

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04419

研究課題名(和文) 自発的物体再認にもとづく海馬の記憶機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of the hippocampal memory functions using spontaneous object recognition

研究代表者

一谷 幸男 (ICHTANI, Yukio)

筑波大学・人間系・教授

研究者番号：80176289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：自発的物体再認とは、動物が見慣れた物体よりも新奇な物体をより多く探索する生得的な傾向であり、これを利用して海馬の記憶機能を調べた。海馬のグルタミン酸NMDA受容体が、近時の記憶の想起よりも遠い記憶の想起にとって重要であること、その役割は記憶痕跡が弱まったときの方が大きい可能性、時間順序の記憶においても重要であること、さらに海馬の蛋白質新規合成が、物体位置の記憶を固定する段階で重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳辺縁系の海馬は、ヒトを含む広範な動物の記憶・学習に不可欠の役割を果たすといわれる。本研究では、従来多くの研究で用いられてきた記憶課題とは異なり、特別の訓練や動機づけを必要とせず、動物が自発的にその場面に置かれた物体を探索するという行動を利用して記憶能力を測定することで、いくつかの新たな知見を得た。特に海馬のグルタミン酸受容体の1つであるNMDA受容体が、近時と遠隔の記憶の想起に関わるか、時間順序の記憶に関わるのか、さらに物体位置の再認では海馬の蛋白質合成が、記憶のどの段階で役割を果たすのかが示唆された。記憶研究における自発的物体再認テストの有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：Spontaneous object recognition, animals' innate tendency to explore the novel object more than the familiar object, was used to investigate the role of hippocampus in memory function. Glutamatergic NMDA receptors in the hippocampus were suggested to be more important for retrieval of remote memory than that of recent memory, and also important for temporal order memory. Furthermore, hippocampal de novo protein synthesis was suggested to be required for the consolidation of object place memory.

研究分野：行動神経科学、実験心理学

キーワード：記憶 海馬 自発的物体再認 新規蛋白質合成 時間順序記憶 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内側側頭葉・海馬切除手術を受けた患者の事例 (H.M.) における重篤でかつ選択的な記憶障害の報告 (Scoville & Milner, 1957) 以来、人の記憶機能に関わる脳内部位については、記憶の種類に応じてある程度の機能局在が明確に存在することが指摘されてきた。海馬や内側側頭葉は、主にエピソード記憶を中心とする顕在的・宣言的な記憶が長期記憶として形成されるために不可欠の部位であり、一方、手続き記憶 (習慣、技能等) や情動記憶等の潜在的・非宣言的な記憶にはそれほど重要な役割を担っていないと考えられている (Eichenbaum, 2003)。

しかし、人における内側側頭葉損傷患者の健忘症と、サル、ラット等の海馬損傷動物における記憶障害では、障害の特徴や程度が一致しない点も多く、記憶機能における海馬の役割と関与の仕方についてはいまだ議論的である。これらの見解の不一致の背景には、これまで動物の記憶をテストするために用いられてきた記憶課題の問題がある。ラットでは、記憶課題といえば迷路学習であったり、恐怖条件づけ、能動的あるいは受動的な回避学習の場面が圧倒的に多く、これらの場面で測定されてきた記憶が、はたして海馬・側頭葉部位の損傷による人の健忘症で生じるエピソード記憶や意味記憶の障害に類似した記憶を測定できていたのか、という疑問がある。

本研究は、自発的物体再認あるいは自発的物体位置再認という、生活体が生得的にもつ新奇な刺激への探索傾向を利用して、これまで古くから人や動物の記憶・学習に深く関わるとされてきた大脳辺縁系の海馬の機能について、再検討するものである。

2. 研究の目的

生活体は新奇な刺激に対して興味を示し、見慣れた刺激よりも多く探索する。この傾向を利用して記憶能力を調べるのが自発的物体再認テストである。自発的物体再認を用いる記憶測定では、報酬や罰による明瞭な動機づけを必要としない、長期の訓練を要しない、動物にストレスを負荷しない等の特徴があり、従来の記憶課題を用いた海馬機能評価における問題点を克服できる可能性がある。本研究の目的は、ラットの自発的物体再認テストやそれを改変したテストを用いて、訓練や特別の動機づけをせずに海馬の機能を解明することである。

