

博士論文

社会的敗北ストレス経験の記憶固定化  
における腹側海馬の役割

中山 亮太

# 目次

1. 序論 .....	4
1-1. 動物モデルを用いたストレス研究の意義 .....	4
1-2. ストレス経験が脳に与える影響 .....	5
1-3. 記憶の固定化と海馬 .....	5
1-4. 海馬の持つ heterogeneity .....	6
1-5. 本研究の目的 .....	6
2. 方法 .....	8
2-1. 実験動物 .....	8
2-2. 試薬 .....	8
2-3. 社会的敗北ストレス .....	9
2-4. 社会的相互作用試験 .....	10
2-5. 手術 .....	11
2-6. 薬物局所投与実験 .....	12
2-7. 光遺伝学実験 .....	12
2-8. In vivo 電気生理学実験 .....	13
2-9. 電極跡等の確認 .....	13

2-10. データ解析 .....	15
2-11. 行動解析 .....	15
2-12. 脳局所場電位の解析 .....	15
2-13. スパイクの解析 .....	15
<b>3. 結果 .....</b>	<b>17</b>
3-1. 社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶評価課題の構築 .....	17
3-2. 嫌悪記憶の固定化には腹側海馬が必要である .....	18
3-3. 嫌悪記憶の固定化には、ストレス負荷直後の腹側海馬の神経活動が必要である .....	19
3-4. ストレス負荷中に応答する腹側海馬神経細胞集団が存在する .....	20
3-5. ストレス負荷後に腹側海馬でリップルの発生頻度が増加する .....	21
3-6. 腹側海馬におけるリップル発生頻度の増加は覚醒中に生じる .....	23
3-7. 腹側海馬の神経細胞はストレス負荷後のリップルにロックして発火しやすくなる .....	24
3-8. ストレス負荷中に応答した腹側海馬神経細胞ほど、ストレス負荷後のリップルにロックして発火しやすくなる .....	25

4. 図 .....	27
5. 考察 .....	38
5-1. 社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶の形成.....	38
5-2. 腹側海馬のリップル .....	40
5-3. 社会的敗北ストレスとうつ病 .....	41
6. 総括 .....	43
7. 参考文献 .....	44
謝辞 .....	50

# 1. 序論

## 1-1. 動物モデルを用いたストレス研究の意義

私たちは、日々の生活の中で様々なストレスに曝されている。特に対人関係によるストレスは、現代社会において大きな問題となっている。社会的ストレスは、うつ病や PTSD などの精神疾患の発症にも関与すると考えられており、そのメカニズムを解明することは非常に重要である。そのためには、ストレスがどのように脳に影響を与えるかを調べる必要がある。ヒトの被験者を対象とした fMRI (機能的磁気共鳴画像法; functional magnetic resonance imaging) による脳活動の異常を調べた研究は数多く存在する (Roberson-Nay et al., 2006; Dichter et al., 2015; Drysdale et al., 2017)。しかし、fMRI は脳血流変化を測定する技術であり、脳領域全体としての活動量の増加・減少を調べることはできるが、その脳領域内で個々の神経細胞がどのような活動を示しているかを知ることはできない。また、ヒトの研究では loss of function, gain of function など介入実験を行うことができないため、測定によって見出された脳活動が相関関係なのか因果関係なのかを明らかにすることは困難である。

一方で、動物モデルとしてげっ歯類を用いることによって、脳内に直接記録電極を刺入する侵襲的な実験が可能となり、個々の神経細胞の活動を調べることができる。また、介入実験を行うことができるため、因果関係に迫ることが容易となる。本研究では、ヒトの社会的ストレスを模倣したモデルである、マウスの社会的敗北ストレスを用いる。

### 1-2. ストレス経験が脳に与える影響

動物はストレスのような嫌悪的な出来事を経験すると、再び同じような状況に置かれたとき、その経験に基づいて忌避行動を起こすようになる。こうした嫌悪的な出来事にさらされている時間自体は多くの場合数秒から数分程度と非常に短時間である。それに関わらず脳はその経験の記憶を形成し、長期的に保持することによって、次の行動へ反映させることができる。これが可能となるのは、経験後にその記憶を構成する神経ネットワークが脳内に強固に形成されるためである。この記憶の形成には、シナプス可塑性が関与すると考えられている。特に、シナプスの長期増強 (LTP) は記憶の素子であると考えられている (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss and Collingridge, 1993; Nabavi et al., 2014)。これらのことから、ストレス経験は脳内の特定の神経ネットワークを活性化させ、そのネットワークがシナプス可塑性 LTP を介して強固なものとなることで、ストレス経験の記憶が保持されると考えられる。このプロセスを「記憶の固定化」という。私は、この記憶の固定化に着目して研究を行うことで、ストレス経験が脳に与える影響を調べることにした。

### 1-3. 記憶の固定化と海馬

記憶の固定化を担う脳領域として、海馬がよく知られている ; (Morris et al., 1982; Morris et al., 1986)。記憶の固定化時に海馬では、記憶の獲得時に活動した神経細胞集団が、その後の安静時・睡眠時に何度も繰り返し同期的に再活動する (Wilson and McNaughton, 1994; Lee and Wilson, 2002; Dupret et al., 2010; van de Ven et al., 2016) ことで、シナプス可塑性 LTP が生じる (Sadowski et al., 2016)。この細胞集団が再び活

動することによって記憶が想起され、行動が選択される (Guzowski et al., 1999; Liu et al., 2012; Ramirez et al., 2013; Redondo et al., 2014; Ramirez et al., 2015) と考えられている。

#### 1-4. 海馬の持つ heterogeneity

ここで注意すべきことに、上述の先行研究を含む記憶の固定化に関する海馬研究は、そのほぼすべてが背側の海馬で行われてきた。その要因として、背側海馬と比較して腹側海馬は脳深部に存在し、また狭い領域であるため、電極を刺入するのが容易ではなく、神経活動の記録が困難であることが挙げられる。

しかし海馬は均質ではなく、背腹軸で異なる性質を持つことが知られている (Fanselow and Dong, 2010)。背側海馬は特に空間記憶に関わるのに対し、ストレスのような情動記憶には腹側海馬が関わると考えられている。なぜなら、腹側海馬は扁桃体や前頭前皮質といった、情動に関わる脳領域と相互に投射関係を有しており (Ciocchi et al., 2015)、実際に不安や恐怖などの情動行動に関与することが知られている (Adhikari et al., 2011; Jimenez et al., 2018) ためである。さらに近年、腹側海馬は社会性記憶にも必要であることが明らかとなってきた (Okuyama et al., 2016; Meira et al., 2018; Phillips et al., 2019)。こうした背景から、社会的ストレスの記憶固定化には腹側海馬が関わっているのではないかと仮説を立てた。

