

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14930

研究課題名(和文) 記憶痕跡の動態解析と操作による恐怖記憶消去機構の解析

研究課題名(英文) The mechanisms of extinction of fear memory by dynamism analysis and manipulation of memory engram.

研究代表者

金 亮(Kim, Ryang)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：60793916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、記憶情報を担う記憶痕跡の観点から、恐怖記憶消去のメカニズムを明らかにすることを目的とした。記憶痕跡細胞を標識・操作可能な遺伝子改変マウス、および光遺伝学的手法を用いた解析から、同一脳内において、恐怖と消去の両方を制御する細胞群を有する脳領域と別々に制御する細胞群を有する脳領域の両者が共存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

恐怖と消去の両方を担う神経細胞集団が存在するという可能性は、この細胞集団に着目し、転換を制御し、消去誘導に関わる分子実態を明らかにする研究に発展する可能性があり、このことは、消去が心的外傷後ストレス障害といった疾患の治療標的として注目されているが、将来有効な治療薬開発の基礎研究として発展する可能性もある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the mechanisms of fear memory extinction from the memory engram level. Using a transgenic mouse line that can label and manipulate memory engram cells, and optogenetics, we found the brain regions which control both fear and extinction, or either fear or extinction.

研究分野：神経生化学

キーワード：恐怖記憶消去 記憶痕跡 光遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、記憶がどのように保持・想起されるかの研究が急速に発展してきた。特に、活動した神経細胞を標識する技術により、記憶形成時に活動した神経細胞群の神経活動は記憶想起に必要であり十分であること、すなわち、記憶痕跡は、特定の神経細胞群にあることが分かってきた(Liu et al., Nature, 2012)。この細胞群は記憶痕跡細胞と呼ばれる。

恐怖記憶を想起した際、通常は恐怖反応を伴うが、想起しても恐怖反応を必要としない条件に置かれると恐怖反応が抑えられる現象が知られている。この現象は「恐怖記憶消去(以下、消去)」と呼ばれ、恐怖記憶の内容が喪失されるのではなく、恐怖記憶が持つ恐怖性が抑制される現象であると考えられている。即ち消去は、恐怖反応を誘発する際は、恐怖記憶を司る恐怖回路を使用するが、消去が誘導されると、恐怖反応の抑制を司る消去回路を使用するといった動的な記憶回路の転換によって導かれると考えられるが、この実態については不明である。

では、恐怖回路から消去回路への転換は、どのような機構が考えられるのだろうか。過去の報告から、恐怖記憶Aと恐怖記憶Bの両方を持つ動物に、恐怖記憶Aに対して消去を誘導すると、恐怖記憶Aは抑制されるが、恐怖記憶Bは依然残ることから、消去による恐怖記憶の抑制は、恐怖記憶の種類特異的である(Lai et al., Nature, 2012)。従って、恐怖記憶A、及び恐怖記憶Bの恐怖回路と消去回路は各々独立であり、交叉しない。一方で、消去から時間が経過すると、恐怖反応が自然回復する現象(spontaneous recovery; SR)も知られており、消去回路は恐怖回路を上書きするものではない(Goode and Maren, ILAR Journal, 2014)。以上から、「恐怖回路と消去回路を結びつける機構、かつ、恐怖回路と消去回路が独立して脳内に維持される機構が同時に存在するというモデル」を考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、記憶回路が恐怖回路から消去回路へと転換する実態を明らかにする端緒として、恐怖記憶形成時と消去時に共に活性化される細胞群を有する領域におけるこれら細胞群が、恐怖回路から消去回路への転換の起点となっているものと仮定し、このことを明らかにすることを目的とした。具体的には、上記モデルを記憶痕跡細胞のレベルから検証し、これら細胞群の光遺伝学的制御やカルシウムイメージング手法を用いて解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 記憶痕跡細胞を標識・操作可能な遺伝子改変マウスArcHE-FlpoER マウスとレポーターであるFRT-mTFP1 マウスとを交配させたArcHE-FlpoER/TFP 二重遺伝子改変マウス(以下、dTg)を用いて、恐怖条件付け文脈記憶課題(CFC)による記憶形成時・記憶消去時に活性化された神経細胞群をそれぞれTFP、あるいは最初期遺伝子であるcFos にて標識し、形成時・消去時に共に活性化される神経細胞群を有する領域の全脳を対照とし網羅的に探索を行う。

