

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06533

研究課題名（和文）光遺伝学を用いた呼吸制御による記憶機能と海馬活動リアルタイムイメージングの研究

研究課題名（英文）Real-time imaging of hippocampal network dynamics and memory formation regulated by respiration using optogenetic manipulation

研究代表者

中村 望（Nakamura, Nozomu）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：50450961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまで我々はヒトの息を吸う瞬間が記憶課題の正解率低下を引き起こすことを発見した。この知見から「記憶の固定・再固定は、吸息により起こる」という命題を立てた。この対偶の一つは「吸息が起こらないと、エンコーディングが完了しない」である。これを証明するために、光操作による動物行動実験を行った。

組換えAAV接種と遺伝子改変マウスを用いることで、光操作による吸息活動を強制的に制御させ、さまざまな記憶課題のエンコーディングにおける強制的な吸息活動停止により、記憶想起のパフォーマンス低下が示された。これらの結果は、エンコーディングを完了させるためには、吸息活動が重要な役割を果たすことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸が認知機能を制御するメカニズムが明らかにすることは、下位脳が上位脳を制御するメカニズムの証明となる。これらのメカニズムを知ることで、今後の社会において、これまで明らかにされていない認知機能の改善法やストレス低減を導くための重要な取り組みになると考えられる。

研究成果の概要（英文）： We previously discovered that timing of inspiration of respiratory cycles caused the decrease of accuracy of memory tasks in humans. We then hypothesized that “when encoding is completed, then inspiration emerges”. Its contraposition must be “when inspiration does not emerge, encoding is not completed”. The following experiment must be to clarify the contraposition.

Using genetically modified mice injected with recombinant AAV, we succeeded controlling inspiratory actions of the mice using a LED light. Then, animals decreased their performance of memory retrieval when their inspiratory arrests appeared during encoding of several memory tasks. These results suggested that inspiration may play an important role in completing memory encoding.

研究分野：神経科学

キーワード：呼吸制御 吸息 記憶 認知 エンコーディング 光遺伝学 AAV接種

1. 研究開始当初の背景

日本古来の禅や仏教で重要とされている呼吸の整え、調息は、各種スポーツなどのパフォーマンス向上において長年注目されている。しかしながら、そのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。そのメカニズムとして考えられるのは、呼吸を司る延髄という下位脳が、認知機能を制御するような逆行的なものが存在しているのではないだろうか、というものである。このような考えは、1890年代のジェームス・ランゲ理論をはじめ、情動2要因理論、近年ではソマティックマーカー仮説など、下位脳（ここでは、視床下部）が上位脳（大脳皮質）を制御するという仮説で示されており、一世紀以上にわたり議論し続けられている。本研究ではこのような仮説と同じ立場から、下位脳から上位脳への制御について、内的因子の一つである呼吸に注目する。

呼吸活動において、延髄の吸息ジェネレータである PreBöttinger Complex (PreBötC) が、主要な呼吸中枢であることが知られている。近年の研究から、PreBötC は、青斑核から放出するノルアドレナリン・ドーパミンを制御し、覚醒および注意レベルを調節していることが明らかになった(Yackle et al., 2017)。また、青斑核から海馬への投射作用が、記憶課題の成績を変える(Takeuchi et al., 2016)ことから、吸息タイミングの調節の仕方が PreBötC-青斑核-海馬回路を介して認知機能のプロセスに対して、直接影響を及ぼすことが考えられる。

2018年、我々はヒトの息を吸う瞬間が記憶課題の正解率低下を引き起こすことを発見し、呼吸と認知パフォーマンスの間になんらかの制御メカニズムがある可能性を示した(Nakamura et al., 2018)。この知見から、我々は「記憶の固定・再固定は、吸息活動から生じる」という仮説を立てた。具体的には、「エンコーディングが完了すると、吸息活動が起こる」という命題である。そして、命題の真偽は、その対偶の真偽と必ず一致する。その対偶とは「吸息活動が起こらないと、エンコーディングが完了しない・固定が開始されない」である。しかしながら、対偶の証明は、動物実験でしか示すことができない。

