



平成28年8月1日
科学技術振興機構（JST）
富山大学
東京慈恵会医科大学

強烈な体験によってささいな出来事が長く記憶される仕組みを解明 ～PTSDなどの精神疾患の治療法に期待～

ポイント

- 強烈な体験をすると、その前後のささいな出来事も一緒に長く記憶が保存されるが、その仕組みは不明だった。
- それぞれの記憶を思い出す時に活動する神経細胞集団が重複していることを示した。
- ト라우マ記憶と関連性が薄い記憶の不必要な結びつきが起こるPTSD（心的外傷後ストレス障害）などの精神疾患の治療法につながることを期待できる。

JST 戦略的創造研究推進事業において、富山大学 大学院医学薬学研究部（医学）生化学講座の井ノ口 馨 教授らは、マウスを使い、通常ならすぐに忘れてしまうようなささいな出来事でも、その前後に強烈な体験をした場合には、長く記憶として保存される仕組みを解明しました。

例えば、東日本大震災が起こる前のランチで何を食べたかなど、震災前後のささいな出来事を覚えている人が多いことが知られています。実験動物でもそのような現象は報告されており、「行動タグ」^{注1)}と呼ばれていますが、その仕組みは不明でした。

本研究グループはマウスを用いて、行動タグ成立時には強烈な体験とささいな出来事の記憶エングラム（活動する神経細胞集団）^{注2)}の重なりが広いことを発見しました。さらに、光遺伝学的手法^{注3)}によって強烈な体験の記憶エングラムの活動を人為的に抑制したところ、行動タグが成立していたささいな出来事を思い出せなくなることを発見し、ささいな出来事と強烈な体験の記憶エングラムが重複することで、行動タグが成立することを示しました。

私たちは、脳に蓄えられているさまざまな記憶情報を関連付けることで、一つ一つの記憶から知識や概念を形成していきます。異なる記憶エングラムが相互作用する仕組みに関する今回の研究成果は、トラウマ記憶と関連性が薄いニュートラルな他の記憶（状況）との間で不必要な結びつきが起きるPTSDなどの精神疾患の治療法につながることを期待できます。

本研究は、富山大学 大学院医学薬学研究部（医学）の野本 真順 助教、東京慈恵会医科大学 痛み脳科学センターの加藤 総夫 教授らと共同で行ったものです。

本研究成果は、2016年8月1日（英国時間）に英国科学誌「Nature Communications」のオンライン速報版で公開されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（CREST）

研究領域：「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」

（研究総括：山本 雅 沖縄科学技術大学院大学 教授）

研究課題名：「細胞集団の活動動態解析と回路モデルに基づいた記憶統合プロセスの解明」

研究代表者：井ノ口 馨 富山大学 教授

研究期間：平成25年10月～平成31年3月

JSTはこの領域で、ゲノムやたんぱく質・脂質をはじめとする生体高分子が織り成す生命現象を無細胞系、細胞、細胞集団のレベルで観察・実験・計測し、この生命体の動的システムを時空間の視点で統合的に理解することを目指します。同時に、これらの研究を基盤として、生命現象を自在に操る技術の創出を追求します。上記研究課題では、記憶のダイナミックな側面に注目し、ニューロン集団の活動動態に焦点を当てた解析と数理モデルの構築を通して、神経回路レベルの記憶のメカニズム解明を目指します。

＜研究の背景と経緯＞

記憶は、経験したことが脳の中の特定の神経細胞集団の活動に変換され、蓄えられています。すなわち、経験時に活動した特定の神経細胞集団（記憶痕跡、または記憶エングラムと呼びます）として記憶は符号化され、その記憶エングラムが再び活動するとその記憶が思い出されます（想起）（図1）。異なる記憶には異なる記憶エングラムが存在します。

強烈な体験をすると、その前後のささいな出来事も一緒に長期記憶として保存される現象を行動タグと呼びます。2つの記憶が相互作用するという意味で興味深い現象ですが、従来の記憶研究では単一の記憶が形成・保持される仕組みに注目が集まり、行動タグ成立の仕組みに関してはほとんど明らかにされていませんでした。

＜研究の内容＞

本研究ではマウスを用い、弱い学習課題（ささいな出来事）として新奇物体認識課題（NOR）^{注4）}、強い課題（強烈な体験）として新規環境暴露（NCE）^{注5）}を用いて、両体験の間で行動タグが成立する仕組みを調べました。

