これまでの研究で、情動の中樞である扁桃体を不活性化すると、強い情動性経験後のリップル波の増加が阻止されることが解っている。本研究では、扁桃体を不活性化した場合における記憶の成立を、行動学的に確認し、また、神経活動の変化を検証することで、扁桃体が情動性エピソード記憶にどのように関わっているかを検証する。さらに、扁桃体を不活性化した際のリップル波の波形についても解析を試みる。さらに、これまでの実験データは、経験の種類により記憶形成機構が違うということを示している。これまでに、経験の種類による記憶形成過程の違いを、同一の実験プロトコルで厳密に比較したものはない。本研究では4種類の経験について、検証を行い、経験の種類による違いについても注目する。

### 3. 研究の方法

(1)5類のエピソード経験(拘束ストレス、雌との初交流、雄との交流、新規物体との交流、熱ショックストレス)の記憶形成機構を、成熟雄 Sprague-Dawley ラット(10~15週齢)にて検証する。拘束ストレスでは、雄ラットを台に乗せて、四肢を紐で強く縛り、その紐を台の四隅にあるフックに固定し、ラットがうつ伏せの状態で大の字になるようにして、10分間拘束する。雌、雄、新規物体との交流では、実験雄ラットのホームケージにそれぞれを10分間入れる。熱ショックストレス経験では、熱ショックボックスに実験雄ラットを10分間入れ、その間に熱ショックをランダムインターバルで10回与える。

(2)エピソード経験の記憶が形成されているかを調べるため、24時間後に同じ経験をさせて、その際の行動を見る。拘束ストレスの行動指標は、発生回数・もがく潜時・拘束台上でのフリージング、雌との初交流経験では陰部確認までの潜時、同性との初交流経験では攻撃するまでの潜時、新奇オブジェクトとの交流経験では観察時間、熱ショックストレスでは、ボックスに入れた際のフリージングを解析する。

(3)海馬 CA1 に記録電極を埋め込み、エピソード経験前、中、後の神経活動を記録する。扁桃体基底外側核(BLA)不活性化の動物群は、BLA にガイドカニューラを、CA1 に記録電極を埋め込む。実験を行う全ての動物は、1週間ハンドリングを行う。上記手術後は最低1週間の回復期間を設け神経活動記録実験を行う。

(4)BLA 不活性化実験では、各経験の直前に無麻酔科でガイドカニューラにインターナルカニューラを刺入し、GABA<sub>A</sub>/GABA<sub>B</sub> 受容体アゴニストである muscimol と baclofen (各 50ng)を注入する。

(5)実験終了後は灌流固定を行った後、薄切片(40 μm)を作製する。その後、HE 染色を施し、記録電極、ガイドカニューラの位置を確認する。

#### 4. 研究成果

(1) 情動性エピソードである拘束ストレスや雌との初接触の経験によって、超高頻度発火やリップル様イベントの発生(図1)が増加することが、これまでの実験で解っている。本研究では、エピソード後に起きるこれらのイベント以外の時間では、CA1の神経活動が低下していることに着目し、経験前の inter spike interval (ISI) の standard deviation (SD) を算出し、ISI がその 6SD 以上になっている時間を silent period (図1) として解析を行った。Silent period はリップル様イベントや超高頻度発火と異なり、2種類全てもエピソード経験で増えていた。

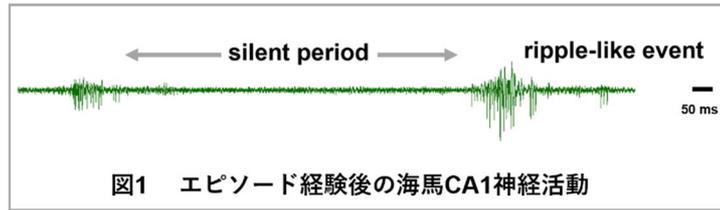


図1 エピソード経験後の海馬CA1神経活動

(2) これまで、エピソード経験後にリップル様イベントの amplitude、duration、arc length が変化することが解っている。本研究ではさらに peak の数も追加解析し、これら4つの指標を用いて MAOVA 解析による比較を行った。Peak の数は、拘束ストレス、雌や雄とも接触で増加したが、新規物体との交流では減少した。MANOVA 解析では全てのエピソードについて、エピソード前後とエピソード間で有意差があった。このことから、リップル様イベントがエピソード特有の情報をコードしていることが推測された。

