

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25115003

研究課題名(和文) 記憶情報を担う細胞集団の時空間的变化の解析

研究課題名(英文) Analyses of dynamism of neuronal ensembles in memory

研究代表者

松尾 直毅 (Matsuo, Naoki)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10508956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 56,500,000円

研究成果の概要(和文)：変化し続ける外界環境に動物が適応するために、記憶が獲得後も様々な要因により柔軟に変化することが必要であると考えられるが、この動的な変化(記憶ダイナミズム)の仕組みに関する研究はほとんど手付かずの状態である。そこで本研究では、活動痕跡細胞の可視化・操作が可能な遺伝子改変マウスを軸に、行動実験、神経活動操作、解剖学的可視化、in vivo神経活動記録を駆使し、脳内で記憶情報が時間経過とともに汎化したり、消去される際にダイナミックに変化していく様子を捉え、その神経基盤の一部を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dynamism of memory is crucial for animals to adapt to ever-changing environments. However, the underlying mechanisms are poorly understood. Thus, we studied the dynamism of neuronal ensembles in memory by using a combination of cutting edge modern tools including transgenic mice to manipulate specific active neuronal ensembles, behavioral analyses, opto/chemogenetics, and in vivo imaging of neuronal activity in the brain. We monitored the changes of neuronal ensembles when contextual fear memory was generalized or extinguished and found some underlying neuronal mechanisms.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 マウス

### 1. 研究開始当初の背景

動物の脳が有する記憶システムはコンピューターのハードディスクのように情報を忠実に記録するだけの装置とは異なり、いったん獲得された後も、その情報が様々な外的・内的要因に依存してダイナミックに変化する点に大きな特徴がある。この仕組みにより、動物は刻々と変化する環境に適応して生存していくことが可能となり、また、このような柔軟性と曖昧さを含んだシステムのおかげでヒトの創造やひらめきが産み出されるのかもしれない。しかし、現在の記憶研究は未だ記憶が獲得・固定される初期段階のメカニズムの解明に力が注がれており、獲得後の動的な変化に関する研究は未だ手付かずの状態であると言っても過言では無い。

記憶情報は、脳内に散在し協調的に活動する神経細胞間の機能的ネットワークとして存在すると考えられているため (cell assembly 仮説) 千億個もの神経細胞から構成される動物の脳内でそれらを同定することや、その神経活動を選択的に制御することは極めて困難である。そこで、研究代表者らは世界に先駆けて任意の時期に任意の行動刺激により活動した細胞集団のみに、任意の遺伝子操作を行うことが可能なトランスジェニックマウスの開発に成功した。このマウスは、その発現が神経活動依存的に迅速かつ一時的に誘導されることが知られている Immediate-Early Genes (IEGs) のひとつ *c-fos* 遺伝子のプロモーターとテトラサイクリン誘導発現系を組み合わせることにより得た。このシステムを活用することにより、「記憶という実体の捉えがたい現象」と「機能的細胞集団 (cell assembly) の活動」の因果関係が個体レベルで実証され、ようやく記憶というものを特定の細胞集団の活動と捉えた研究を進展させる基盤が築かれた。

### 2. 研究の目的

研究代表者らが開発した活動痕跡細胞の可視化・操作が可能な遺伝子改変マウスを軸に、行動実験、神経活動操作、解剖学的可視化、*in vivo* 脳内活動記録を駆使し、(1) 活動痕跡細胞を操作する遺伝子改変マウスの改良・開発、(2) 記憶情報を担う神経細胞集団の時空間的变化の解析を行う。これら一連の研究により、哺乳類の脳内で記憶情報が時間経過や外界情報に対応してダイナミックに変化していく様子を捉え、その実体と仕組みを理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、いったん獲得された記憶が不安定化、再固定化、連合、一般化、消去などの行動学的に検出されるダイナミックな変化を起こす前後で、脳内の細胞活動のパターンやネットワークにいかなる変化が生じるのかを検証することから始める。学習課題としては主に文脈依存的恐怖条件付け学

