

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：13201

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680034

研究課題名(和文) 恐怖記憶連合に関わるニューロン群および分子群の同定

研究課題名(英文) Identification of molecules and neurons which regulate CS-US association during fear conditioning

研究代表者

鈴木 章円 (SUZUKI, AKINOBU)

富山大学・医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：40424684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：恐怖条件付け文脈学習課題において、動物はCS学習及びCS-US連合学習の2つの学習を同時に起こすため、CS-US連合を特異的に制御する脳領域の同定は困難であった。このような背景のもと、本研究課題では、マウスの行動量「Motility」およびマウスが恐怖を感じたときに示す「Freezing」を指標にCSおよびCS-USを分けて評価する新規行動実験系を確立し、CS-US連合を特異的に制御する領域としてParietal Association Cortex (PtA)を発見した。また、PtAの活動を光遺伝学的手法により人為的に操作することでCS-US連合記憶を創出できることを発見した。

研究成果の概要(英文)：In the usual contextual fear conditioning, the animals have two types of learning [(1) learning the context (CS) and, (2) learning the association between the context (CS) and the shock (US)]. Because these types of learning co-occur during conditioning, it is difficult to identify brain regions required for CS-US association. In this study, I performed Arc CatFISH method to detect brain regions required for the CS-US association and found that parietal association cortex (PtA) responded to CS-US signals. To test whether PtA regulates CS-US association at behavioral level, I established new behavioral paradigms to measure CS, US, and CS-US independently. By performing this behavioral paradigm with injection of sodium channel blocker lidocaine, I found that PtA regulates CS-US association. Furthermore I found that, by optogenetics technique, manipulating the PtA activity is capable of generating an artificial CS-US associative memory.

研究分野：neuroscience

キーワード：Memory Parietal association CS-US association Optogenetics

1. 研究開始当初の背景

恐怖記憶は、恐怖を感じた場所(条件刺激;CS)と恐怖体験(無条件刺激;US)が「連合」されて初めて形成される(CS-US 記憶)が、この連合に関与する脳領域や分子群は明らかになっていない。主な原因として、従来の方法では CS 記憶が形成されたかどうかを判別することができないため、最終的な CS-US 連合の結果としての行動表現型でしか評価することができず、連合のみに関与する分子群の同定は困難であった。例えば、薬理的・遺伝学的手法を用いてこれまで多くの分子が恐怖条件付け記憶の形成に必要なことが報告されているが、いずれも連合の最終結果としての行動しか解析できていないため、それぞれの分子が CS 記憶の形成に重要なのか、または CS-US 連合そのものに重要なのかは分かっていない。

このように、古くから恐怖記憶メカニズムの解明が試みられているが、連合のメカニズムはおろか、連合に関わる脳領域の特定や分子群の同定は行われていないのが現状であり、連合のメカニズムの解明は不安障害に対する新たな治療法や治療薬の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

心的外傷後ストレス障害(PTSD)は恐怖体験を過度に記憶する、あるいは、恐怖記憶を修飾して軽減できない疾患であり、このような恐怖体験に基づいた障害が社会問題となっている。現在のところ PTSD に対する主な治療法として行われているのは、恐怖を体験した事柄を想起させ、その記憶から徐々に恐怖を取り除く持続エクスポージャー療法と呼ばれる認知行動療法(心理学的療法)である。この方法では治療に長い時間を要することや、恐怖記憶を何度も想起させる必要があり、患者への負担も大きい。また、治療したとしても、その後に再度発症してしまうケースもある。このように、PTSD に対する治療法は心理学的療法のみしかないのが現状であり、PTSD を初めとする恐怖記憶がベースとなった障害に対する新規かつ根本的な予防法と治療法の確立が望まれている。上述したように PTSD 発症の要因の 1 つに、過度な恐怖記憶の形成が挙げられる。そこで、本課題は恐怖記憶が形成される過程の 1 つである連合メカニズムに着目し、このメカニズムを明らかにする端緒として、連合に関与する脳領域の同定を行う。我々の提案により恐怖記憶の連合に関わる脳領域を特定することが出来れば、連合を特異的に制御する分子群の同定や、最終的には連合メカニズムの解明につながる。そこから、ターゲットとなる分子や細胞内シグナル経路に対する阻害剤や活性化剤などの薬剤の開発につながれば、恐怖記憶(CS-US 連合記憶)から場所記憶(CS 記憶)には影響を与えず、恐怖(US 記憶)のみを除くことが可能になる。このように本研究の成果は、