まず、ささいな出来事だけを体験させ、いつまで記憶が保存されるかを調べました。本研究で用いたNORの条件では、学習から30分後の短期記憶をテストしたところ、新奇物体を探索した時間の割合が既知物体に比べて大きく、マウスは物体を記憶していました（図2）。ところが、学習から24時間後に長期記憶についてテストした場合は、既知物体と新奇物体を探索した時間の割合が同程度であり、マウスは物体を記憶していませんでした。このことから、本研究で用いたNORで、マウスは学習から30分後では物体を記憶していたものの、24時間後では学習時の物体を忘れていたことが分かりました。

次に、ささいな出来事の前後に強烈な体験を与え、ささいな出来事がいつまで記憶されるかを調べました。NORを行う前後（3時間前から3時間後までの5時点）で、NCEを行ったところ、NORの学習を行う前後1時間以内にNCEを行った場合には、24時間後のテストにおいて、マウスは新奇物体を記憶しており、行動タグが成立することが分かりました（図3）。また、たんぱく質の合成を抑える薬剤をマウスの海馬に注入する解析から、行動タグ成立には海馬におけるたんぱく質の新規合成^{注6）}が必要であること、マウスが既にNCEの環境に慣れていると行動タグが成立しないことが分かりました。

次に、行動タグが成立するときにNORおよびNCEに応答して活動した神経細胞（NORエングラムおよびNCEエングラム）をc a t F I S H法^{注7）}により特定しました。その結果、NORエングラムとNCEエングラムの間の重複率が、行動タグが成立する条件では成立しない条件に比べて、海馬CA1と呼ばれる領域で大きく増大しました（図4）。このことから、2つの記憶エングラムが重なることで、行動タグが成立することが強く示唆されました。

そこで、光遺伝学の方法を用いてNORエングラムとNCEエングラムの重なりを調べました。NOR想起時に、光遺伝学の方法でレーザー光照射によって海馬のNCE記憶エングラムを人為的に抑制した場合、行動タグにより長期記憶となったNOR記憶を思い出せなくなりました。ところが、NCEエングラムとは関係のない別の記憶エングラムを抑制した場合、NOR記憶は想起できました（図5）。

以上の結果から、ささいな出来事と強烈な体験の記憶エングラムが重複することで行動

タグが成立することを神経回路レベルで初めて示しました。

<今後の展開>

私たちは既に脳に蓄えられているさまざまな記憶情報を関連付けていくことで、一つの記憶から知識や概念を形成していきます。異なる記憶が相互作用する仕組みに関する今回の研究は、知識や概念を形成する過程でのヒトの高次脳機能の解明につながる成果です。また、関連性の弱い記憶同士の不必要な結びつきは、トラウマ記憶とニュートラルな他の記憶（状況）同士の不必要な結びつきが起きるPTSDなどの精神疾患に密接に関わっていることから、今回の成果はこれらの疾患の治療法につながることで期待できます。例えば、今後、特定のエングラムの神経活動を制御する技術が開発されることで、強烈なトラウマ記憶のエングラムのみを抑制し、トラウマ記憶に結びついてしまった日常の出来事の記憶を引き離すことも可能で、将来的にはPTSD治療にも使えるものと考えています。