3. 研究の方法

本研究では3つのテーマについて検討した。(1)近時記憶と遠隔記憶の検索過程における海馬の関与を調べるため、長短の遅延を挿入した自発的物体再認テストを実施し、海馬グルタミン酸 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬投与の効果を検討した。(2)海馬の蛋白質合成の役割を、自発的物体再認を改変した自発的物体位置再認テストにより検討した。(3)時間順序の記憶における海馬の役割を調べるため、自発的物体再認を利用して時間順序記憶テストを行い、NMDA 受容体拮抗薬投与の効果を検討した。

自発的物体再認テストの場面では、成体の Wistar-Imamichi 系ラットを被験体とし、物体提示場面としてアリーナ (90 x 90cm、壁の高さ 40cm) と複数の 3次元物体を用いた。被験体には以下のような3つの期間を経験させた。【見本期】2つの同じ物体をアリーナ内に置き、ラットに自由に探索させた。【遅延期】ラットをアリーナから取り出し、待機場所に入れた。

【テスト期】見本期に用いた2つの物体のうち、片方(A)はそのままとし、他方は別の物体(B)に入れ替えた。物体Aと物体Bが置かれた状況でラットを再びアリーナに戻し、各物体に対する探索時間を測定した。弁別率を指標として、ラットがどの程度見本期にすでに出会った物体に比べて、新奇な方の物体を探索したか評価した。通常、多くの動物は明らかに新奇な物体に対する探索への偏り(選好)を示す。見本期においては2つの物体(A,A)への探索時間はほとんど差がなく、テスト期において提示された2つの物体(A,B)に対する探索の偏りは、見本期に物体Aを経験したことの影響と考えられ、そこに動物の記憶が反映される。

なお、この方法を改変して、下記の研究成果(2)では自発的物体位置再認テストを、研究成果(3)では自発的物体再認にもとづく時間順序記憶テストを、実施した。

4. 研究成果

(1) 近時記憶と遠隔記憶の検索における海馬グルタミン酸 NMDA 受容体の関与の検討

アリーナ内2か所に同一の物体(缶、鋳物、ガラス等)を配置し(A,A)ラットを一定の時間(5分間を5回)自由に探索させた(見本期)。その後一定の時間(遅延期)経過の後、テスト期には片方の物体のみを新奇な物体に置き換え、2つの物体(見慣れた物体と新奇な物体、A,B)に対する接近(探索)行動を記録し(5分間)弁別率(新奇物体への探索傾向の強さ)を求めた。[(新奇物体への探索時間/2つの物体への総探索時間) x 100](%)を弁別率と定義し、理論値(50%)との有意差検定により見本期の物体情報の記憶の指標とした。

近時記憶と遠隔記憶における海馬グルタミン酸受容体の1種、NMDA受容体の関与を調べるため、あらかじめ両側の背側海馬に麻酔下でカニューレを装着したラットに、1日から6週間の遅延時間条件を設定し、テスト期(記憶の検索過程)の直前に、NMDA受容体拮抗薬 AP5 または溶媒を投与して受容体を一時的に不活性化した。

その結果、1)1日から1週間の遅延ではNMDA受容体を遮断しても新奇な物体への探索の多いが(弁別率65%以上)、3週間の遅延ではNMDA受容体を遮断すると弁別率が50%に減少してしまうこと、2)見本期の時間をさらに短く設定すると(5分間を2回)、NMDA受容体遮断

の効果が1週間の遅延でも出現することが、見出された。以上から、海馬グルタミン酸 NMDA 受容体の関与は遅延時間の長さに依存しており、自発的物体再認の近時記憶の検索には重要ではないが、遠隔記憶の検索にとって重要であることが示唆された。さらにその役割は、記憶痕跡が弱まったときの方が大きい可能性が示唆された。