恐怖記憶の『連合』を標的とした精神疾患の発症機構や症状改善の研究・医療分野にも、記憶障害の観点から役立つ可能性がある。

3. 研究の方法

(1) Context Pre-exposure Facilitation Effect (CPFE) 課題を改良した新規行動実験系を用いた連合に関わる脳領域の検索

CPFE 課題とは、Context (CS)にさらされた直後に即時電気刺激(immediately shock; IS)を受け、そのまま取り出されると、CS-US 連合は成立しないが、以前に経験した Context (CS)で電気刺激(IS)を受けると、CS-US 連合が成立し、恐怖記憶が形成される課題である。

この課題を基に、本課題では図 1 に示すように 2 種の異なる Context にマウスを暴露し、その 30 分後に 0.8mA、2 秒間の即時電気刺激(US)を同じ Context (Paired 群)または異なる Context (Unpaired 群)で与え、さらに 24 時間後のマウスが恐怖を感じたときに示し、恐怖記憶の指標となる Freezing を測定した。

その結果、Paired 群は Unpaired 群に比べ、有意に高い Freezing を示し、Paired 群では CS-US 連合が成立し、恐怖記憶が形成されたと判断した(図 1)。

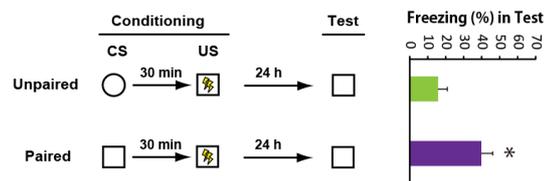


図 1 CPFE 課題を改良した新規行動実験系

一方、最初期遺伝子の 1 つである Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein)は神経細胞の活性化マーカーとして知られており、これまで恐怖記憶の形成に関与することが示されている。Arc は刺激に対して極めて高い発現誘導性を示し、学習 5 分後から核内で発現し、その 30 分後ではその局在は細胞質へ移行する特徴を持つ。そこで、マウスを上記図 1 の実験系に供し、Conditioning 時の即時電気刺激(US)を与えた 5 分後の Arc の局在を CatFISH (Cellular compartment analysis of temporal activity using fluorescence in situ hybridization)法により調べた。この方法を用いることで、CS 刺激由来の Arc は細胞質に、US 刺激由来の Arc は核に局在すると考えられる。また核と細胞質に Arc が局在する神経細胞が連合に関与する神経細胞であり、これらを指標に、CS および US に応答する脳領域を検索した。

(2) CS, US と CS-US に対する Parietal Association Cortex (PtA)の役割

本課題では、CS および US に応答する脳領域として Parietal Association Cortex (PtA)を発見した(4. 研究成果の(1)を参照)。

そこで、行動レベルで PtA が CS-US 連合を制御するかを確認するため、マウスの行動量「Motility」および「Freezing」を指標に CS、US および CS-US をそれぞれ評価する行動実験系を確立した。

実際には、マウスを Context (CS) に 6 分間暴露し、その場所を覚えさせた。その 30 分後にマウスを再度同じ Context (CS) に入れ、直後に 0.8mA、2 秒間の即時電気刺激を US として与え、ホームケージに戻した (CS-US 群)。そして、その 24 時間後に Test として、マウスを再度同じ Context (CS) に 3 分間入れ、「Motility」と「Freezing」の割合を測定した (図 2)。コントロールには Context (CS) に入れるが電気刺激を与えない CS 群と電気刺激のみを与えた US 群を用いた。もしマウスが箱を覚えていれば (CS 記憶が形成されていれば)、再度 Context (CS) に入れられた時の Motility は初めて入れられたときの Motility に比べて低下する。また、マウスが恐怖記憶を形成していれば高い Freezing を示す。

行動実験に供した結果、Test 時では Context のみに入れた CS 群は低い Motility を示し、CS 記憶が形成されていたと判断した。また、電気刺激のみを与えた US 群は高い Motility と低い Freezing を示し、CS 記憶と CS-US 記憶の両方が形成されていないことが示唆された。これに対し、CS-US 群は低い Motility と高い Freezing を示したことから、恐怖記憶が形成されていたことが示唆された (図 2)。