<参考図>

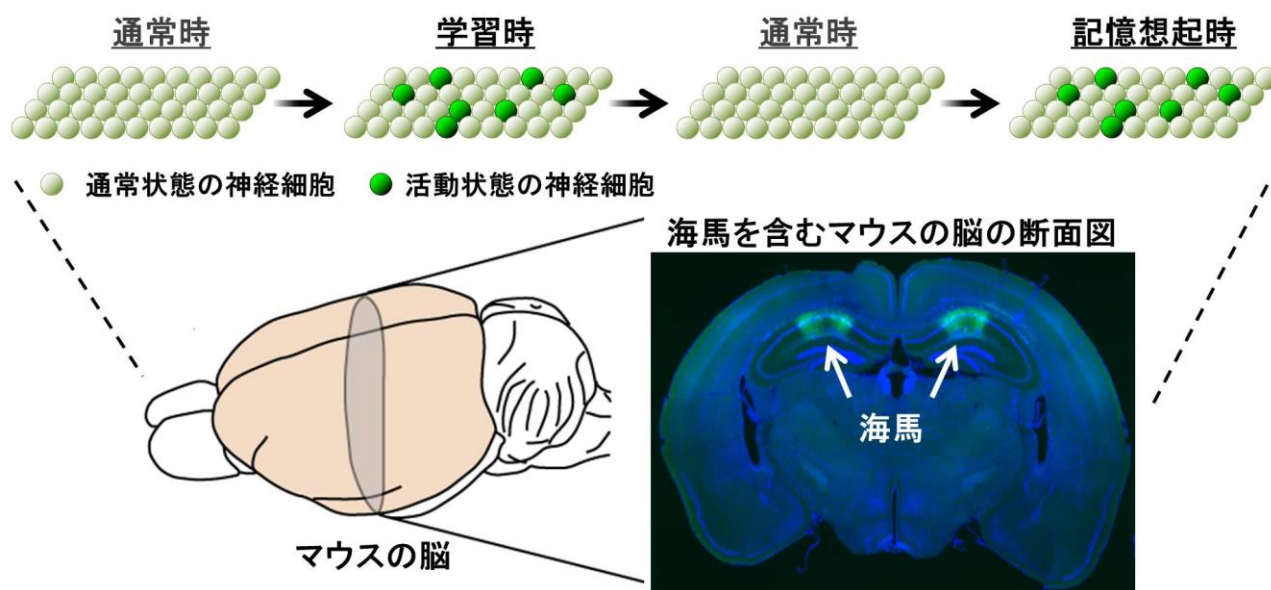
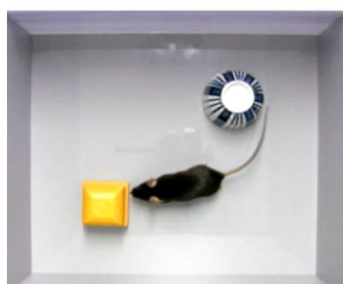
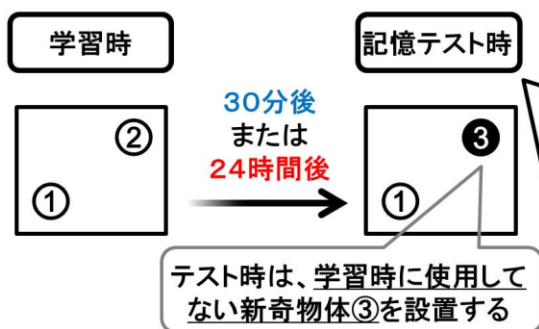


図1 脳と記憶エングラムの概要

記憶が神経細胞集団として符号化されて脳内に蓄えられる様子を表す。学習時に同時に活動をした神経細胞同士は強く関連付けられ、記憶エングラムになる。マウスの脳のオレンジ色の部分：海馬と大脳皮質を含むマウス脳の部分。記憶などの脳高次機能に重要。丸：神経細胞、緑色：学習時に活動した神経細胞を表す。緑色の神経細胞が同時に活動すると、学習時に形成された記憶が想起される。海馬CA1領域はエピソードや場所の情報を司る脳部位。