#### 1-5. 本研究の目的

本研究では、社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶の固定化にかかわる脳内神経

活動メカニズムを明らかにすることを目的として、動物モデルを用いた現象の記述および介入実験による因果関係の検討と神経活動の記録を試みた。具体的には、マウスを用いて、社会的敗北ストレスの記憶固定化に腹側海馬が必要か、必要だとすればどのような神経活動メカニズムがあるのかを明らかにすることを目的とし、検証を行った。



## 2. 方法

### 2-1. 実験動物

全ての動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物への苦痛を最小限に抑えるための最大限の努力のもとに行った(承認番号:P29-11, 14)。

全ての実験には、6 または 7 週令で購入した、10-15 週令の雄性 C57BL/6J マウス (SLC, Shizuoka, Japan) を用いた。すべての C57BL/6J マウスは 3~4 匹ずつ、自由摂食・摂水下、12 時間の明暗サイクル(8 時点灯、20 時消灯)で飼育し、手術後から、あるいは行動試験の1週間前から、1匹ずつ飼育した。実験開始までに 3 日間以上ハンドリングを行った。社会的敗北ストレスにはリタイアの雄性 ICR マウス (SLC, Shizuoka, Japan) を用いた。すべての ICR マウスは 1 匹ずつ、自由摂食・摂水下、12 時間の明暗サイクル(20 時点灯、8 時消灯)で飼育した。すべての行動実験は 8 時から 20 時の間に行った。

### 2-2. 試薬

•Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free phosphate-buffered saline (PBS (-) )

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O 2.90 g、KCl 0.20 g、NaCl 8.00 g を蒸留水 1 L に溶かして使用した。

•4% Paraformaldehyde in PBS (PFA)

Paraformaldehyde 40.00 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O 27.65 g を蒸留水 1 L に加え、60°C

で溶かした後、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.95 g を溶かして使用した。

- ・生理食塩水

NaCl 9.0 g を蒸留水 1 L に溶かして使用した。

- ・ムシモール

Muscimol (Sigma, M1523-5MG) 5 mg を生理食塩水 5 mL に溶かして 1.0 mg/mL で使用した。

- ・AAV<sub>5</sub>-CaMKII-Arch3.0-EYFP, AAV<sub>5</sub>-CaMKII-EYFP

UNC vector core から購入したものを使用した。力価はそれぞれ  $2.5 \times 10^{12}$  virus molecules/mL,  $6.0 \times 10^{12}$  virus molecules/mL であった。

### 2-3. 社会的敗北ストレス

社会的敗北ストレスは、先行研究 (Golden et al., 2011) を参考にして行った。社会的敗北ストレスには Resident-Intruder 試験を用いた。ストレス負荷を行う 1 週間以上前からリタイア雄性 ICR マウスをホームケージ (42.5 cm × 26.6 cm × 15.5 cm) で個飼いした。十分な攻撃を行う ICR マウスをスクリーニングするため、スクリーニング用の C57/BL6J マウスを ICR マウスのホームケージに 3 分間曝露するセッションを 1 日 3 回、3 日間連続で行い、連続 2 セッション以上で 1 分間以内に攻撃が見られた ICR マウスのみを resident として採用した。

スクリーニングののち、resident の ICR マウスのホームケージに実験対象となる intruder の C57BL/6J マウスを 10 分間曝露し、社会的敗北ストレスを与えた。次に間接的なストレスを与えるため、オープンフィールド (39.3 cm × 39.3 cm × 27 cm) へ resident および intruder を移動させた。オープンフィールドの中央に熱融解型 3D プリンター (UP Plus2, TierTime Technology, Beijing, China) で作製したメッシュの円筒 (直径 10 cm, 高さ 20 cm) の内側に intruder を提示し、メッシュ円筒の周囲を resident に 5 分間探索させた。

ストレスを与えないコントロール群では、resident のホームケージに曝露する際に中央に透明の仕切りを設置し、仕切りを挟んで反対側に resident と intruder を提示することで、攻撃が生じないようにした。

#### 2-4. 社会的相互作用試験

社会的相互作用試験は、10 lux ほどの照明環境で行った。オープンフィールド (39.3 cm × 39.3 cm × 27 cm) の 1 辺の中心に熱融解型 3D プリンターで作製したメッシュケージ (7 cm × 10 cm × 20 cm) を設置した。試験は、メッシュケージが空の状態 (notarget) とメッシュケージ内に resident の ICR マウスを提示した状態 (target) の 2 つのセッションからなり、それぞれのセッションで C57BL/6J マウスに 150 秒間オープンフィールド内を探索させた。2 つのセッションの間には 30 秒のインターバルを設け、その間 C57BL/6J マウスはホームケージに戻した。

試験の成績評価には、interaction zone (メッシュケージから 8 cm 以内、15 cm × 26 cm) への滞在時間を用いた。Social interaction 比 (SI 比) は、notarget セッションに対する target セッションでの interaction zone 滞在時間の比で算出した。

## 2-5. 手術

薬物局所投与実験の際には、濃度 3 %のイソフルラン吸入麻酔で導入後、濃度 1-2% で維持した。三点固定装置に頭部を固定し、頭皮を切開した。頭蓋骨には固定のための 0.8 mm × 1.5 mm のアンカービス(室町機械株式会社)を 6 本程度埋め込んだ。両側の背側海馬あるいは腹側海馬にカニューレを刺入するため、bregma から AP 方向に-1.8 mm、ML 方向に 1.8 mm、あるいは AP 方向に-3.1 mm、ML 方向に 3.6 mm の位置を中心に直径 1.0 mm 程度の穴をドリルで頭蓋骨にあけた。硬膜を取り除き、ガイドカニューレを 1.5 mm あるいは 3.8 mm 刺入した。ガイドカニューレ内が詰まるのを防ぐため、ダミーカニューレを挿入した。

光遺伝学実験の際には、上記と同様にアンカービス埋め込み後、両側腹側海馬にアデノ随伴ウイルスを導入および光ファイバーを刺入するため、bregma から AP 方向に-3.1 mm、ML 方向に 3.6 mm の位置を中心に直径 1.0 mm 程度の穴をドリルで頭蓋骨にあけた。硬膜を取り除き、ガラス電極を 4.0 mm 刺入して AAV<sub>5</sub>-CaMKII-Arch3.0-EYFP または AAV<sub>5</sub>-CaMKII-EYFP を 300 nL (100 nL/min) 局所投与した。投与後 1 分間留置し、100 μm 引き上げてから再び 5 分間留置した。その後ガラス電極を引き抜き、光ファイバーを 3.5 mm 刺入した。