習を用いて、申請者らが開発した“時間的に離れた2点での神経活動を同一個体の脳内において可視化”することのできる活動履歴可視化マウスや、無麻酔下で行動中のマウスの多数の神経細胞の活動を同時に観測することのできる *in vivo* 脳内活動記録などの手法を組み合わせた解析を行う。これらの手法を用いて記憶ダイナミズムに伴う脳内変化を捉え、脳内のどの領域のどの細胞で、どのような変化が生じるのか? などの問題を明らかにすることにより、その神経基盤の解析を行う。

さらに、上記の研究を推進するために必要な新たな遺伝子改変マウスの開発・改良もアデノ随伴ウイルスベクターによる局所遺伝子導入とも組み合わせる。

### 4. 研究成果

学習時に働いた神経細胞群 (神経アンサンブル) のシナプス伝達をテタヌス毒素により一時的に遮断することが可能な遺伝子改変マウス (*c-fos*-tTA x *tetO*-EGFP TeNT ダブルトランスジェニック) を作製した。このマウスに文脈依存的な恐怖条件付け学習訓練を実施し、学習時に働いた神経アンサンブルに選択的にテタヌス毒素の発現を誘導した。翌日の記憶の想起テストに障害が認められたことから、学習時に活動した神経アンサンブルの活動が記憶の想起に必要であるという因果必要性が示された。さらに、野生型マウスでは再学習訓練により記憶の増強 (すくみ反応の増加) が認められたが、トランスジェニックマウスでは最初の学習時に活動した神経アンサンブルのシナプス伝達を抑制した状態で同じ学習訓練を再び行っても記憶の強化が起こらないことを見出した。一方、上記と異なる文脈において学習訓練を実施した場合は、その文脈依存的恐怖記憶を獲得し、想起することができたことから、異なる学習には異なる神経アンサンブルが使用されることが示された。さらに、これらの結果は、いったん記憶情報が割り当てられた神経細胞の組み合わせが、同じ学習を行う際にも再び使われ、代替え補償が効かない仕組みが脳内に存在することを示唆する。記憶の強化や定着には反復学習が有効であることが知られているが、今回の発見は、それを担保する仕組みと考えられる (Matsuo, *Cell Rep.* 2015)。

記憶ダイナミズムの一例として記憶の汎化に着目した研究を行った。文脈恐怖条件付け学習課題の1日後では、条件付けが行われた文脈 A では恐怖記憶の想起 (すくみ反応) が誘導されるが、マウスは文脈の違いを区別して、異なる文脈 B では恐怖記憶の想起が誘導されない。しかし、学習9日後の想起テストでは、文脈 A と B のどちらにおいても顕著な恐怖記憶の想起が誘導されることを見いだした。つまり、時間の経過に伴って記憶の

汎化という記憶の動的変化が生じたことを示唆する。そこで、この記憶の汎化の神経基盤を明らかにするために、時間軸に沿った活動神経アンサンプルの変化を捉えることを試みた。そのために独自の神経活動履歴可視化マウス (*Science* 2007) を利用した。このマウスを用いて学習課題時に活動した神経アンサンプルを tau-lacZ で遺伝学的に標識し、想起時に活動したアンサンプルを同一個体脳内において内在性の ZIF の発現で標識した。tau-lacZ と ZIF の両方で標識される細胞は想起時に再活動した細胞ということになる。記憶の汎化が生じない学習課題一日後に文脈 A に入れられたマウスの体性感覚野や海馬 CA1 領域では同じ神経アンサンプルが再活動する傾向が認められた。興味深いことに、海馬歯状回では文脈 B に入れられた場合に、積極的に異なる神経アンサンプルが活動することを示す結果が得られた。いずれの場合も、体性感覚皮質、海馬 CA1、歯状回において、神経アンサンプルの活動レベルで二つの異なる文脈情報を区別していることが示唆される。しかし、記憶の汎化が行動レベルで観察される 9 日後に同様の解析を行った結果、海馬 CA1 領域と歯状回において、活動アンサンプルの特徴的な選択性が失われていた。体性感覚皮質では依然として二つの文脈の違いを区別している結果が得られた。これらの結果から、記憶の想起時に海馬（もしくは感覚皮質から海馬にいたる経路）における神経アンサンプルの活動変化が記憶の汎化の基盤であることが示唆された (Yokoyama & Matsuo, *Front Behav Neurosci* 2016)。