新奇物体認識課題(NOR)の手順



マウスが物体を探索している様子

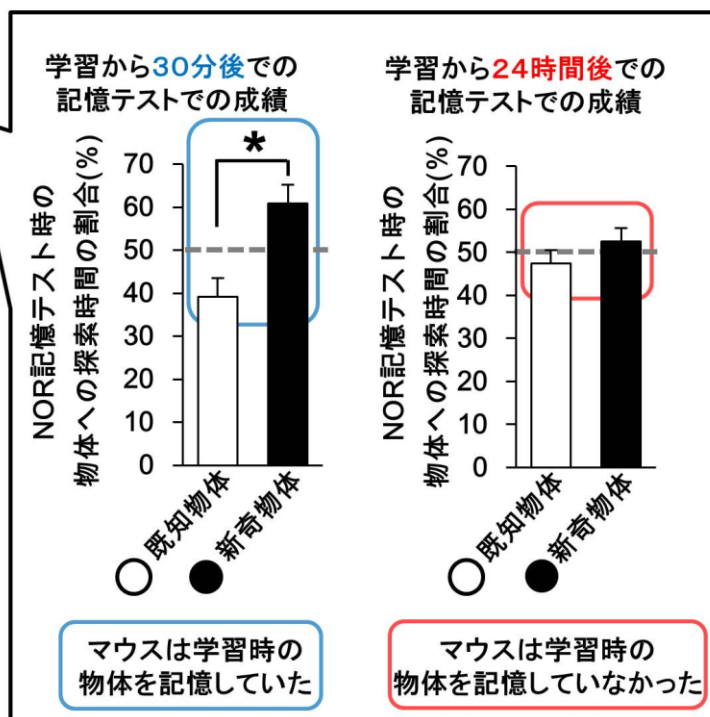


図2 新奇物体認識課題(NOR)の手順とNOR記憶評価方法

弱い学習課題となる新奇物体認識課題の手順と本研究で観察されたNOR記憶の評価方法を表す。①および②：学習時に使用する異なる2つの物体、③：記憶テスト時に使用する新奇物体（②と違う新奇物体）を表す。学習から30分後の記憶テストではマウスは新奇物体を既知物体に比べてより長く探索し、学習時の物体を記憶していることが分かる。一方、24時間後の記憶テストではマウスは学習時の既知物体と新奇物体を識別できず、物体に対する記憶を忘れている。写真はマウスが物体を探索（鼻先を接触させる動作）している様子。