In vivo 電気生理学実験の際には、上記と同様にアンカービス埋め込み後、小脳にグラウンド線をはんだ付けした 0.8 mm×3.0 mm のグラウンドビス(室町機械株式会社)を 2 本埋め込んだ。右側腹側海馬に電極を刺入するため、bregma から AP 方向に-3.1 mm、ML 方向に 3.6 mm の位置を中心に直径 1.4 mm 程度の穴をドリルで頭蓋骨にあけた。硬膜を取り除き、独立に可動な 7 本の電極を格納したマイクロドライブ

を刺入した。筋電図用の導線には、バイオフィレックスワイヤー (AS633, COONER WIRE, CA, USA) を用いて首の付け根の筋肉に縛りつけた。グラウンド線および筋電図線はマイクロドライブの所定の位置にはんだ付けした。

露出した脳表は Kwik-Sil Silicone Elastomer (World Precision Instruments, FL, USA) で保護し、その後接着剤(スーパーボンド C & B、サンメディカル)で固定した。歯科用セメント Refine Bright(山八歯材工業)でカニューレまたはファイバー、またはマイクロドライブを頭蓋骨に固定した。

## 2-6. 薬物局所投与実験

薬物の局所投与は、社会的敗北ストレスの負荷直後にホームケージで行った。両側の背側海馬あるいは腹側海馬に埋め込んだガイドカニューレからダミーカニューレを抜き、代わりにシリンジに接続したインジェクションカニューレを挿入した。シリンジポンプを用いて生理食塩水またはムシモールを 500 nL (100 nL/min) 投与した。投与完了後 3 分間留置し、その後インジェクションカニューレを抜いた。

## 2-7. 光遺伝学実験

光照射は、社会的敗北ストレス負荷の直後、あるいは 4 時間後からホームケージで 2 時間行った。長時間の光照射による細胞死を避けるため、11 分間の光照射 ON と 1 分間の光照射 OFF の 12 分間のセットを 10 回繰り返した。光源と刺激装置はそれぞれ Model COME2-LB473/532/100 (LUCIR, Tsukuba, Japan)、A310 (World Precision Instruments, FL, USA) を使い、532 nm の波長の光を 1-2 mW の強度で照射した。

## 2-8. In vivo 電気生理学実験

電気生理学実験を行うにあたって、記録に用いる電極セットを自作した。Brunetti et al., J. Vis. Exp., 2014 を参考にした。光硬化型 3D プリンター (Form2, Formlabs) で作製したコアボディーに電子基盤 (EIB-36-PTB, Neuralynx, MT, USA) を取り付け、7 本の電極を接続した。電極は 17  $\mu\text{m}$  径のポリイミドでコーティングされたプラチナ (90%) /イリジウム (10%) 製のワイヤ (California Fine Wire, CA, USA) を用いて 4 本まとめてねじることで作製した tetrode を用いた。Tetrode は先端をプラチナ溶液でプレーティングして抵抗値を 150–300  $\text{k}\Omega$  まで下げた。個々の電極を独立に制御できるように、1 周 250  $\mu\text{m}$  の調整ネジ (10.74 mm  $\times$  1.2 mm, 野方電気工業) を取り付けた。

In vivo 電気生理記録は、電極セットの基盤をヘッドステージ (Celeplex M, Blackrock Microsystems, UT, USA) に接続し、記録装置 Cerebus (Blackrock Microsystems, UT, USA) を用いて行った。脳局所場電位の記録は、サンプリングレートを 2 kHz とし、500 Hz 以下のローパスフィルタをかけて行った。ユニット記録は、サンプリングレートを 30 kHz とし、600–6000 Hz のバンドパスフィルタをかけて行った。

## 2-9. 電極跡等の確認

脳に刺入した電極やカニューレ、ファイバーの跡の確認は、実験後に灌流固定して脳を取り出したのち、薄層切片にして染色することで行った。

灌流固定に際して、ウレタン (10 mg/kg) の腹腔内投与で麻酔した後、胸部を開いて左心室から 4°C の PBS を灌流して血抜きを行い、さらに 4°C の 4 % PFA を灌流した。頭部を切り落とし、2 時間以上 4°C 保存した後、脳を取り出して後固定のため

4°C 下で 4% PFA 中の一晩処置した。

脳薄層切片標本を作製するにあたり、4% PFA から取り出して 4°C の 20 % スクロース溶液 (PBS に溶解) に移し 1 晩以上静置した後、4°C の 30 % スクロース溶液に移し再び 1 晩以上静置することで脱水処理を行った。その後、脳をドライアイス中で凍結させ、ミクロトーム SM2010R (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) により厚さ 50  $\mu\text{m}$  あるいは 100  $\mu\text{m}$  の脳薄層切片を作製した。

電極跡を確認するにあたって、cresyl violet 染色を行った。脳薄層切片をスライドガラス上に貼り付け、その後一晩風乾した。Cresyl violet 染色は、以下の手順に従って行った。まず、標本を貼り付けたスライドガラスを 2 分間蒸留水に浸して親水化した後、70, 80, 90, 100% エタノールの順に 10 秒間以上浸して脱水を行った。その後、キシレンに 2 分以上浸して脱脂し、100, 90, 80, 70% エタノールの順に 10 秒間以上浸して再び親水化した。冷水で軽く洗浄した後、暗所にて cresyl violet 液に 5 分間以上浸して染色を行った。染色時間は、染色の進み具合を確認しながら決めた。染色できたことを確認した後、冷水で軽く洗浄し、95 % 酢酸エチル溶液、100 % エタノールに浸して脱色した。封入剤 (PARAmount-D, Falma, Tokyo, Japan) を用いて封入した。

カニューレ、ファイバー跡を確認するにあたっては、脳薄層切片を DAPI 染色液に約 1 分間浸けて染色した後、スライドガラスに貼り付け、封入剤 PermaFlour (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を用いて封入した。

跡の確認は、倒立型蛍光位相差顕微鏡 BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan) により行った。