(2) (1)にて見出した脳領域を対象とし、恐怖記憶形成時、あるいは消去時特異的に興奮性オプシンや抑制性オプシンを発現させ、光遺伝学的に活性化、あるいは抑制した際の消去誘導について解析する。

(3) 自由行動下のマウス脳活動を、カルシウムイメージングを用いてモニタリング可能な微小内視鏡(nVista)を用いてin vivo における恐怖回路活動を、カルシウム指示遺伝子(GCaMP6)を用いて可視化するため、ArcHE-FlpoER における記憶痕跡細胞特異的にGCaMP6 を発現させ、イメージング可能な実験系を確立し、(1)にて同定された脳領域における消去誘導中でのカルシウム動態について解析する。

## 4. 研究成果

(1) dTgを用いて、恐怖記憶形成時・消去時に活性化した神経細胞群をそれぞれラベルし、両者によって共に活性化された神経細胞群が存在する領域を探索したところ、前頭前野領域においては、恐怖記憶形成時・消去時に共に活性化した神経細胞群が、コントロール群と比較し、有意に多かった。一方、海馬歯状回領域においては、そのような神経細胞群はほとんど存在しなかった。以上より、同一脳内において、恐怖記憶形成時と消去誘導時に共に活性化される細胞集団を有する領域、および別々の細胞集団が活性化される領域が共存することを見出され、よって上述のモデルの存在が強く示唆された。

(2) 消去時には活性化が見られない海馬歯状回、および、消去時にも活性化する前頭前野領域に着目し、これら領域における恐怖形成時に活性化された神経細胞集団(F-Cell)の消去における役割を明らかにするため、ArcHE-FlpoER を用いて、F-Cell に興奮性あるいは抑制性オプシンを発現させ、青色光を照射することで神経活動を活性化、あるいは抑制した際の消去誘導前後での恐怖反応について比較・解析した。通常、消去誘導前では恐怖反応は高いが、消去誘導後ではそ

の反応は低くなる。

海馬歯状回においては、抑制性オプシンによるF-Cell 活動の抑制によって、消去誘導の有無に関わらず、恐怖反応が減弱した(消去誘導後であっても、消去誘導によって低下した恐怖反応がさらに減弱した)。よって、海馬歯状回でのF-Cell は消去誘導後であっても、恐怖反応の発現を担うという役割は変化しないことが示唆された。

前頭前野においては、消去誘導前では、抑制性オプシンによるF-Cell 活動の抑制によっても、恐怖反応は何ら変化することはなかった。しかしながら、消去誘導後にF-Cell 活動を抑制性オプシンによって抑制したところ、むしろ恐怖反応が増大した。一方、興奮性オプシンによってF-Cell 活動を活性化させたところ、消去誘導前では、恐怖反応は増大されたが、消去誘導後では、減弱された。よって、前頭前野においては、F-Cell の役割は、消去誘導前後でダイナミックに変化する可能性が示唆された。以上から、前頭前野が恐怖回路から消去回路への転換を担っている重要な役割を果たす可能性が示された。

