

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19349

研究課題名（和文）ストレス応答における脳深部領域の活動相関解析

研究課題名（英文）Analysis of deep brain regions in stress response

研究代表者

佐々木 拓哉（Sasaki, Takuya）

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：70741031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳深部領域の1つである腹側海馬の記憶に関わる神経活動がストレス感受性を引き起こすかどうか調べた。ストレス抵抗性を向上させるようなウイルスベクターを作成し、遺伝子ノックダウン手法を利用して、ストレス抵抗性マウスを作成した。さらに、こうしたマウスから腹側海馬の神経活動に及ぼす影響を神経スパイク記録法を用いて調べた。その結果、ストレスを負荷した後は、腹側海馬においてシャープウェーブリップルが増加していることを見出した。こうした特徴的な活動は、ストレス記憶を表象する神経細胞集団の同期的な再活性化と相関していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はマウスから観察された結果であるが、海馬の構造やリップル波の機能はマウスとヒトで非常に類似しているため、記憶を基にした精神症状の発症メカニズムは、ヒトでも同様である可能性が考えられる。本研究成果は、本来脳に備わっている記憶のメカニズムが過剰に働くと、精神症状を発症するリスクが高まることを示した。この成果は、記憶能力や性格傾向の側面から、ストレス応答性の精神症状を考える重要な契機となる。また本研究では、運動をすることによって海馬のリップル波の頻度が減少し、ストレス誘発性の精神症状を抑制できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the regulatory mechanisms of stress susceptibility in male mice, spanning from gene expression to neuronal population dynamics within the ventral hippocampus (vHC). Knockdown of the Calb1 gene in the vHC resulted in increased stress resilience and a lack of the typical post-stress increase in ventral hippocampal sharp wave ripple (SWR) activity. Following stress exposure, SWRs in the vHC facilitated synchronous reactivation of neuronal ensembles involved in stress memory encoding and enhanced information transfer to the amygdala. Importantly, suppression of post-stress vHC SWRs through real-time feedback stimulation or physical activity prevented deficits in social behavior. These findings collectively demonstrate that the internal reactivation of negative stress-related memories, facilitated by ventral hippocampal SWRs, plays a critical role in determining stress susceptibility at a neurophysiological level.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ストレス 海馬 電気生理計測 同期活動 記憶

1. 研究開始当初の背景

生物は、精神的ストレス負荷に曝されると、うつ状態や不安亢進などの精神不調が起こる。興味深い謎は、ストレス経験そのものは短時間でも、その後不調が継続するという点である。これは単純な「刺激-反応」の枠組みでは説明できないため、ストレス応答を継続させる何らかの生体機構が備わっているはずである。申請者は、この原因として、ストレス経験の記憶が、脳で過剰に繰り返して再活性化されるためという仮説を考えた。一般の教科書的な理解として、獲得した記憶を神経回路に固定するには、同じ神経活動の繰り返し再生(反復)が必要である。このメカニズムは、本来、生存にとって大切であるが、ストレス応答に対して働くと、神経活動が過剰に反復されることになり、精神障害や臓器不調を誘発する要因にもなると考えられる。実際に我々も日常において、強いストレス負荷を経験すると、その後も、その出来事を反復して思い出し、精神的・身体的に負のスパイラルに陥ることがある。このような科学的・経験的証拠があるにもかかわらず、記憶を出発点としたストレス病態の生理学的な証拠は皆無である。

本研究では、記憶とストレス応答や情動の両方にかかわる脳領域として「腹側(ventral)海馬」に着目する。海馬と言うと、多くの先行研究が存在する印象があるが、大半の報告は、記録が容易な背側(dorsal)海馬に関するものである。一方で、腹側海馬に関する断片的知見から、腹側海馬は情動を司る扁桃体や側坐核と連絡し、ストレス負荷時に活動することが知られている。また組織学的検討より、記憶を獲得する際に活動した海馬の神経細胞は、その後の休憩中や睡眠中にも繰り返し再活性化されることで、記憶の固定が促進されることが知られている。以上より、腹側海馬は、本仮説「ストレス記憶の増悪仮説」を証明する上で、最も重要と考えられる。