## 2-10. データ解析

データ解析および統計解析は MATLAB 2019a (Math Works, MA, USA) を用いて行った。全てのデータは平均±標準誤差で示した。

## 2-11. 行動解析

行動の記録は、カメラ (MCM-303NIR-880-LED, Gazo, Niigata, Japan) を用いてサンプリングレート 15 Hz で行った。マウスの位置の検出は、3 Hz にダウンサンプリングした状態で行った。

## 2-12. 脳局所場電位の解析

リップルの検出は、脳局所場電位に 150–250 Hz のバンドパスフィルタをかけて行った。二乗平均平方根からパワーを算出した後、パワーの値の下位 50%から平均と標準偏差を求め、平均から  $4 \times$  標準偏差以上高いパワーの値をとった時間が 20 ms 以上となったものを抽出し、リップルと定義した。

## 2-13. スパイクの解析

スパイク検出は、30 kHz で記録した脳局所場電位から、振幅が  $-60 \mu\text{V}$  を超えるものを抽出することによって行った。抽出したスパイクに対して、MClust4.3 (by Dr. Redish, A. D., <http://redishlab.neuroscience.umn.edu/MClust/MClust.html>) を用いてスパイクソーティングを行った。スパイクソーティングは、記録されたスパイクを、個々の神経細胞に振り分けるための手法である。各神経細胞が特有のスパイクの波形のパターンを持っていることを利用し、スパイクの波形の振幅、波形のピークとトラフの差、波形



の面積、PCA の第一主成分の 4 つの要素を用いて分類した。

リップルにロックした発火活動を解析するため、リップル発生タイミングを 0 として相対的発火時間を算出し、20 ms ごとにビンを区切って発火率を求めた。さらに、リップル発生タイミングから 100–500 ms 前をベースラインとして発火率を z スコア化し、リップル発生タイミングから 0–100 ms 後の発火率 (z スコア) の平均をリップルにロックした発火活動の程度と定義した。

「ストレス負荷中の応答度」は、レスト(プレ)中の発火率と間接ストレス中の発火率の比を用いた。「ストレス負荷後の再活動度」は、リップル中の発火率の、レスト(プレ)とレスト(ポスト)の比を用いた。

### 3. 結果

#### 3-1. 社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶評価課題の構築

まず、ストレス経験が嫌悪記憶を形成するのに十分であるかを検討するために、行動試験系を構築した。ストレス経験には、マウスの Resident-Intruder 試験を用いた社会的敗北ストレスモデルを採用した。これは、体格の勝る雄性 ICR マウス (Resident) のホームケージに体格の小さな雄性 C57Bl/6J マウス (Intruder) を提示することによって、攻撃性行動を誘発するモデルである。社会的敗北ストレスを 10 日間にわたって慢性的に負荷することによってうつ様行動が誘起される(Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007) ことから、嫌悪刺激として作用していると考えられる。嫌悪記憶の評価は、ストレス負荷の翌日に社会的相互作用試験を用いて行った。社会的相互作用試験は、intruder の C57Bl/6J マウスが、空のメッシュケージのおかれたオープンフィールドを探索する notarget セッションと、resident の ICR マウスがメッシュケージ内にいる状態でオープンフィールドを探索する target セッションの 2 つのセッションからなる(図 1A)。一般にマウスは、他個体に興味を示して近づく習性をもつため、target セッションでメッシュケージ周辺の滞在時間が notarget セッションと比較して増加する。一方で、ストレス負荷により resident の ICR マウスに対し嫌悪記憶が形成されていれば、逆に target セッションでメッシュケージ周辺の滞在時間が減少すると考えられる。この行動特性を利用し、メッシュケージの周辺を interaction zone と定義し、interaction zone 滞在時間を計測することで嫌悪記憶を評価した。図 1B に、社会的相互作用試験中のマウスの行動軌跡の例を示す。ストレスを負荷されていないコントロール群のマウスは、notarget セッションと target セッションで行動に大きな変化はない一方で、ストレスを負

荷されたストレス群のマウスは、target セッションで interaction zone からの忌避行動を示した。これを定量した結果が図 1C である。ストレス群では、target セッションで有意な interaction zone 滞在時間の減少がみられた(コントロール群:  $56.8 \pm 4.2$  s (notarget),  $62.1 \pm 5.8$  s (target),  $p = 0.44$ ,  $n = 11$  mice; ストレス群:  $50.1 \pm 6.6$  s (notarget),  $30.5 \pm 6.6$  s (target),  $***p = 0.0013$ ,  $n = 16$  mice, paired  $t$ -test)。この忌避行動の程度を定量するため、social interaction 比(以下、SI 比)を用いた。SI 比は、notarget セッションでの interaction zone 滞在時間に対する、target セッションでの interaction zone 滞在時間の比として定義される値で、忌避行動を示すマウスではこの値が 1 を下回る。結果は図 1D に示す通り、ストレス群では SI 比は 1 を下回り、コントロール群と比較して有意に低かった( $1.14 \pm 0.12$  (コントロール群),  $0.55 \pm 0.10$  (ストレス群),  $****p = 0.00074$ ,  $n = 11$ ,  $16$  mice, Student's  $t$ -test)。以上の結果から、社会的敗北ストレスの負荷によって、嫌悪記憶が形成されることが示された。

### 3-2. 嫌悪記憶の固定化には腹側海馬が必要である

次に、社会的敗北ストレスにおける嫌悪記憶の固定化に腹側海馬が必要か、薬物の局所投与によって検討した。あらかじめマウスの両側腹側海馬に局所投与用のガイドカニューレを埋め込み、1 週間以上回復を待ってからストレスを負荷した。ストレス負荷後、すぐにインジェクションカニューレを刺入し、GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニストのムシモール ( $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,  $0.5 \mu\text{L}/\text{side}$ )、あるいはコントロールとしての生理食塩水を局所投与した(図 2A)。ストレス負荷直後からの両側腹側海馬のムシモールによる活動抑制によって、翌日の社会的相互作用試験において有意な SI 比の改善がみられた(図

2B;  $0.88 \pm 0.14$  (生理食塩水群),  $1.43 \pm 0.18$  (ムシモール群),  $*p = 0.029$ ,  $n = 7, 6$  mice, Student's *t*-test)。対照として、背側海馬でも同様の実験を行った。腹側海馬と異なり、背側海馬の抑制では SI 比の改善は見られなかった (図 2C;  $0.48 \pm 0.11$  (生理食塩水群),  $0.37 \pm 0.04$  (ムシモール群),  $p = 0.38$ ,  $n = 4, 4$  mice, Student's *t*-test)。以上の結果から、社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶の固定化には、背側海馬ではなく腹側海馬が必要であることが示唆された。