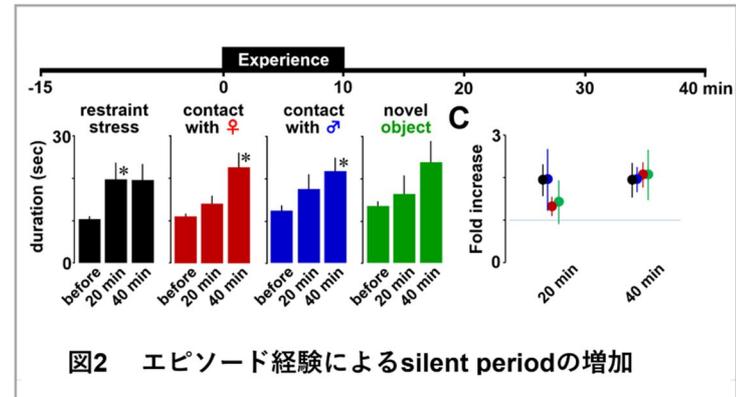


図2 エピソード経験によるsilent periodの増加

(3) 本研究では恐怖の行動指標と行動を観察しながらの神経活動記録を可能にするために、熱ショックストレスをエピソード経験として追加し、実験を行った。熱ショックを与えると、その後、リップル様イベントが増え、その形状も変化することが明らかとなった。また、熱ショック経験後、再度テストボックスにラットを入れると、フリージングが増え、フリージング開始時にリップル様イベントが起きることが解った。このことから、リップル様イベントは恐怖記憶の想起に関係していることが推測された。

(4) エピソードを経験する際、扁桃腺基底外側核 (BLA) を不活性化しておくことで拘束ストレスではリップル様イベントの増加が阻止されることが解っている。本実験では、特に強い神経活動変化を引き起こす拘束ストレスと雌との初接触エピソードについて、超高頻度発火と silent period への BLA 不活性化の影響を調べた。拘束ストレスにおけるコントロール群 (BLAへsaline投与) では、エピソード経験中に超高頻度発火が増えるのに対して、不活性化群は超高頻度発火が増えなかった。一方、雌との初接触におけるコントロール群では、エピソード開始20分後に超高頻度発火が増えるの