2. 研究の目的

腹側海馬において、ストレス記憶に対応した神経活動の再活性化が、出力先の扁桃体と側坐核の活動に影響を与えるか調べる。これらの脳部位は、情動発現や精神疾患に重要であることが多数示唆されているが、腹側海馬と同様に深部領域であるため、具体的なスパイク活動など生理学的知見がほぼ皆無である。この問題解決を目指し、最適な電極形状や脳座標設定の検討を行う。特に、腹側海馬での記憶再生が生じた際に、扁桃体や側坐核で個々の神経活動がどのように影響を受けるか明らかにする。これらの領域で活動の増減を検証することで、海馬で内因的に生じる記憶の再活性化に応じて、情動系の反応がどのように引き起こされているか理解する。同時に、心拍動など身体活動の変化にも着目し、ストレス誘発性の精神変動・身体反応の流れを考察する。応用的な研究目的として、豊富な環境での運動や報酬量の増加など良ストレスの効果を調べる。薬物処置や光操作実験などの選択肢もあるが、本研究では「自然な気晴らし効果」に主眼を置く。報酬への意欲が高まる時期や運動中には、外部環境に注目する脳活動(シータ波など)が優勢であり、記憶想起が(徐波・鋭波など)はほとんど出現しない。そこで、遊具が豊富な環境での飼育や、自発運動を高める回し車を提示し、ストレス記憶を想起するような機会を減らす実験を試みる。この条件下で、腹側海馬および扁桃体などの神経活動が、どれほど減少するか明らかにする。個体差が大きいので、活動再生の頻度と、ストレス応答(うつ様行動、心拍動など)の変化を各個体内で検討する。

3. 研究の方法

マウスに神経スパイク計測用の電極群を海馬に埋め込み、腹側海馬 CA1 野から海馬神経細胞のスパイク列をマルチユニット計測する。マルチユニット計測では、電気信号波形から各ニューロンのスパイク信号を抽出する(ソーティング)。オンライン操作の過程では、報酬中の海馬リップル波および神経同期活動が検出されたら、その瞬間(5 ミリ秒以内を目標)に海馬にフィードバック刺激(投射線維の fimbria 領域への電気刺激、または海馬錐体細胞への光刺激)を与える。電気刺激により、標的の同期スパイク列が生じ切る前に、それを打ち消すことができることを確認している。

社会的な情動記憶を形成する記憶学習課題として、社会的敗北ストレスを採用した。社会的敗北ストレスは、対象となる雄性 C57BL/6J マウスを、雄性 ICR マウスの飼育ケージに曝露し、10 分間攻撃を受けさせることによって達成される。これによって形成された社会的ストレス記憶を評価するため、翌日に社会的相互作用試験を行った。社会的相互作用試験では、対象マウスに空のメッシュケージの置かれたオープンフィールドを 150 秒間探索させたのち、前日攻撃してきた ICR マウスをメッシュケージ内に入れてオープンフィールドを再度 150 秒間探索させた。メッシュケージ周辺に滞在する時間を測定し、その比を社会性相互作用量の指標として定量することで、社会的ストレス記憶を評価した。

4. 研究成果

(1) 社会的ストレス記憶の固定化における腹側海馬の関与の検証

経験依存的な行動変化を誘導するためには、経験が長期記憶として固定化されることが必要と考えられる。この過程に腹側海馬が関与するか調べるため、ストレス経験直後に両側の腹側海

馬にムシモールを局所投与した。生理食塩水群と比較して、ムシモール群で有意に高い社会性相互作用量を示した。この結果から、ストレス経験後に腹側海馬で社会的ストレス記憶の固定化が行われていることが示唆された。

(2) 社会的敗北ストレス経験をエンコードする腹側海馬神経細胞

多細胞同時記録法を用いて個々の腹側海馬神経細胞の発火活動を記録・解析した。背側海馬の活動を調べた過去の知見から、ある出来事の記憶を担う神経細胞は、その出来事を経験中に神経活動を増加させることが知られている。そこで、発火率を指標とし、腹側海馬にストレス経験をエンコードする神経細胞が存在するか調べた。プレレスト期と、ストレス直後のエンコーディング期の発火率を比較したところ、エンコーディング期で発火率を上昇させ、記憶を担うと考えられる神経細胞が観察された。その一方で、発火率を低下させる細胞も観察された。約半数の腹側神経細胞がエンコーディング期で発火率を上昇させていることを見出した。この結果から、腹側海馬に社会的ストレス記憶をエンコードする細胞が存在することが示唆された。