2. 研究の目的

そこで上記の対偶に基づいて、マウスが記憶課題を行った際、吸息活動が起こらないとエンコーディングが完了しないかを明らかにすることを目的とし、実験を計画した。まず、Vgat-Creマウスに組換えAAV接種を行い、光操作で強制的に吸息活動を操作できるかを調べた。その後、記憶課題のエンコーディングの際に、光照射によって吸息停止を行い、そのあとの記憶想起の成績の変化について調べた。また、課題に関連する脳活動部位、海馬や前頭前野のニューロン活動を可視化するために、分子イメージング法を用いた。

3. 研究の方法

対象は、Cre-LoxPシステムに基づいた成獣の雄および雌のVgat-Creを含むC57BL/6Jマウス（以下、Cre+マウス）である。コントロールには、成獣の雄および雌のwild typeのC57BL/6Jマウスを用いた。すべての実験は、NIHのガイドラインに従った実験動物の取り扱いと使用の対策と措置で、兵庫医科大学の遺伝子組換え実験・動物実験の委員会の承認の上で行われた（18-039, 20-049）。

動物は、ChR2を含む組換えAAVを延髄の吸息中枢に接種され、その後、頭部にLEDフ

ファイバーが設置された。覚醒下で光操作により、吸息停止が行われるかどうかの確認を行ったあと、記憶課題の行動実験を行った。記憶課題は、オブジェクト再認記憶課題と恐怖条件付け課題の2つを行った。特に、恐怖条件付け課題終了直後、脳を摘出し速やかに凍結し、-80度Cに保管した。のちに厚さ10マイクロメートルの凍結脳スライス切片を作成した。最初期遺伝子Arc, Fos, Homer1aのRNA発現を可視化するin situハイブリダイゼーション法 (CatFISH法) を用いて、ニューロン活動マーカによる海馬や大脳皮質のニューロン活動の局在の可視化を行った。

4 . 研究成果

我々は、Cre-LoxPシステムに基づくCre+マウスを用いて、光操作により覚醒下でマウスの吸息活動を停止させることに成功した。その一方で、コントロールとして、組換えAAVを接種したwild typeのマウスにおいては、光操作により吸息活動を停止させることはなかった。Cre+マウスにおいて、2つの記憶課題のエンコーディングの際、強制的な吸息活動の停止により、記憶想起のパフォーマンスが低下することが示された。一方、wild-typeマウスは、そのような変化は認められなかった。これらの成果は、Nature Communicationsに掲載予定で、現在in pressである(Nakamura et al., in press)。マウス延髄にある吸息中枢PreBötCは、250マイクロメートルを直径とする非常に小さい部位である。本研究では、PreBötCに直接組換えAAVを接種しLEDファイバーを延髄内に設置するため、数十マイクロメートルのズレで呼吸中枢の損傷により、呼吸異常を引き起こし死に至るケース、あるいは反対に光照射による制御ができないケースが実験の半分以上を占める技術的に難しい実験であった。

恐怖条件付け課題終了後は、脳を摘出し凍結した。そして、ニューロン活動マーカとなる最初期遺伝子Arc, Fos, Homer 1aのRNA発現を可視化するCatFISH法を行った。この方法は、海馬や大脳皮質のニューロン活動を可視化するだけでなく、20-30分間隔の2つのイベントA,Bの海馬アンサンプル活動の違いを示すものである。実験では、2セットのcatFISH、つまり、細胞質Arc発現と核内Arc発現のセット1と、核内Fos発現と核内Homer1a発現のセット2を用いて、イベントA,Bのアンサンプル活動の違いを明らかにした。課題終了直前のイベントBのニューロン活動は、核内Arc発現と核内Fos発現によって海馬のアンサンプル活動として検出され、課題終了の30分前のイベントAは、細胞質Arc発現と核内Homer1a発現によって、海馬のアンサンプル活動として検出された。そして実験では、イベントAをCS-、イベントBをCS+に設定しているので、安全CSと恐怖CSの海馬アンサンプル活動の違いを示すこととなる。その結果、wild-typeマウスの恐怖条件付けにおける海馬活動分布は、イベントA (CS-) とイベントB (CS+) で大きく異なることがわかった。これは、CS-とCS+におけるそれぞれの海馬アンサンプル活動の違いを意味している。その一方、Cre+マウスの恐怖条件付けでは、wild-typeマウスのときと比較すると、イベントAとイベントBで、海馬アンサンプル活動の類似性が高いことがわかった。これにより、Cre+マウスの記憶想起のパフォーマンスの低下は、海馬活動レベルで、それを示す変化が観察されたといえる。