### 3-3. 嫌悪記憶の固定化には、ストレス負荷直後の腹側海馬の神経活動が必要である

上項で行ったムシモールによる神経活動の抑制は、約 6 時間の長時間にわたって持続することが知られている。そこで、記憶の固定化が生じている時間をより詳細に検討するため、時間解像度高く神経活動を操作できる、光遺伝学的手法を用いた。光遺伝学的手法は、光照射によって特異的に活性化するタンパク質を遺伝的に細胞に導入する手法であり、特に神経細胞に導入することで、光照射によって時間解像度高く神経活動を操作することが可能となる。本実験においては、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて、興奮性神経細胞マーカーである CaMKII プロモーター下特異的に光感受性プロトンポンプであるアーキロドプシン 3.0 (Arch3.0) を導入することを試みた。Arch3.0 は、緑色光の照射タイミング特異的にプロトンポンプが開き、神経細胞を過分極させることで発火活動を抑制することができる。両側腹側海馬に AAV<sub>5</sub>-CaMKII-Arch3.0-EYFP あるいはコントロールとして AAV<sub>5</sub>-CaMKII-EYFP を局所投与し、タンパク質の安定した発現まで 3 週間以上待ってからストレスを負荷した。記憶の固定化のタイムコースを検討するため、ストレス負荷直後からの 2 時間光照射を行う群と、ストレス

負荷 4 時間後から 2 時間光照射を行う群を設けた(図 3A)。ストレス負荷直後から光照射をした群では、翌日の社会的相互作用試験で SI 比の有意な改善がみられたのに対し(図 3B;  $0.72 \pm 0.16$  (YFP 群),  $1.46 \pm 0.18$  (Arch 群),  $**p = 0.0074$ ,  $n = 11$ , 8 mice, Student's *t*-test)、4 時間後から光照射をした群では、SI 比の改善は見られなかった(図 3C;  $0.18 \pm 0.05$  (YFP 群),  $0.26 \pm 0.14$  (Arch 群),  $p = 0.61$ ,  $n = 4$ , 4 mice, Student's *t*-test)。以上の結果から、社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶の固定化には、ストレス負荷直後の 2 時間に腹側海馬で生じる神経活動が必要であることが示唆された。

#### 3-4. ストレス負荷中に応答する腹側海馬神経細胞集団が存在する

ここまでの結果より、嫌悪記憶の固定化時には、腹側海馬の神経活動が必要であることが示唆されたことから、次に腹側海馬の神経活動を電気生理学的に記録することを試みた。自由行動下のマウスからの神経活動記録を行うため、先行文献 (Brunetti et al., 2014) を参考にし、3D プリンターを用いて自作した電極セットを用いたマルチユニット記録法を採用した。

記憶の固定化に関与する神経活動を記録するために、以下のような実験パラダイムを用いた。まず、ベースラインとなる腹側海馬の神経活動を記録するために、ストレス負荷直前に、ホームケージで 30 分間のレスト記録を行った(以下、レスト(プレ))。次に、Resident-Intruder 試験によるストレス負荷時には、記録装置の破損の危険から神経活動を記録することが困難であったため、Resident-Intruder 試験直後に、仕切りのある環境で間接的にストレスを負荷した。具体的には、オープンフィールドの中央に

透明な筒を置き、intruder マウスを筒の中に入れ、周囲を resident マウスに探索させた状態で神経活動記録を行った。最後に、記憶の固定化に關与する神経活動を記録するために、ストレス負荷後から 2 時間ホームケージでレスト記録を行った(以下、レスト(ポスト))。

まず、ストレス経験中に活動する神経細胞が腹側海馬に存在するかを検討するため、個々の腹側海馬神経細胞の、レスト(プレ)における発火率と、間接ストレス中における発火率を比較した。図 4A はその代表例である。図 4A 上段の細胞#1 は、間接ストレス中に発火率が上昇しているのに対し、下段の細胞#2 は、逆に発火率が減少している様子が観察される。記録した全 22 細胞について解析した結果を図 4B に示す。全体の傾向として、間接ストレス中に発火率の上昇、あるいは減少は見られなかった ( $1.15 \pm 0.29$  Hz(レスト(プレ)),  $1.50 \pm 0.63$  Hz(間接ストレス),  $p = 0.60$ ,  $n = 22$  cells, paired  $t$ -test) が、発火率が上昇する細胞と、減少する細胞が存在することが明らかとなった。以上の結果から、少なくとも腹側海馬の一部の神経細胞集団は、ストレスに応答して活動が上昇することが示唆された。

### 3-5. ストレス負荷後に腹側海馬でリップルの発生頻度が増加する

記憶の固定化に關与する神経活動として、海馬で生じるリップルと呼ばれる脳波がある (Carr et al., 2011)。リップルは 150-250Hz の高周波振動であり、海馬の多数の神経細胞が同期的に発火することによって作り出される脳波である。新奇体験後のレスト中に生じるリップル中には、直前の新奇体験の記憶をつかさどる海馬の神経細胞集団が再活性化することが知られている (Lee and Wilson, 2002; van de Ven et al.,

2016)。この現象は「記憶の再生」と呼ばれ、リップルは記憶の固定化に重要な脳波として、これまで多くの研究者によって研究されてきた。しかし、リップルや記憶の再生についての研究は全て、空間記憶学習課題を用いて背側海馬からの神経活動記録によって行われてきており、腹側海馬におけるリップルの特性および機能は全く明らかとなっていない。

背側海馬を用いた過去の知見において、リップルは新奇環境探索後のレスト中に発生頻度が増加する (Eschenko et al., 2008) ことが知られている。そこでまず、腹側海馬においても社会的敗北ストレスという新奇経験後にリップルの発生頻度が増加するか検討した。図 5A に、ストレスを受けていないコントロール群とストレス負荷群のリップル発生頻度の経時変化を示す。コントロール群ではレスト(プレ)とレスト(ポスト)でリップルの発生頻度に差が見られなかったのに対し、ストレス群ではストレス負荷によって有意なリップル発生頻度の増加が見られた(図 5B; コントロール群:  $0.16 \pm 0.058$  /s (レスト(プレ)),  $0.21 \pm 0.038$  /s (レスト(ポスト)),  $p = 0.22$ ,  $n = 3$  mice; ストレス群:  $0.12 \pm 0.031$  /s (レスト(プレ)),  $0.26 \pm 0.029$  /s (レスト(ポスト)),  $*p = 0.028$ ,  $n = 8$  mice, paired  $t$ -test)。コントロール群は、ストレスは負荷されていないが、新奇環境には提示されている。背側海馬では新奇環境への提示によってリップルの発生頻度が上昇することから、もし腹側海馬が背側海馬と同様に新奇環境の記憶に関与するのであれば、コントロール群でもリップルの増加がみられるはずである。しかし、ストレス群でのみリップルの増加がみられたことから、腹側海馬では、新奇環境への提示ではなく、ストレス負荷によって初めてその後のリップルの発生頻度が上昇することが示唆された。