(3) ArcHE-FIpoER マウスにおける記憶痕跡細胞特異的にGCaMP6 を発現させ、nVista を用いてカルシウムイメージングを行うための、マウス脳部への顕微鏡設置プロトコルを確立した。しかしながら、GCaMP6 を発現させても、シグナルはほとんど観察されなかった。脳切片を作成し、GFP に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、GCaMP6 は発現していたことから、ArcHE-FIpoER においてはGCaMP6 を用いたイメージングに必要な発現量を得られないと考えられた。よって今後は、より明るいGCaMP7 等を用いる必要があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane S-i, Sakamoto M, Kawakami R, Yamaguchi K, Otomo K, Yokoyama H, Kim R, Yokoyama T, Takemoto-Kimura S, Abe M, Okamura M, Kondo Y, Quirin S, Ramakrishnan C, Imamura T, Sakimura K, Nemoto T, Kano , Fujii H, Deisseroth K, Kitamura K, Bito H. Rational engineering of XCAMPs, a multicolor GECI suite for in vivo imaging of complex brain circuit dynamics. *Cell*, 177: 1346-1360, 2019. 査読有
2. Inokuchi K, Imamura F, Takeuchi H, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bito H, Kikusui T, Sakano H. Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odour-induced attractive social responses. *Nature Communications*, 21;8:15977, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Ryang Kim. Specification of a remote memory cell ensemble during cortical tagging. The 17<sup>th</sup> Annual MCCS Symposium. San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, November 2, 2018. (招待講演)
2. 金 亮. 皮質領域における遠隔記憶の細胞・分子機構. 平成30年記憶研究会、生理学研究所(岡崎)、2018年9月19-20日(招待講演)
3. Bito H, Kim R, Inoue M, Inokuchi K, Yokoyama T, Sakai K, Miyazawa Y, Ishii Y, Okamura M, Gammon N, Kobari S, Kondo Y, Sakamoto M, Fujii H. Deciphering Ca<sup>2+</sup>-dependent signaling pathways underlying cognitive processes. China-Japan Joint Symposium "From Neuronal Circuits to Behavior", 95<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Sunport Takamatsu, Takamatsu, Kagawa, Japan. March 29<sup>th</sup>, 2018. (招待講演)
4. Ryang Kim, Yayoi Kondo, Takashi Kawashima, Michiko Okamura, Masatoshi Inoue, Yuichiro Ishii, Kasumi Inokuchi, Kazuki Sakai, Mio Nonaka, Masayuki Sakamoto, Hiroyuki Okuno, Haruhiko Bito. Specification of a remote memory cell ensemble during cortical tagging. Society for Neuroscience 2018, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, November 3-7, 2018.
5. Kasumi Inokuchi, Fumiaki Imamura F, Haruki Takeuchi, Ryang Kim, Hiroyuki Okuno, Hirofumi Nishizumi, Haruhiko Bito, Takefumi Kikusui, Hitoshi Sakano. Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses. The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington Convention Center, Washington DC, USA. Nov 11<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2017.

6. Masatoshi Inoue, Atsuya Takeuchi, Satoshi Manita, Shin-ichiro Horigane, Ryosuke Kawakami, Kazushi Yamaguchi, Masayuki Sakamoto, Hiroyuki Yokoyama, Ryang Kim, Sayaka Takemoto-Kimura, Manabu Abe, Tatsushi Yokoyama, Sean Quirin, Charu Ramakrishnan, Kenji Sakimura, Tomomi Nemoto, Masanobu Kano, Hajime Fujii, Karl Deisseroth, Kazuo Kitamura, and Haruhiko Bito. Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for In vivo imaging of brain circuit dynamics. The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington Convention Center, Washington DC, USA. Nov 11th-15th, 2017.
7. Kasumi Inokuchi, Fumiaki Imamura F, Haruki Takeuchi, Ryang Kim, Hiroyuki Okuno, Hirofumi Nishizumi, Haruhiko Bito, Takefumi Kikusui, Hitoshi Sakano. Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses. 第60 回日本神経化学学会大会、仙台国際センター、仙台、2017年9月7-9日
8. Kasumi Inokuchi, Fumiaki Imamura F, Haruki Takeuchi, Ryang Kim, Hiroyuki Okuno, Hirofumi Nishizumi, Haruhiko Bito, Takefumi Kikusui, Hitoshi Sakano. Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odor-induced attractive social responses. 第40回日本神経科学大会、幕張メッセ、千葉、2017年7月20-23日
9. Ryang Kim, Kazuki Sakai, Takashi Kawashima, Yayoi Kondo, Masatoshi Inoue, Mio Nonaka, Masayuki Sakamoto, Michiko Okamura, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Itaru Imayoshi, Hiroyuki Okuno, Haruhiko Bito. Specification of a remote memory cell ensemble during cortical tagging through activity dependent Arc signaling. 第40回日本神経科学大会、幕張メッセ、千葉、2017年7月20-23日

〔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

<https://researchmap.jp/ryangkim>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者

なし

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。