(2) 自発的物体位置再認テストを用いた海馬の新規蛋白質合成の役割の検討

物体自体は変化しないがその位置が変化する、自発的物体位置再認テストを実施し、この記憶における海馬の蛋白質新規合成の役割を、蛋白質合成阻害薬を海馬投与することによって検討した。

アリーナ内の2か所に同一の物体(A,A)を配置した。ラットを一定の時間自由に探索させ(見本期)、その後待機ケージに戻した(遅延期)。2つの物体そのものは変わらないが、一方の物体のみをアリーナ内の別の(新奇な)位置に置き換えた状態でラットをアリーナに戻し(テスト期)2つの物体(見慣れた位置の物体と、新奇な位置の物体、A,A')に対する接近(探索)行動を測定した。弁別率は、 $[(\text{新奇位置物体への探索時間} / 2 \text{つの物体への総探索時間}) \times 100]$ (%)として算出し、理論値(50%)との有意差検定により見本期の物体位置情報の記憶の証拠とした。

見本時間は15分(1回)、遅延期は6時間、テスト期は5分とした。海馬への蛋白質合成阻害薬(薬物名:アニソマイシン)局所投与は、見本期の30分前()、見本期の直後()、またはテスト期の30分前()とした。遂行(弁別率)への影響を調べることにより、海馬内の新規蛋白質合成がそれぞれのタイミング、すなわち物体位置の記憶の記録、固定、検索段階において必要とされているのかどうかの検討を行った。

その結果、見本期の前()、または見本期の直後()に蛋白質合成阻害薬を投与した場合は、弁別率が50%近くまで低下したが、テスト期の前()に投与しても影響がなかった。また、遅延期が5分という短い条件のテストでは、蛋白質合成阻害薬投与はなんら影響がなかった。以上から、長期の空間記憶のテストとして自発的物体位置再認を用いた場合、海馬の新規蛋白質合成が記憶固定に重要であること、一方で記憶検索のためには不可欠でないことが示唆された。

(3) 時間順序記憶における海馬グルタミン酸 NMDA 受容体の関与の検討

時間順序記憶を評価するテストとして、自発的物体再認を用いた。これは動物に複数の物体を順に探索させた後、そのうちの2つを対にして提示すると、より後で(時間的に新しく)出会った刺激に比べ、より以前に(時間的に古く)提示された物体を多く探索するという生得的傾向を利用したものである。海馬 NMDA 受容体遮断が、ラットの自発的物体再認における時間順序記憶に及ぼす効果を調べた。

アリーナ内の2か所に同一の物体を配置し(A,A)、ラットを3分間自由に探索させ、その後2分間待機ケージに置いた。第2の物体を同様に3分間探索させ(B,B)、再び2分間待機させた。これを繰り返して、第5の物体(E,E)まで提示した(見本期)。遅延期(2分間)の後のテスト期では、見本期に示した5つの物体のうち2つを選んで対にして置き(B,D)、ラットを3分間自由に探索させて、各物体に対する接近(探索時間)を測定した。テスト期の弁別指標は、 $[(\text{より古い物体の探索時間} - \text{より新しい物体の探索時間}) / 2 \text{つの物体への探索時間の合計}]$ として、理論値(0)との有意差検定により時間順序記憶の証拠とした。

受容体の一時的な不活性化をするためのカニューレ埋め込み手術を行い、見本期の直前に NMDA 受容体拮抗薬 AP5、または溶媒をランダムな順で両側の海馬に投与して受容体を一時的に不活性とし、テスト期の物体探索行動を比較した。

その結果、溶媒投与条件ではより古く提示された物体への探索の偏り(選好)を示したのに対して、薬物の用量依存的に弁別指標の値が低下することがわかった。したがって、時間順序記憶に海馬グルタミン酸 NMDA 受容体が役割を果たす可能性が示唆された。