### 3-6. 腹側海馬におけるリップル発生頻度の増加は覚醒中に生じる

前項で、背側海馬では新奇環境探索後にリップルの発生頻度が上昇すると記したが、それは特に睡眠中に顕著であることが知られている (Norimoto et al., 2018)。腹側海馬においても、ストレス負荷によるリップル発生頻度の増加が睡眠中に生じているかを検討するため、筋電図を指標に用いて (Miyamoto et al., 2016) レスト中における睡眠時間を検出した(図 6A)。レスト(プレ)ではあまり睡眠はみられず、レスト(ポスト)でもストレス負荷直後にはほとんど睡眠は生じていなかった。一方で、時間経過とともに睡眠の割合が増加していく傾向が見られた。もしストレス負荷による腹側海馬のリップル発生頻度の増加が背側海馬と同様に睡眠中に顕著に生じるのであれば、レスト(ポスト)において、睡眠割合の増加に伴って後半に発生頻度が上昇するはずである。しかし予想に反し、レスト(ポスト)におけるリップルの発生頻度は 2 時間ほぼ一定であった(図 6A)。このことから、リップルの発生頻度の上昇が睡眠中に顕著に生じる、という仮説は誤りであると考えられる。そこで、睡眠中と覚醒中に分類してリップルの発生頻度を定量した(図 6B)。驚くべきことに、睡眠中のリップル発生頻度はレスト(プレ)とレスト(ポスト)で差はみられず( $0.44 \pm 0.15$  (レスト(プレ)),  $0.34 \pm 0.046$  /s(レスト(ポスト)),  $p = 0.50$ ,  $n = 5$  mice, paired  $t$ -test)、むしろ覚醒中のリップル発生頻度がストレス負荷によって有意に上昇していた( $0.19 \pm 0.026$  /s (レスト(プレ)),  $0.068 \pm 0.011$  /s(レスト(ポスト))),  $***p = 0.0023$ ,  $n = 8$  mice, paired  $t$ -test)。

リップルの振幅強度や持続時間は、リップル中に生じた同期発火活動に参加した海馬神経細胞の数を反映する。すなわち、より振幅の大きなリップル、持続時間の長いリップルほど、多くの海馬神経細胞の同期発火活動からなり、記憶の固定化に強く



関与していると考えられている (Buzsaki, 2015)。そこで、ストレス負荷によってリップルの振幅強度や持続時間に変化がみられるか、睡眠中と覚醒中に分けて定量した(図 7A, B)。睡眠中のリップルは、レスト(プレ)とレスト(ポスト)でリップルの強度や持続時間に差はみられなかったのに対し(強度:  $6.70 \pm 0.67$  (レスト(プレ)),  $7.02 \pm 0.65$  (レスト(ポスト)),  $p = 0.28$ ,  $n = 5$  mice, 持続時間:  $54.4 \pm 0.27$  ms (レスト(プレ)),  $56.1 \pm 0.22$  ms (レスト(ポスト)),  $p = 0.32$ ,  $n = 5$  mice, paired  $t$ -test)、覚醒中のリップルは、ストレス負荷によって強度、持続時間ともに有意に増加していた(強度:  $5.61 \pm 0.34$  (レスト(プレ)),  $6.38 \pm 0.39$  (レスト(ポスト)), \*\*\*\* $p = 0.00053$ ,  $n = 8$  mice, 持続時間:  $49.2 \pm 0.17$  ms (レスト(プレ)),  $52.6 \pm 0.15$  ms (レスト(ポスト)), \* $p = 0.014$ ,  $n = 8$  mice, paired  $t$ -test)。以上の結果から、睡眠中のリップルよりも、覚醒中のリップルのほうがストレスの記憶固定化に強く関与していることが示唆された。

### 3-7. 腹側海馬の神経細胞はストレス負荷後のリップルにロックして発火しやすくなる

前項まで、腹側海馬のリップルの発生頻度や大きさから記憶の固定化への関与を想定してきたが、実際に腹側海馬神経細胞がリップルにロックして発火しているのかを検討するため、リップルの発生タイミングに対して、個々の腹側海馬神経細胞が発火するタイミングを調べた。図 8A にその代表例を示す。この例では、レスト(プレ)ではリップルにロックした発火はみられなかったが、レスト(ポスト)では顕著にロックした発火が見られた。これを定量するため、リップル発生の 100~500 ms 前の発火率をベースとして、リップル発生の 0~100 ms 後の発火率を z スコア化した。これを記録した全 22 細胞についてまとめた結果が図 8B である。レスト(プレ)とレスト(ポスト)でリップルへの

ロックに有意な変化は見られなかった ( $z = 0.85 \pm 0.57$  (レスト(プレ)),  $1.42 \pm 0.57$  (レスト(ポスト)),  $p = 0.26$ ,  $n = 22$  cells, paired  $t$ -test)。そこで、睡眠中と覚醒中のリップルに分けて解析した結果が図 8C, D である。睡眠中のリップルではリップルへのロックにプレとポストで差は見られないのに対し ( $z = 0.49 \pm 0.37$  (レスト(プレ)),  $0.55 \pm 0.51$  (レスト(ポスト)),  $p = 0.86$ ,  $n = 13$  cells, paired  $t$ -test)、覚醒中のリップルではレスト(ポスト)で有意にロックした発火がみられた ( $z = 0.60 \pm 0.64$  (レスト(プレ)),  $1.55 \pm 0.75$  (レスト(ポスト)),  $*p = 0.033$ ,  $n = 21$  cells, paired  $t$ -test)。以上の結果から、リップルの結果と同様に、ストレス負荷後に腹側海馬の神経細胞は覚醒中のリップル中に同期発火しやすくなることが示唆された。