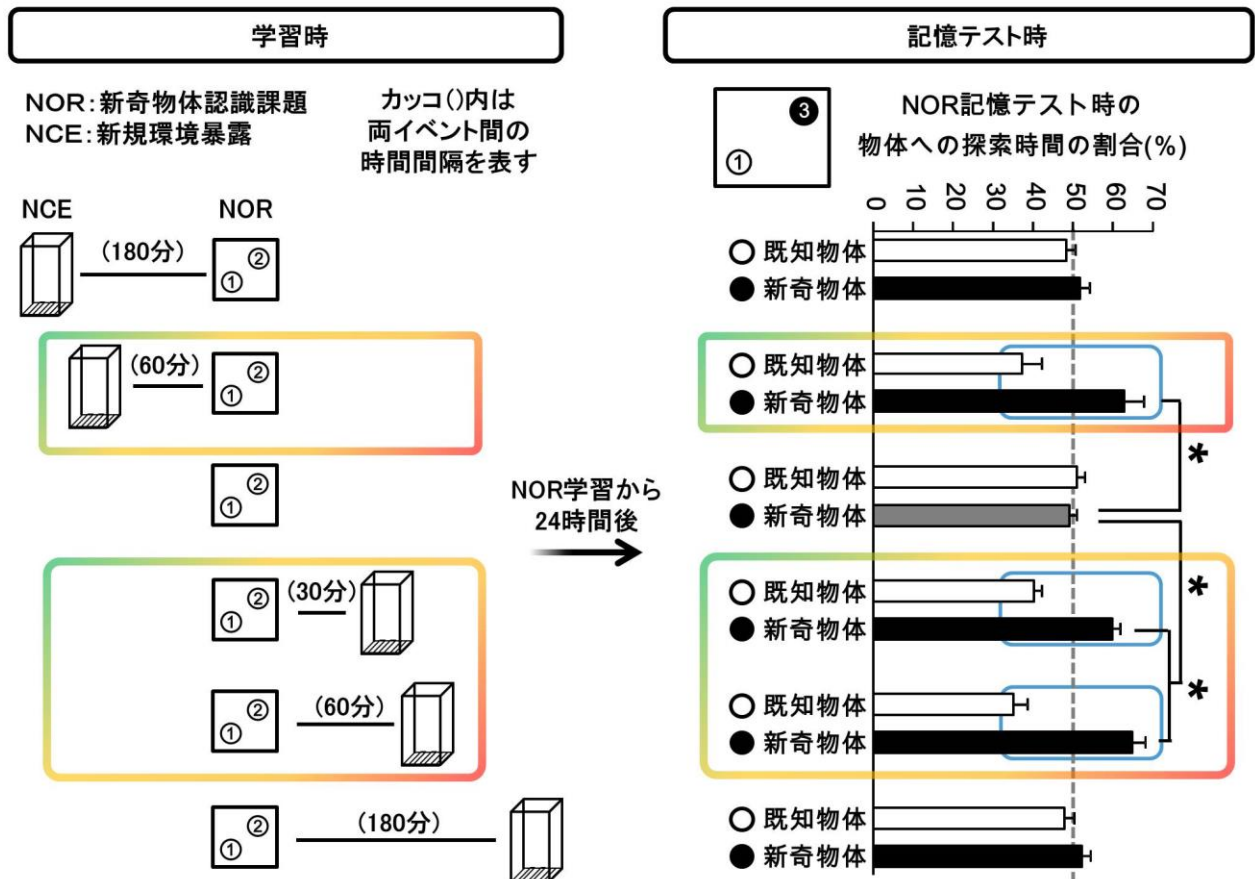


図3 新奇物体認識課題(NOR)と新規環境暴露(NCE)の組み合わせによる行動タグ誘導時のNOR長期記憶

行動タグを再現するために検討した実験群と24時間後のテスト時の成績を表す。NORを行う前後に強い学習課題となるNCEを行い、24時間後にNOR記憶を評価した。NORの前後1時間の時間窓でNCEを行った場合、マウスは24時間後のテスト時に学習時の物体を記憶しており、行動タグが成立している。