(3) 社会的ストレス記憶の固定化に寄与する腹側海馬リップルの活動動態

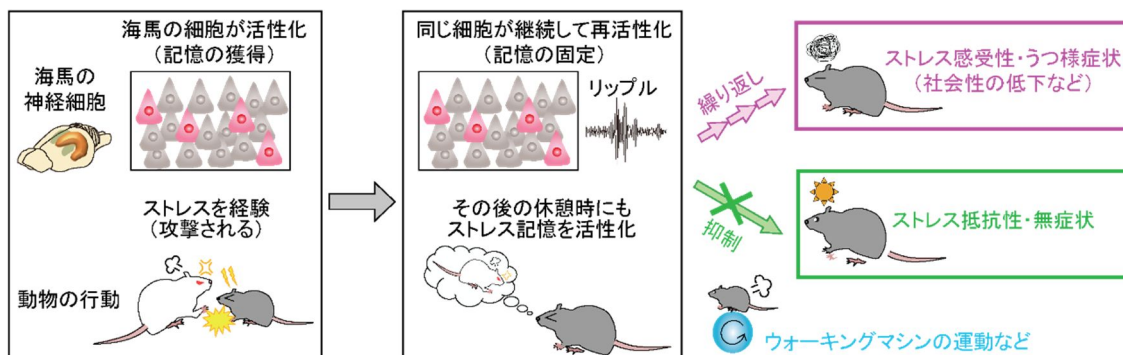
記憶の固定化を反映する神経活動として、海馬リップルに着目した。リップルは多くの海馬神経細胞の同期発火を伴って生じる脳波であり、背側海馬ではリップルが学習に伴って高頻度に発生し、記憶の固定化に重要であることが調べられてきた。しかし腹側海馬リップルの機能はほとんど分かっていない。前項でストレス経験直後 2 時間の腹側海馬の活動が記憶の固定化に重要であることが示唆されたことから、この時の腹側海馬リップルの活動動態を記録・解析した。プレレスト期と比較して、ポストレスト期でリップルの発生頻度の上昇がみられた。このことから、腹側海馬においても、経験後にリップル発生頻度が上昇し、記憶の固定化に寄与していることが示唆された。

(4) リップル中の記憶の固定化に寄与する腹側海馬神経細胞

空間学習における背側海馬の活動を調べた過去の知見から、直前の経験をエンコードする細胞は、その後の安静時にリップル中に活動しやすくなることが知られている。そこで、前項で見出した、ストレス経験をエンコードする腹側海馬神経細胞が、経験後にリップル発生中に活動しているかを検証したところ、エンコーディング期で発火率が上昇する神経細胞ほど、ポストレスト期のリップル中により発火しやすくなっていることを発見した。このことから、腹側海馬において、個々の神経細胞レベルで社会的ストレス記憶の固定化が促進されていることが示唆された。

(5) 運動によるストレス応答の軽減効果の検討

マウスから生じる脳波を常に計算処理して、リップル波が検出された直後に、電気的なフィードバック刺激を脳に与え、リップル波のみを消失させるという実験システムを確立した。この技術を用いて、腹側海馬のリップル波を選択的に消去したところ、その後のうつ様症状の発症が抑制された。また、このような人為的な脳波の操作ではなく、より自然環境での効果を試した。リップル波は、安静時に頻繁に生じる脳波であるが、運動をしている時には、ほとんど発生しない。そこで、ストレスを負荷したマウスを、強制的にウォーキングマシンに乗せて運動させたところ、腹側海馬のリップル波はほとんど観察されなくなり、その後のうつ様症状の発症も抑制された。以上の結果より、腹側海馬のストレス記憶に関与するリップル波が、その後のうつ様症状の発症に重要であり、こうした現象を予防するためには、運動が効果的であることが示唆された(下図)。



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 2件）

1. 著者名 Kayama Tasuku, Ikegaya Yuji, Sasaki Takuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Phasic firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area triggers peripheral immune responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05306-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kuga Nahoko, Nakayama Ryota, Morikawa Shota, Yagishita Haruya, Konno Daichi, Shiozaki Hiromi, Honjyo Natsumi, Ikegaya Yuji, Sasaki Takuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Hippocampal sharp wave ripples underlie stress susceptibility in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-37736-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木拓哉
2. 発表標題 迷走神経による精神機能調節メカニズムの解明
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Sasaki
2. 発表標題 Deciphering multidimensional physiological signals to unveil brain-body interactions
3. 学会等名 International Graduate Student Conference in Pharmaceutical Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院薬学研究科薬理学分野ホームページ
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~yakuri/publication.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------