### 3-8. ストレス負荷中に応答した腹側海馬神経細胞ほど、ストレス負荷後のリップルにロックして発火しやすくなる

最後に、本研究で私の発見した腹側海馬の神経活動が記憶の固定化を担うものであることをより強く示唆するため、ストレス負荷中の活動と、レスト中の活動の関係を調べた。3-5 項で紹介したように、リップルは記憶の再生に関与する脳波である。すなわち、ストレス負荷中に応答した神経細胞が、その後のリップル中に再活動すると考えられる。そこで、3-4 項で発見した、間接ストレス中に発火率が上昇した腹側海馬神経細胞が、レスト(ポスト)中にリップルにロックして発火しやすくなっているか検討した。

レスト(プレ)中に対する間接ストレス中の発火率の比を「ストレス負荷中の応答度」とし、またレスト(プレ)のリップル中に対するレスト(ポスト)のリップル中の発火率の比を「ストレス負荷後の再活動度」として、両者をプロットした結果が図 9A である。両者の間

には強い正の相関が見られた ( $r = 0.60$ ,  $**p = 0.0052$ ,  $n = 22$  cells, Pearson's correlation)。このことから、ストレスに応答した腹側海馬神経細胞ほど、その後のリップル中に再活動しやすいことが示唆された。

3-6 項で、リップルレベルでは睡眠中よりも覚醒中のほうが記憶の固定化に寄与していることが示唆されてきた。そこで、上記で行った記憶の再生についての検討を、睡眠中と覚醒中に分けて行った。「ストレス負荷中の応答度」はそのままに、「ストレス負荷後の再活動度」のみを睡眠中のリップル、あるいは覚醒中のリップル選択的に算出してプロットした結果が図 9B および図 9C である。覚醒中の「再活動度」は「応答度」と強い正の相関がみられたのに対し ( $r = 0.69$ ,  $***p = 0.0020$ ,  $n = 21$  cells, Pearson's correlation)、睡眠中の「再活動度」と「応答度」の間に有意な相関関係はみられなかった ( $r = 0.52$ ,  $p = 0.086$ ,  $n = 13$  cells, Pearson's correlation)。以上の結果から、記憶の固定化は、従来考えられてきた睡眠中だけではなく、覚醒中においても生じていることが示唆された。

#### 4. 図

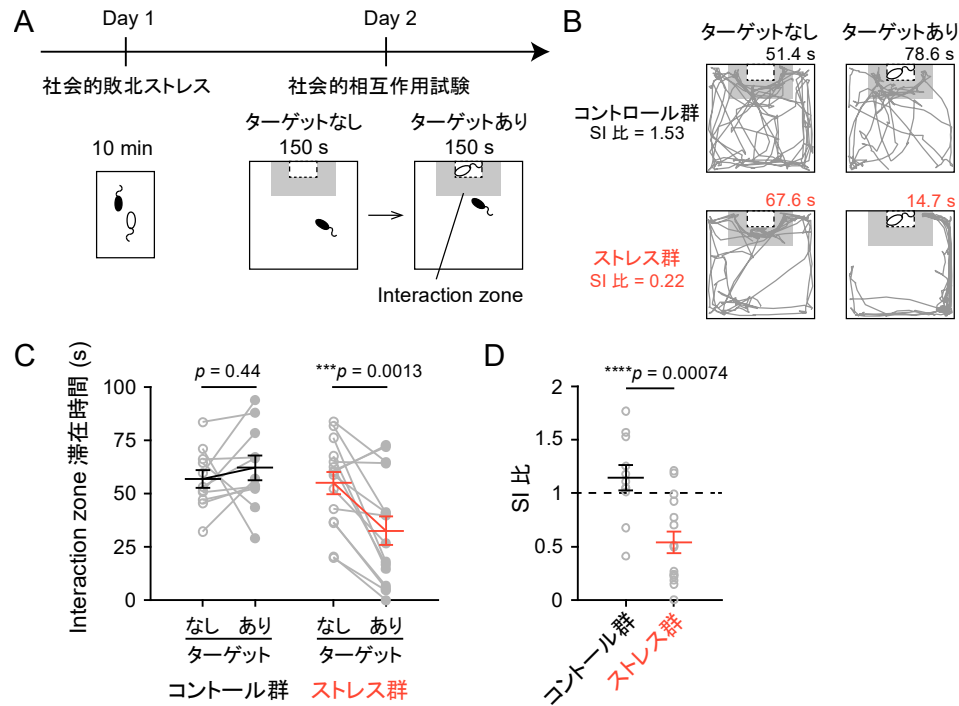


図 1 社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶課題の構築

A) 実験パラダイム。1 日目に社会的敗北ストレスを 10 分間負荷し、2 日目に社会的相互作用試験を行った。

B) 社会的相互作用試験における行動軌跡の代表例。上段がコントロール群、下段がストレス群。左がターゲットなしセッション、右がターゲットありセッションでの軌跡を表す。

C) Interaction zone 滞在時間。ストレス群では、ターゲットありセッションで interaction zone への滞在時間が有意に減少した。コントロール群:  $p = 0.44$ ,  $n = 11$  mice; ストレス群:  $***p = 0.0013$ ,  $n = 16$  mice, paired  $t$ -test.

D) SI 比。ストレス群はコントロール群と比較して有意に SI 比が低下した。\*\*\*\* $p = 0.00074$ ,  $n = 11, 16$  mice, Student's  $t$ -test.

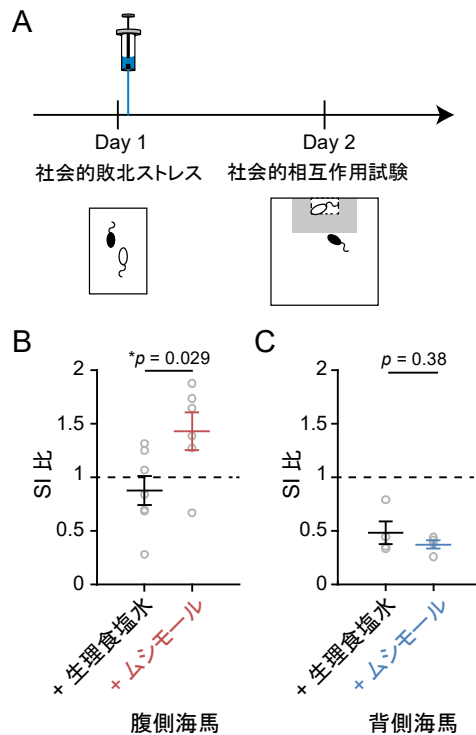


図 2 社会的敗北ストレス負荷による嫌悪記憶の固定化には背側海馬ではなく腹側海馬が必要である

A) 実験パラダイム。社会的敗北ストレスを負荷した直後に生理食塩水あるいはムシモールを腹側海馬あるいは背側海馬に局所投与した。

B) 腹側海馬への局所投与の結果。ムシモール投与によって SI 比の有意な改善が見られた。 $*p = 0.029$ ,  $n = 7$ , 6 mice, Student's  $t$ -test.