<引用文献>

- Scoville, W.B. & Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20:11-21.
- Eichenbaum, H. (2003) Learning and memory: brain systems. In "Fundamental Neuroscience," 2nd ed (L. Squire et al., eds.). Amsterdam, Academic Press.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- 梶田麻菜美・山田一夫・一谷幸男 (2019) ラットの自発的物体再認記憶に及ぼす内側前頭前野損傷の効果 筑波大学心理学研究 57: 1-9. 査読有
- Hatakeyama, T., Sugita, M., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2018) Temporal order memory of the rat in spontaneous object recognition: effects of number of items, exposure interval, and retention time. *Learning & Memory*, 25: 574-579. 査読有
- Toyoshima, M., Yamada, K., Sugita, M. & Ichitani, Y. (2018) Social enrichment improves social recognition memory in male rats. *Animal Cognition*, 21: 345-351. 査読有
- Ueno, M., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2017) The relationship between fear extinction and

resilience to drug-dependence in rats. *Neuroscience Research*, 121: 37-42. 査読有
Yamada, K., Arai, M., Suenaga, T. & Ichitani, Y. (2017) Involvement of hippocampal NMDA receptors in encoding and consolidation, but not retrieval, processes of spontaneous object location memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 331: 14-19. 査読有
Ozawa, T., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2017) Differential requirements of hippocampal *de novo* protein and mRNA synthesis in two long-term spatial memory tests: spontaneous place recognition and delay-interposed radial maze performance in rats. *PLOS ONE*, 12(2): e0171629. 査読有
Iwamura, E., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2016) Involvement of hippocampal NMDA receptors in retrieval of spontaneous object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 307: 92-99. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

Yamada, K., Sugita, M., Iwamura, E. & Ichitani, Y. (2019) Hippocampal NMDA receptors are involved in non-spatial memory only under high memory load condition in rats. Third Sino-Japan Symposium on the Frontier of Behavioral Neuroendocrinology. Tsukuba, Japan.
畠山太一・山田一夫・一谷幸男 (2018) 背側海馬 NMDA 受容体拮抗薬投与がラットの自発的物体再認における時間順序記憶に及ぼす効果 第48回日本神経精神薬理学会年会
Toyoshima, M., Sugita, M., Ichitani, Y. & Yamada, K. (2018) Social enrichment enhances, while social isolation impairs, social recognition memory in male rats. 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, CA, USA.
上野将玄・山田一夫・一谷幸男 (2018) ラットにおけるストレスレジリエンスと物体・位置再認課題の関連 日本心理学会第82回大会
梶田麻菜美・山田一夫・一谷幸男 (2018) ラットの自発的物体再認記憶に及ぼす内側前頭前野損傷の効果 日本心理学会第82回大会
Hatakeyama, T., Furuie, H., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2017) Spontaneous novel object recognition, object location recognition, and temporal order discrimination in rats neonatally treated chronically with MK-801. 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington, DC, USA.
Toyoshima, M., Sugita, M., Ichitani, Y. & Yamada, K. (2017) Social enrichment enhances social, but not object, memory span of rats. 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington, DC, USA.
畠山太一・山田一夫・一谷幸男 (2017) ラットの自発的物体再認における時間順序記憶に及ぼす見本物体提示間隔の影響：見本提示項目数が2の場合 日本心理学会第81回大会
Hatakeyama, T., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2016) Effects of inter-presentation interval in the sample phase and retention interval on the temporal order memory using spontaneous object recognition paradigm in rats. 日本動物心理学会第76回大会

〔図書〕(計0件)

〔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：
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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ichitani lab/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山田 一夫

ローマ字氏名：(YAMADA, kazuo)

所属研究機関名：筑波大学

部局名：人間系

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30282312

(2)研究協力者

研究協力者氏名：梶田 麻菜美

ローマ字氏名：(SUGITA, manami)

研究協力者氏名：小澤 貴明

ローマ字氏名：(OZAWA, takaaki)

研究協力者氏名：岩村 越史

ローマ字氏名：(IWARURA, etsushi)

研究協力者氏名：畠山 太一

ローマ字氏名：(HATAKEYAMA, taichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。