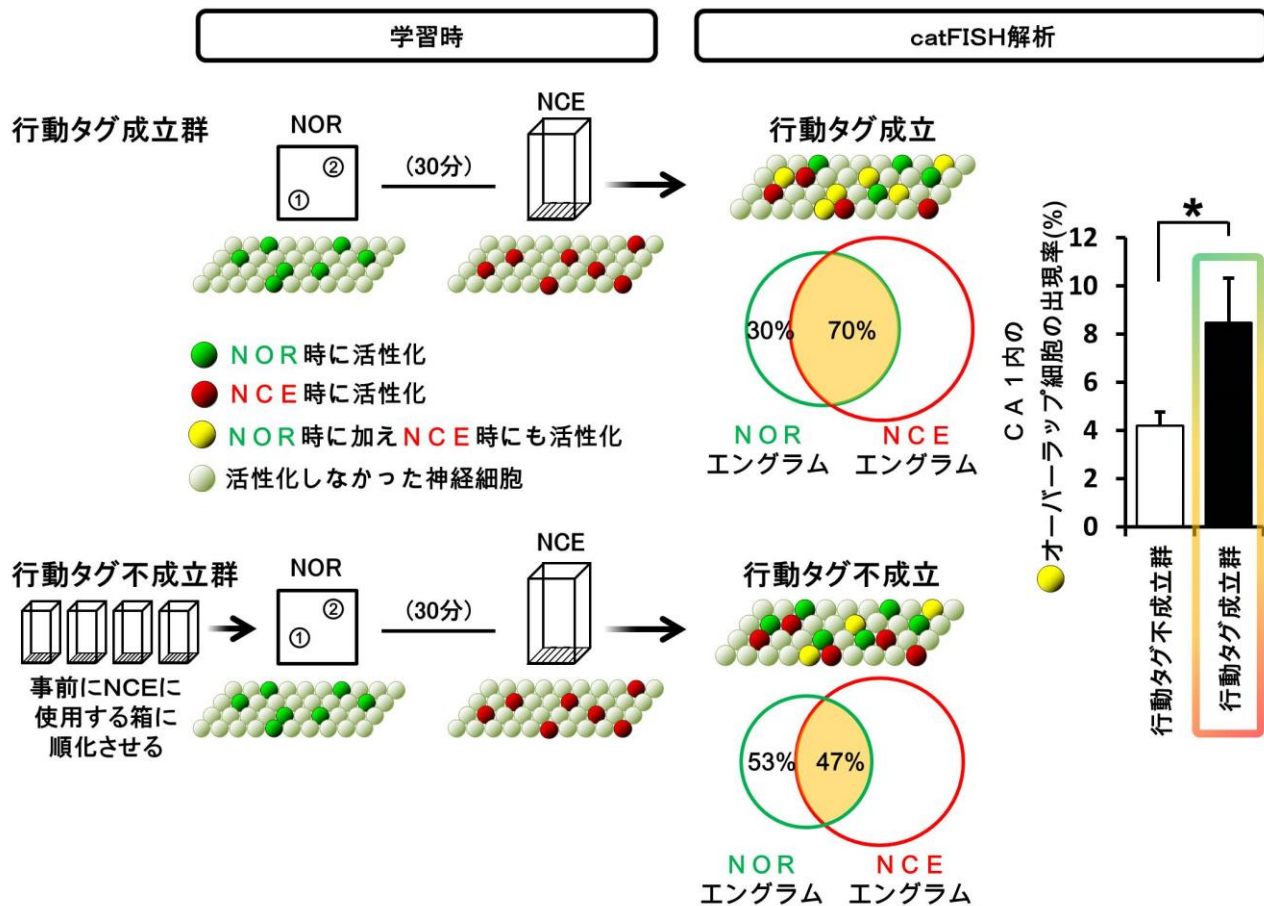


図4 行動タグ誘導時のcatFISH解析

catFISH解析による行動タグ誘導時のNORおよびNCEの記憶エングラムの解析。上段：図3で示した行動タグが成立する群の実験手順を示している。下段：NCEに使用する箱に対してあらかじめ慣れさせることで行動タグが成立しない群を対照群として設定した。両方の群は行動タグ誘導から5分後にサンプリングされ、catFISH解析が行われた。行動タグ成立群における海馬CA1内のNORおよびNCEの両方で活性化した細胞（オーバーラップ細胞）の出現率は、行動タグ不成立群に比べて有意に増大していた。丸は神経細胞を表す。ベン図はそれぞれの群において、NOREングラムがどの程度NCEエングラムと重なっているかを示している。ベン図の大きさは活動する神経細胞の数を反映している。