獲得された恐怖記憶は、PTSD 患者に対する暴露療法モデルである記憶消去訓練により消失する。しかし、この見かけ上の記憶の消失に伴って細胞集団レベルでの記憶痕跡も消し去られているのであろうか？この記憶のダイナミズムに関する基本的な疑問に答えるために、恐怖条件付け記憶の消去訓練後に、恐怖記憶の学習時に活動した細胞集団を DREADD (特定の合成リガンドにより活性化する人工受容体) を用いて人為的に再活動させた。その結果、マウスは外部からの条件刺激が存在しないにも関わらず、すくみ反応 (恐怖記憶の想起の指標) が誘導された。つまり、恐怖記憶の痕跡の少なくとも一部は消去訓練に耐性であり、それらの細胞集団の再活動が恐怖記憶を再生するのに十分であることが示唆された (Yoshii, Hosokawa, Matsuo, *Neuropharmacology* 2017)。

#### 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 6 件)

Kitanishi T, Matsuo N.  
Organization of the

Claustrum-to-Entorhinal Cortical  
Connection in Mice.

*J Neurosci.* 2017;37(2):269-280. 査読有  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1360-16.2016.

Yoshii T, Hosokawa H, Matsuo N.  
Pharmacogenetic reactivation of the  
original engram evokes an extinguished  
fear memory.

*Neuropharmacology.* 2017;1-9. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.09.012

Yokoyama M, Matsuo N.  
Loss of Ensemble Segregation in Dentate  
Gyrus, but not in Somatosensory Cortex,  
during Contextual Fear Memory  
Generalization.

*Front Behav Neurosci.* 2016;10:218. 査読有  
DOI: 10.3389/fnbeh.2016.00218

Matsuo N.  
Irreplaceability of Neuronal Ensembles  
after Memory Allocation.

*Cell Rep.* 2015;11(3):351-7. 査読有  
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.03.042

〔学会発表〕(計 30 件)

Naoki Matsuo  
The 3rd Karolinska Institutet-Osaka  
University Joint Symposium  
「Manipulating Neuronal Ensembles in  
Memory」