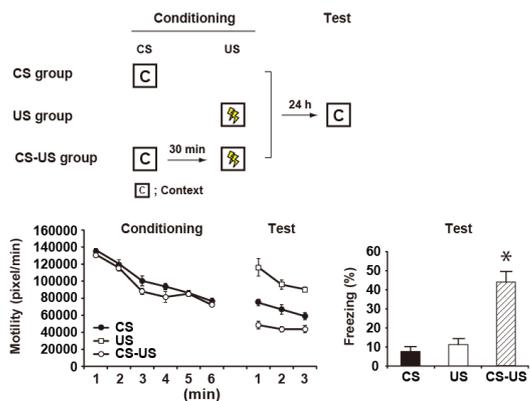


図 2 CS および CS-US を分けて評価する行動実験系

これらの結果から、「Motility」と「Freezing」の 2 つの指標を CS と CS-US を分けて評価できると判断した。

そこで、この実験系を利用し、ナトリウムチャンネルの阻害剤であるリドカインを PtA に直接注入することで、CS-US、CS への PtA の役割を解析した。

CS-US に対する PtA の役割を解析する行動実験系

マウスを Context (CS) に 6 分間暴露し、その場所を覚えさせた。その 20 分後に 0.5ul の 4%のリドカインを PtA に直接注入した。そして、さらに 10 分後に、マウスを再度同じ Context (CS) に入れ、直後に 0.8mA、2

秒間の即時電気刺激を US として与え、ホームケージに戻した。そして、その 24 時間後にマウスを再度同じ Context (CS) に 3 分間入れ、「Motility」と「Freezing」の割合を測定した。

CS に対する PtA の役割を解析する行動実験系

マウスの PtA にリドカインを直接注入し、その 10 分後に、マウスを Context (CS) に 6 分間暴露した。そして、さらに 24 時間後にマウスを再度同じ Context (CS) に 3 分間入れ、「Motility」を測定した。

Social interaction test を用いた US に対する PtA の役割を解析する行動実験系

Social interaction test とは評価するマウス (Test マウス) のケージに別のマウスを入れ、Test マウスが相手マウスに接触した時間を測定することで、動物の社会性行動を評価する行動実験系である。そこで本課題では、まず US として即時電気刺激を与え、24 時間後に 5 分間の Social interaction test を行い、US 刺激の社会的行動への影響を評価した。

その結果、US 刺激を受けたマウス群 (Shock (+) 群) は control 群である US 刺激を受けていないマウス群 (Shock (-) 群) に比べ、初めの 1 分間の interaction time の低下や初めて interaction するまでに要した時間が有意に短く、US 刺激は社会性行動に影響を与えることが示唆された (図 3)。

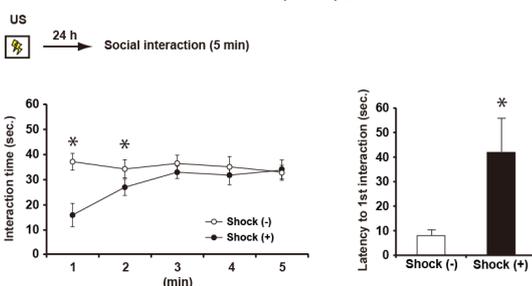


図 3 US 刺激は社会性行動に影響を与える

そこで、この条件を利用し、PtA にリドカインを直接注入した 10 分後に US 刺激を与え、その 24 時間後に 5 分間の Social interaction test を行うことで、PtA への US 刺激の入力がリドカイン投与によって阻害されているか否かを確認した。

(3) Optogenetics (光遺伝学的手法) を用いた CS-US 連合記憶の創出

PtA の CS-US 連合への役割を詳細に解析するため、光遺伝学的手法により PtA の活性を人為的に制御することで人工的 CS-US 連合記憶を創出可能かを検討した。

c-fos-tTA マウスについて

c-fos-tTA マウスは c-fos 遺伝子プロモーター制御下で tTA を発現するトランスジェニックマウスである。c-fos 遺伝子プロモーターは、神経活動依存的に遺伝子発現を誘導する。一方、tTA は、ドキシサイクリン (Dox) 非存在下で TRE 配列の下流の遺伝子発現を誘

導する転写活性化因子である。これらを組み合わせた c-fos-tTA マウスでは、恐怖記憶成立時に TRE 配列下流に組み込んだ遺伝子の発現を誘導できることが報告されている。