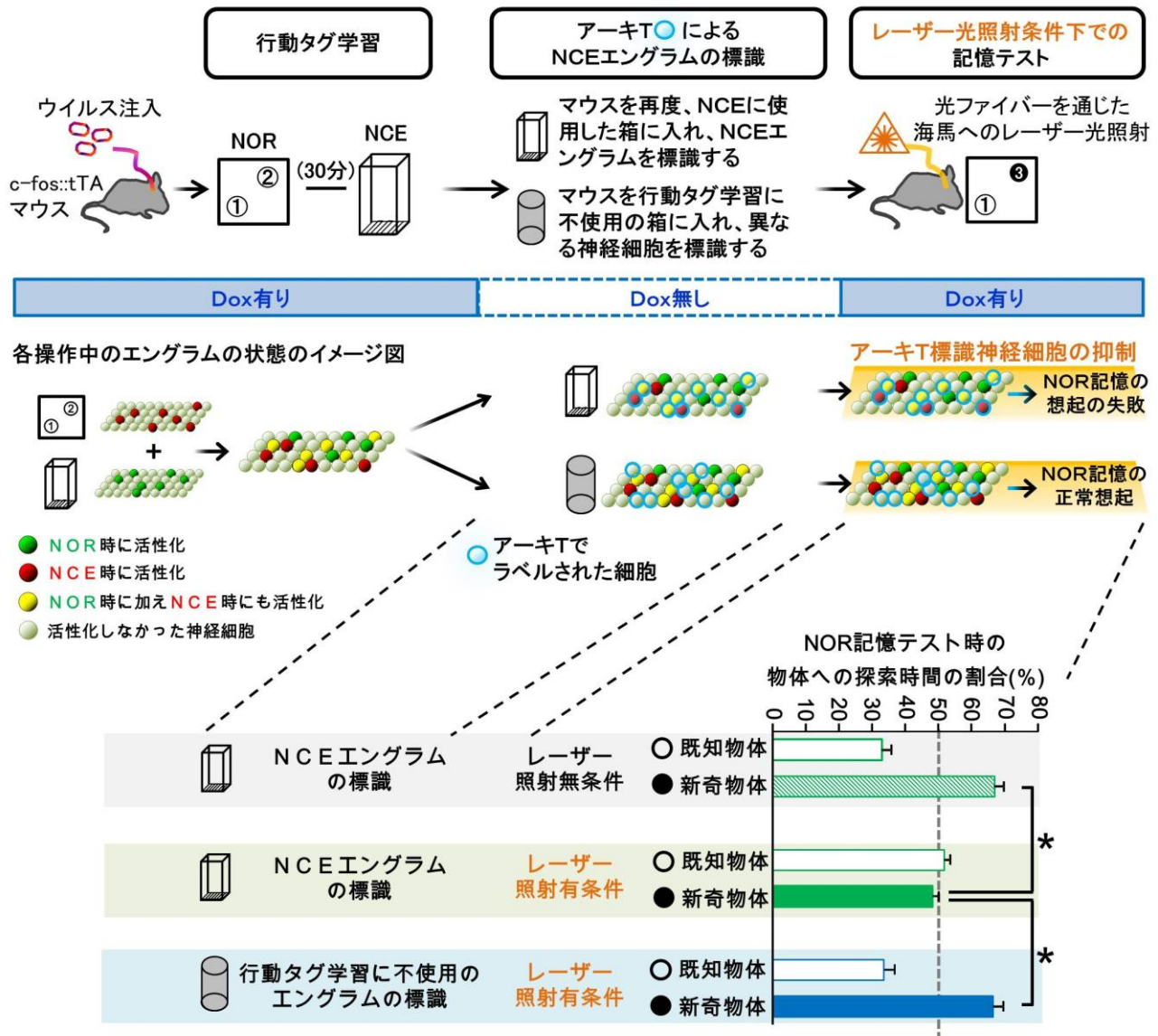


図5 NOR想起に対するNCEエングラム抑制の効果の解析

光遺伝学手法によりNCEエングラムを標識し、NOR想起時に抑制する手順と結果を表している。実際には、c-fos::tTA遺伝子改変マウス^{注8)}と組み換えレンチウイルス遺伝子導入法^{注9)}を組み合わせ、海馬のNCEエングラムでアーキTロドプシン^{注10)}を発現させ、レーザー光照射でNCEエングラムの活動を抑制する。上段：実験の手順を表している。c-fos::tTAマウスの海馬の両側にウイルスが注入された後、行動タグ学習、標識のための環境暴露、レーザー光照射条件下での記憶テストが行われる。NCEエングラムのみをアーキTによって標識するため、行動タグ学習後にDox^{注11)}の投薬を一時的に中断し、投薬中断中に環境暴露によって活動した神経細胞のみがアーキTによって標識される。中段：各操作中の記憶エングラムの状態のイメージ図を表している。丸：神経細胞、立方体：NCEに使用する箱、円柱：行動タグに使用していない新しい丸い箱を表している。下段：レーザー光照射条件下でのNOR記憶テスト時の結果を表す。想起中にNCE記憶エングラムを抑制された群はNOR記憶を想起できない。一方、関連のない箱の記憶エングラムを抑制された群はNOR記憶を想起できる。

<用語解説>

注1) 行動タグ

強烈な体験をするとささいな出来事が長期記憶として保存される現象を指す。シナプスレベルで観察されるシナプスタグ現象との類似性から付けられた。ある神経細胞のシナプスに強い入力が入ったとき、その前後数時間の間に、同じ神経細胞の「別のシナプスに入った弱い入力」も他の強い入力と同様の動態を示す現象がシナプスタグ現象である。行動タグがシナプスタグによって起こるかどうかは不明のままである。東日本大震災が起きた日に体験したささいな出来事を覚えている人は多く、震災の起こる前後数時間の間に体験したこと、ランチに何を食べたかなどを覚えているなどは行動タグのシンプルな例である。

注2) 記憶エングラム（記憶痕跡）

記憶は、学習時に活動した特定の神経細胞集団（セルアセンブリ）という形で脳内に残った物理的な痕跡として保存されることが近年明らかになった。この細胞集団が、記憶エングラムである。学習時に同時に活動をした神経細胞同士は強く関係付けられ、何らかのきっかけで一部の神経細胞が活動すると、このセルアセンブリ全体、すなわち、記憶エングラム全体が活動し、その結果として記憶が想起される。

注3) 光遺伝学的手法

特定の波長の光を当てると活動する分子を遺伝子導入することで、狙った細胞の活動性や機能を光で制御する方法。光照射によって人為的に標的細胞の神経活動を誘導、抑制できる。

注4) 新奇物体認識課題（NOR）

N o v e l O b j e c t R e c o g n i t i o n T a s kの略。新奇物体認識課題はマウスの新しい物に対する嗜好性や好奇心を利用して行われる。学習として、マウスは2つの異なる物体が対角に置かれた四角い箱の中に5分間入れられ、物体を探索させられる。続いて、テストとして、マウスは2つの異なる既知物体のうちの1つを新奇物体に置き換えた同一の箱の中に再び5分間入れられ、再度、探索させられる。テスト時に、マウスが既知および新奇の物体それぞれに対して興味を示した時間（鼻先を接触させた時間）を計測する。既知物体に比べて、新奇物体をより長く探索した場合、マウスが物体を記憶していたと判断する。