平成 30 年 2 月 1 日、Stockholm, Sweden

松尾直毅

第 1 回これからの神経回路研究会

「記憶神経回路の研究」

平成 30 年 1 月 27 日、吹田市

Naoki Matsuo

第 40 回日本分子生物学会 (生命科学系学会  
合同年次大会) シンポジウム

「Manipulating Neuronal Ensembles in  
Memory」

平成 29 年 12 月 6 日、神戸市

松尾直毅

第 36 回日本認知症学会 シンポジウム

「記憶に関わる神経アンサンプルの可視化  
と人為的操作」

平成 29 年 11 月 25 日、金沢市

松尾直毅

第 6 回大阪大学神経難病フォーラム

「恐怖記憶の消去と記憶痕跡」

平成 29 年 8 月 19 日、吹田市

松尾直毅

九州大学生体防御医学研究所 第 745 回生医  
研セミナー

「遺伝子改変マウスを用いた記憶の脳内表  
現の可視化と操作」

平成 29 年 8 月 17 日、福岡市

Naoki Matsuo

Spring Hippocampal Conference 「Neuronal  
ensembles in memory」

「Dynamism of Neuronal Ensembles during  
Memory Generalization」

平成 29 年 6 月 13 日、Taormina, Italy

松尾直毅

国立長寿医療研究センター CAMD セミナー

「遺伝子改変マウスを用いた記憶の脳内表  
現の可視化と操作」

平成 29 年 5 月 25 日、大府市

Naoki Matsuo

第 94 回日本生理学会大会 シンポジウム

「Observation and Manipulation of Memory  
Engram」

平成 29 年 3 月 28 日、浜松市

松尾直毅

立命館大学システム視覚科学研究センター  
セミナー

「記憶情報の脳内表現の可視化と操作」

平成 29 年 2 月 9 日、草津市

Naoki Matsuo

NIPS International Workshop 「Towards  
elucidation of memory engram」

「Visualization & Manipulation of Memory  
Engram」

平成 28 年 12 月 5 日、岡崎市

Naoki Matsuo

The 47th NIPS International Symposium  
「Decoding Synapses」

「Visualization & Manipulation of Memory  
Engram」

平成 28 年 10 月 26 日、岡崎市

松尾直毅

第 131 回関西実験動物研究会

「実験動物としてマウスを用いた記憶学習  
の仕組みの研究」

平成 28 年 9 月 10 日、吹田市

松尾直毅

第 5 回大阪大学神経難病フォーラム

「恐怖記憶の汎化に伴う活動神経アンサン  
ブルの変化」

平成 28 年 8 月 20 日、吹田市

松尾直毅

生理学研究所 部門公開セミナー

「記憶情報の脳内表現の可視化と操作」

平成 28 年 6 月 16 日、岡崎市

Naoki Matsuo

遺伝研研究会 「Circuit construction in the  
mammalian brain」

「Genetic Manipulation of Memory Engram」

平成 27 年 12 月 6 日、三島市

Naoki Matsuo

Memory Dynamism International Symposium

「Visualization of Memory Dynamism in  
Mice」

平成 27 年 11 月 6 日、京都市

松尾直毅

第 9 回大阪大学未来医療セミナー

「記憶情報の脳内表現の可視化と操作」

平成 27 年 9 月 30 日、吹田市

松尾直毅

第 45 回日本精神神経薬理学会・第 37 回日  
本生物学的精神医学会 合同年会 シンポ  
ジウム

「記憶の汎化に伴う活動神経アンサンブル  
の変化」

平成 27 年 9 月 26 日、江戸川区

Naoki Matsuo

第 58 回日本神経化学学会大会 シンポジウ  
ム

「Genetic manipulation of memory engram」

平成 27 年 9 月 13 日、さいたま市

松尾直毅

大阪大学理学部生物科学セミナー

「記憶の脳内表現の可視化と操作」

平成 27 年 9 月 4 日、豊中市

松尾直毅

第 4 回大阪大学神経難病フォーラム

「遺伝子改変マウスを用いた記憶痕跡の活  
動操作」

平成 27 年 7 月 25 日、吹田市

松尾直毅

第 9 回新適塾「脳はおもしろい」

「記憶の脳内表現の可視化と操作」

平成 27 年 6 月 24 日、豊中市

Naoki Matsuo

第 92 回日本生理学会大会 シンポジウム

「Visualization of Neural Representations  
of Memory」

平成 27 年 3 月 22 日、神戸市

Naoki Matsuo

第 88 回日本薬理学会年会 シンポジウム

「Dynamic Changes in Hippocampal Ensemble  
Activities Associated with Contextual  
Fear Memory Generalization」

平成 27 年 3 月 19 日、名古屋市

Naoki Matsuo

筑波大学 人間総合科学研究科 感性認知脳科学専攻 第 44 回「こころ」の科学セミナー

「Visualization and manipulation of memory engram」

平成 27 年 1 月 8 日、つくば市

Naoki Matsuo

第 37 回日本神経科学大会 シンポジウム  
「Manipulation of Memory Engram Using Chemical Genetics」

平成 26 年 9 月 12 日、横浜市

松尾直毅

第 3 回大阪大学神経難病フォーラム

「情動記憶の脳内表現と制御」

平成 26 年 8 月 9 日、吹田市

松尾直毅

生理学研究所 研究会「情動研究会」

「情動記憶の脳内表現と表出の制御」

平成 25 年 9 月 3 日、岡崎市

Naoki Matsuo

第 36 回日本神経科学大会 シンポジウム  
「Approach for Understanding the Mechanism Linking Multimodal Information to Emotional Behavior」

平成 25 年 6 月 20 日、京都市

〔図書〕(計 3 件)

松尾直毅

恐怖記憶の弁別と汎化に伴う海馬歯状回神経アンサンプル活動

日本薬理学雑誌 148, 185-189 (2016)

日本薬理学会

北西卓磨、松尾直毅

海馬体-嗅内皮質における空間認知システム  
ライフサイエンス領域融合レビュー 4, e001 (2015)

ライフサイエンス統合データベースセンター

松尾直毅

記憶痕跡の可視化と操作より探る記憶情報の脳内表現

ブレインサイエンスレビュー 2014 233-250 (2014)

クバプロ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mbn.med.osaka-u.ac.jp/mbn/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 直毅 (MATSUO, Naoki)

大阪大学・大学院医学系研究科・独立准教授

研究者番号 : 10508956

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

小林 暁吾 (KOBAYASHI, Kyogo)

元山 真由美 (MOTOYAMA, Mayumi)