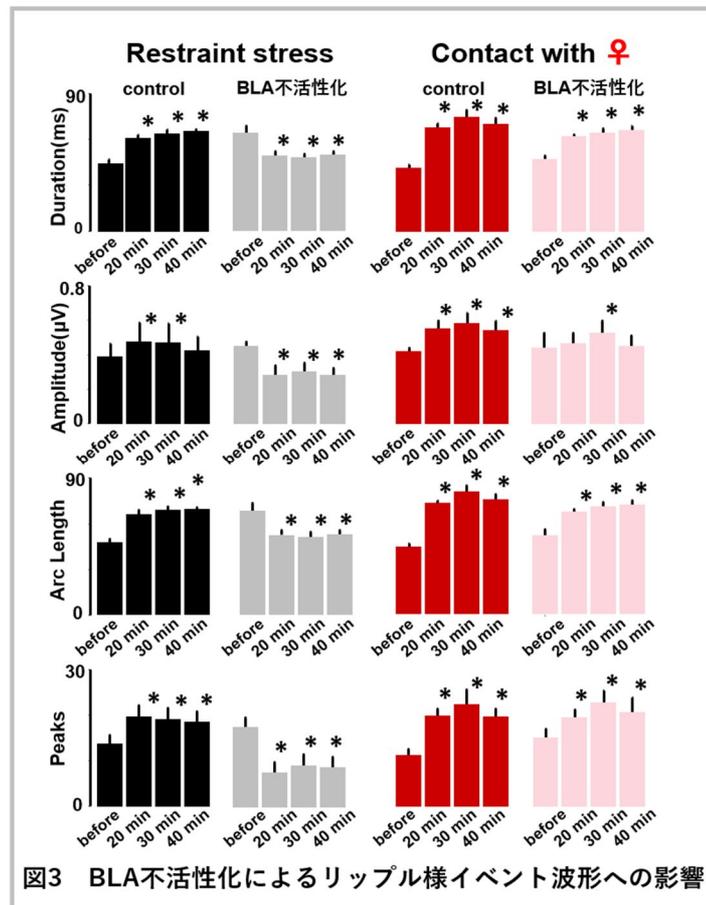


図3 BLA不活性化によるリップル様イベント波形への影響

に対して、不活性化群はエピソード経験中に超高頻度発火が増えた。一方、silent period は拘束ストレスのコントロール群ではエピソード開始 20、30、40 分後に増え、不活性化群でも 30、40 分後に増えた。雌との初接触エピソードのコントロール群はエピソード開始 40 分後、不活性化群は 30 分後に silent period が増えた。

(5) リップル様イベントの形状への BLA 不活性化の影響についても解析を行った。コントロール群のリップル様イベントの duration、amplitude、arc length、peak 数は、拘束ストレス後に増加したが、不活性化群では減少した。雌との初接触エピソードでは、コントロール群も不活性化群も全ての指標で増加した (図 3)。

(6) 上記の実験で、BLA 不活性化がエピソード特異的に CA1 の神経活動を変化させることが解った。そこで、BLA 不活性化が記憶形成にどのように関わっているかを調べるため、行動解析を行った。コントロール群の拘束ストレス中の vocalization や脱出しようともぐ潜時は、初回に比べて 2 回目には減少したが、不活性化群では減少しなかった。コントロール群のテスト台上でのフリージングは、拘束ストレスの 24 時間後に増加した。不活性化群でも増加したが、増加率がコントロールに比べて低かった。これらのことから、記憶の形成に BLA 不活性化が影響しているのが解ったが、記憶形成の強弱なのか記憶内容が異なっているのかは判断できていないため、今後さらに検証を試みる。雌との接触では、コントロール群、不活性化群両方とも、雌陰部確認までの潜時間が初回に比べて 2 回目が有意に減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa J, Sakurai Y, Ishikawa A, Mitsushima D.	4. 巻 273
2. 論文標題 Contribution of the prefrontal cortex and basolateral amygdala to behavioral decision making under reward/punishment conflict.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychopharmacology	6. 最初と最後の頁 639-654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00213-019-05398-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa J, Ishikawa A.	4. 巻 712
2. 論文標題 The loop neural circuit between the medial prefrontal cortex and the amygdala in the rat brain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 134476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.134476.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川淳子、友景琢人、美津島大
2. 発表標題 CA1 におけるエピソード経験特異的なリップル様発火活動とシナプス多様化
3. 学会等名 第28回 海馬と高次脳機能学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川淳子、友景琢人、美津島大
2. 発表標題 エピソード特異的に符号化された海馬内情報：リップル様発火活動とシナプス多様化
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤諒、石川淳子、友景琢人、美津島大
2. 発表標題 エピソード記憶特異的なCA1ニューロンのリップル様発火活動の人工知能解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 友景琢人、石川淳子、美津島大
2. 発表標題 Real-time dynamism of hippocampal CA1 firings after the 4 different episodic stimuli
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川淳子、友景琢人、美津島大
2. 発表標題 Real-time dynamism of hippocampal CA1 firings after emotional episodes
3. 学会等名 第70回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 友景琢人、石川淳子、美津島大
2. 発表標題 エピソード様経験による海馬CA1リップル様イベントの形状変化
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	美津島 大  (MITSUSHIMA Dai)  (70264603)	山口大学・大学院医学系研究科・教授    (15501)	