光遺伝学的手法(Optogenetics)について

チャンネルロドプシン 2(ChR2)は 470 nm 付近の青色光照射によって最も強く活性化される。青色光を受容すると非選択的陽イオンチャンネルが開閉し、その結果 ChR2 発現細胞は脱分極応答を示すことから、この機構を用いた光遺伝学的手法を人為的神経細胞活性化に利用する。

上記ことを踏まえ、本実験ではドキシサイクリン(Dox)を与えた、On Dox 条件下で c-fos-tTA マウスの PtA 領域にレンチウイルス感染により、TRE-ChR2-eYFP または control として TRE-eYFP トランスジーンをゲノムに導入する。その後、Dox を取り除いた、Off DOX 条件下で行動実験系(図 1、Unpaired 条件)に供し、CS への暴露に反応した神経細胞に ChR2-eYFP または eYFP を発現させる。その 24 時間後、On Dox 条件下で異なる Context において電気刺激(US)を与える時に光照射により CS に反応した特定神経細胞群の活性化を誘導し、CS と US を同調させる。24 時間後に、再度 CS へ暴露し、恐怖記憶が形成されたかを評価する(図 5)。上記に示したように、通常ではこの条件では CS-US 連合は成立しない。しかし、US を与える時に光照射により PtA 領域の活性化を誘導した場合に恐怖記憶が形成されれば、PtA 領域が連合を制御する領域であると推測される。

4. 研究成果

(1) Context Pre-exposure Facilitation Effect (CPFE) 課題を改良した新規行動実験課題を用いた連合に関わる脳領域の検索

CatFISH 法に供した結果、Paired 群では Unpaired 群に比べ、Parietal association cortex (PtA)において Arc mRNA が細胞質(Cyto)と核(Nuc)に局在する神経細胞数が有意に多いことを発見した(図 4)。この結果から、PtA 領域は CS および US の情報の両方が入力していること、さらに恐怖記憶連合時に PtA が強く応答することが示唆され、PtA は連合を制御している領域であることが示唆された。

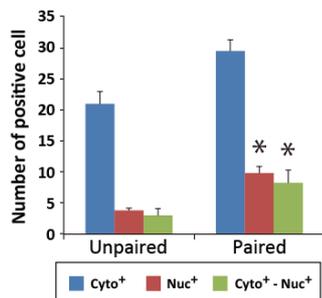


図 4 PtA は CS および US に応答する

(2) CS, US と CS-US に対する Parietal Association Cortex (PtA)の役割

PtA 領域の CS、US および CS-US 連合記憶に対する役割をナトリウムチャンネル阻害剤であるリドカインを用いた行動実験により評価した(図 5 - 図 7)。

CS-US に対する PtA の役割を解析する行動実験系

US を与える前にリドカインを投与した結果では、Lidocaine 群は control である PBS 群に比べ、Test 時において高い Motility と低い Freezing を示した。また、Lidocaine 群が Test 時に示した Motility は Training 時の最後の 1 分と同程度であることから CS 記憶は保持されていることが示唆された(図 5)。

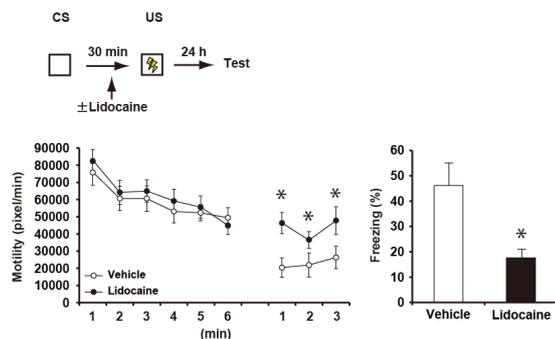


図 5 PtA は CS-US 連合を制御する

そこで、実際に CS 記憶は保持されているか否かを評価するための実験を行った。

CS に対する PtA の役割を解析する行動実験系

CS 記憶の形成前にリドカインを PtA 領域に注入した結果、両群ともに同程度の Motility を示し、両群とも場所を覚えており、CS 記憶が形成されていた(図 6)。