以上より、これまで知られていない呼吸と記憶機能の相互作用が明らかになり、マウスが記憶する際 (エンコーディングの瞬間) オプトジェネティクスを用いて呼吸を停止させると、記憶力が低下することがわかった。これは、Cre+マウスのpreBötCに光を照射することで、呼吸がコントロール可能となり、さらに、海馬ニューロン活動において、呼吸

効果による記憶力の低下を裏付ける変化が確認された。これらの研究を発展させることで、今後、呼吸活動が「記憶機能のトリガー」として重要な役割を果たすというこれまでの常識を超えた新しい脳機能メカニズムを示すブレイクスルーになることが期待される。

参考文献：

Nakamura NH*, Furue H, Kobayashi K, Oku Y. (2023) Hippocampal ensemble dynamics and memory performance are modulated by respiration during encoding. *Nature Communications*, in press.

Nakamura NH*, Fukunaga M, Oku Y (2018) Respiratory modulation of cognitive performance during the retrieval process. *PLoS ONE*. 13:e0204021

Takeuchi T, Duzsikiewicz AJ, Sonneborn A, Spooner PA, Yamasaki M, Watanabe M, Smith CC, Fernández G, Deisseroth K, Greene RW, Morris RG (2016) Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* 537: 357-362.

Yackle K, Schwarz LA, Kam K, Sorokin JM, Huguenard JR, Feldman JL, Luo L, Krasnow MA. (2017) Breathing control center neurons that promote arousal in mice. *Science* 55:1411–1415.

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 Nakamura NH, Fukunaga M, Oku Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Respiratory modulation of cognitive performance during the retrieval process	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/ journal.pone.0204021	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 Nakamura NH, Furue H, Kobayashi K, Oku Y	4. 巻 in press
2. 論文標題 Hippocampal ensemble dynamics and memory performance are modulated by respiration during encoding	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nozomu Nakamura
2. 発表標題 Improvement of contextual memory by cross-modal distraction of tones in mice
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 望
2. 発表標題 環境要因のクロスモダリティによる文脈記憶の増強
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nozomu Nakamura
2. 発表標題 Enhancement of contextual memory by cross-modal distraction of tones
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会（第126回日本解剖学会総会と合同大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nozomu Nakamura
2. 発表標題 Memory consolidation initiated by central inspiratory signals from the PreBoetzing complex
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会 シンポジウム「心身相関とメンタルコンディショニング」 東北大学川内北キャンパス（仙台、ハイブリッド開催）（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>中村 望の「呼吸による認知機能制御を科学する」 https://sites.google.com/site/respirationandtaskperformance/</p>

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
研究協力者	越久 仁敬 (Oku Yoshitaka) (20252512)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岡田 泰昌 (Okada Yasumasa) (80160688)	独立行政法人国立病院機構村山医療センター（臨床研究部）・電気生理学研究室・室長 (82660)	
研究協力者	木津川 尚史 (Kitsukawa Takashi) (10311193)	大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授 (14401)	現在、立命館大学教授
研究協力者	船曳 和雄 (Funabiki Kazuo) (00301234)	公益財団法人先端医療振興財団・その他部局等・上席・主任 研究員クラス (84503)	

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