注5) 新規環境暴露（NCE）

N o v e l C o n t e x t E x p o s u r eの略。新奇物体認識課題（NOR）で使用する四角い箱とは色合いや材質が異なる立方体あるいは円柱の箱にマウスを一定時間入れることで行われる。本研究では、マウスは新奇環境暴露として10分間（行動タグトレーニング時）あるいは3分間（再暴露時）入れられる。

注6) たんぱく質合成依存性

脳内のたんぱく質の新規合成を阻害しておくと、阻害しない場合には行動タグが成立す

る条件でも行動タグが成立しなくなる。このことから、行動タグは新規タンパク質合成依存的存在であるという。

注7) catFISH法

cell compartment analysis of temporal activity using fluorescence in situ hybridization法の略。蛍光を利用しmRNAの局在を調べるFISH法を利用して、神経細胞の活性化したタイミングを同定する技術。神経活動で発現誘導するarc mRNAは、神経活動5～10分後までは細胞の核内に留まるが、約30分後には細胞質に局在する。これを利用し、30分間隔で2回のイベントを行った直後の脳サンプルで調べた場合、細胞質arcシグナルを持つ細胞は最初のイベント時に、核内arcシグナルを持つ細胞は、2回目のイベント時に、両方のシグナルを持った細胞は2回のイベント両方で活性化したことが分かる。

注8) c-fos::tTA遺伝子改変マウス

活動している神経細胞内に転写因子tTAを発現する遺伝子改変マウス。c-fos遺伝子は、神経活動によって発現が誘導されるが、この遺伝子発現に必要なプロモーター配列の後ろにtTA遺伝子配列をつないだ遺伝子を持つ。tTAはドキシサイクリン(Dox)非存在下でのみ標的配列であるTRE配列に結合しその下流の遺伝子の発現を誘導することができる。このことから、このマウスを使うと活動した細胞にTRE配列の下流につないだ蛍光たんぱく質やアーキトロドプシンの遺伝子を発現させることで観察や活性を制御することができる。

注9) 組み換えレンチウイルス遺伝子導入法

ヒト免疫不全ウイルスを元に作られたウイルスベクターで、遺伝子改変に利用されている。目的の遺伝子配列を容易にウイルスゲノムに組み込むことができ、結果としてウイルスが感染した細胞のゲノムに、目的の遺伝子配列を組み込むことができる。いくつかの構成たんぱく質をコードした遺伝子を欠失しているため、感染した細胞内でウイルスが増殖することがなく毒性が低い。

注10) アーキトロドプシン

Archaeorhodopsin-T (ArchT、アーキT)。Halorubrum属のゲノムデータから相同性検索によりHalorubrum TP009系統から同定された遺伝子。プロトンポンプを構成する分子。神経細胞にアーキTを発現させると、緑色光依存的にポンプが駆動し、細胞膜電位は過分極を示すため、緑色光照射によって人為的に標的細胞の神経活動を抑制できる。

注11) Dox (ドキシサイクリン)

Doxはテトラサイクリン系抗生物質である。c-fos::tTA遺伝子改変マウスにおいては、Doxが存在する場合、転写因子tTAは転写活性を示さず、TRE配列の下流の目的遺伝子は発現しなくなる。

<論文タイトル>

“Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioral tagging”

(行動タグの神経ネットワークメカニズムとしてのセルタグ機構)

doi : 10.1038/NCOMMS12319

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

井ノ口 馨 (イノクチ カオル)

富山大学 大学院医学薬学研究部 (医学) 教授

〒930-0194 富山県富山市杉谷2630

Tel : 076-434-7225 Fax : 076-434-5014

E-mail : inokuchi@med.u-toyama.ac.jp

<JST事業に関すること>

川口 哲 (カワグチ テツ)

科学技術振興機構 戦略研究推進部

〒102-0076 東京都千代田区五番町7 K's 五番町

Tel : 03-3512-3524 Fax : 03-3222-2064

E-mail : crest@jst.go.jp

<報道担当>

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3

Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho@jst.go.jp

富山大学 総務部 広報課

〒930-8555 富山県富山市五福3190

Tel : 076-445-6028 Fax : 076-445-6063

E-mail : kouhou@u-toyama.ac.jp

慈恵大学 法人事務局 総務部 広報課

〒105-8461 東京都港区西新橋三丁目25番8号

Tel : 03-5200-1280 Fax : 03-5400-1281

E-mail : koho@jikei.ac.jp