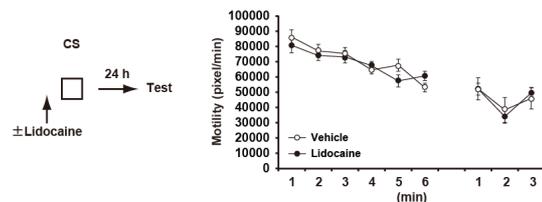


図 6 PtA は CS 記憶の形成には関与しない

この結果から、CS 記憶の形成には影響ないことが示唆された。

Social interaction test を用いた US に対する PtA の役割を解析する行動実験系

PtA にリドカインを直接注入し、US 刺激を受けたマウス群(Lidocaine-shock (+)群)は control の PBS を PtA へ注入し、US 刺激を受けなかったマウス群(PBS-shock (-)群)に比べ、Social interaction test において初めの 1 分間の interaction time は有意に短く、その長さは PBS を PtA へ注入し、US 刺激を受けたマウス群(PBS-shock (+)群)と同程度であった(図 7)。さらに、Lidocaine-shock (+)群が示した初めて interaction するまでに要した時間は(PBS-shock (-)群)に比べ、長い傾

向にあった。以上の結果から、PtA は US 刺激の入力には影響を与えないことが示唆された(図 7)。

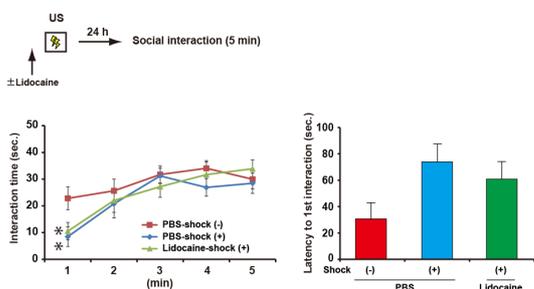


図 7 PtA は US 刺激の入力には影響を与えない

以上の ~ の結果より、PtA は CS-US 連合を特異的に制御する領域であることが示唆された。

(3) Optogenetics(光遺伝学的手法)を用いた CS-US 連合記憶の創出

Test 時に Freezing を測定した結果、Context (CS)に応答した神経細胞に ChR2 を発現させ光照射しながら US 刺激を与えたマウス群(ChR2-optical stimulation (+)群)は ChR2 を発現させ光照射を行わなかった群(ChR2-optical stimulation (-)群)や ChR2 を発現させず光照射を行った群(eYFP-optical stimulation (+)群)に比べ、高い Freezing を示し、人工的 CS-US 連合記憶が創出された。この結果から、PtA の活動を人為的に操作することで CS-US 連合を制御することが可能であることが示唆された(図 8)。

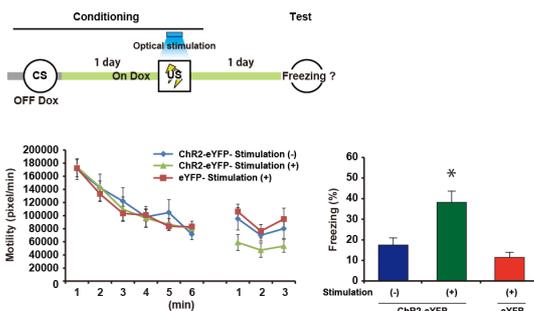


図 8 PtA 活性を人為的に制御することで人工的 CS-US 記憶が創出可能である

以上、本課題では PtA は CS-US 連合を特異的に制御すること。また、PtA の活性を人為的に制御することで新たな CS-US 連合記憶を創出可能であることを発見した。

<引用文献>

Frankland, P.W., Josselyn, S.A., Anagnostaras, S.G., Kogan, J.H., Takahashi, E. & Silva, A.J. : Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus*, 14: 557-569, 2004.

Guzowski, J.F., Lyford, G.L., Stevenson,

G.D., Houston, F.P., McLaugh, J.L., Worley, P.F. & Barnes, C.A. : Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J. Neurosci.*, 20 : 3993-4001, 2000.

Marrone, D.F., Schaner, M.J., McNaughton, B.L., Worley, P.F. & Barnes, C.A. : Immediate-early gene expression at rest recapitulates recent experience. *J. Neurosci.*, 28 : 1030-1033, 2008.

Guzowski, J.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A. & Worley, P.F. : Imaging neural activity with temporal and cellular resolution using FISH. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11 : 579-584, 2001.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木章円、Parietal association cortex は文脈性恐怖記憶の CS-US 連合を制御する、第 38 回日本神経科学大会、2015.7.28、兵庫・神戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 章円 (SUZUKI, Akinobu)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教
研究者番号：40424684

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：