C) 背側海馬への局所投与の結果。ムシモール投与による SI 比への影響はみられなかった。 $p = 0.38$ ,  $n = 4$ , 4 mice, Student's  $t$ -test.

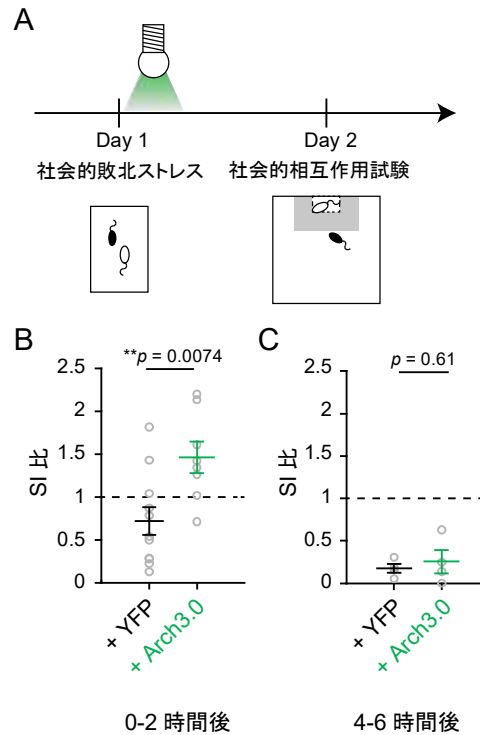


図 3 社会的敗北ストレス負荷による嫌悪記憶の固定化にはストレス負荷直後の腹側海馬の神経活動が必要である

A) 実験パラダイム。社会的敗北ストレスを負荷した直後あるいは4時間後から2時間にわたって腹側海馬への光照射を行った。

B) ストレス負荷直後から2時間の光照射の結果。光照射によって SI 比の有意な改善がみられた。 $**p = 0.0074$ ,  $n = 11$ , 8 mice, Student's  $t$ -test.

C) ストレス負荷4時間後から2時間の光照射の結果。光照射による SI 比への影響はみられなかった。 $p = 0.61$ ,  $n = 4$ , 4 mice, Student's  $t$ -test.

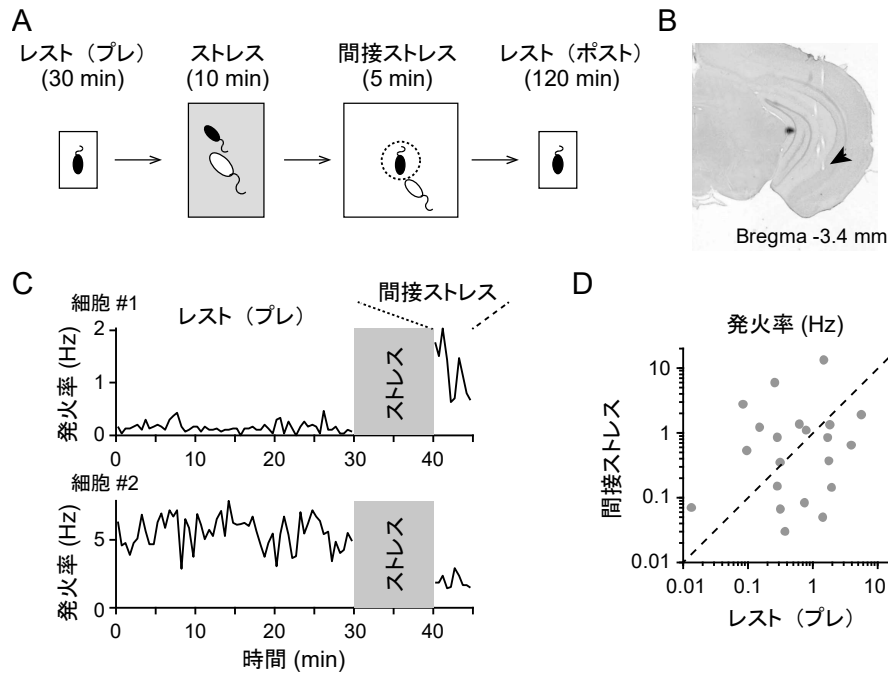


図 4 一部の腹側海馬神経細胞は社会的敗北ストレス負荷に応答して活動する

A) 実験パラダイム。電気生理学的記録を行うため、社会的敗北ストレス負荷の直前 30 分間と直後 120 分間にホームケージでのレスト記録を行った。また、ストレス負荷中の記録のため、10 分間の社会的敗北ストレス負荷の後、仕切られた状態で 5 分間間接ストレス下での記録を行った。

B) 腹側海馬に刺入した記録電極の後の代表例。鋏で電極先端の位置を表す。

C) 2 細胞の例。レスト(プレ)と間接ストレス中の発火率変化を表す。

D) 記録した全 22 細胞の結果。一部の腹側海馬神経細胞で、間接ストレス中に発火率の上昇がみられた。 $p = 0.60$ ,  $n = 22$  cells, paired  $t$ -test.



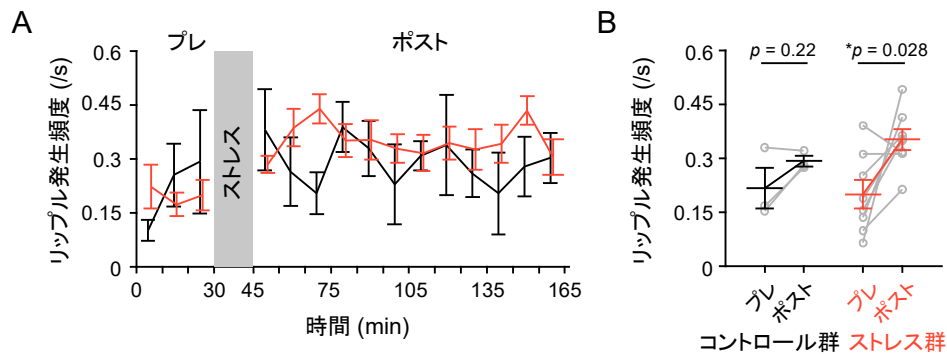


図 5 社会的敗北ストレス負荷により腹側海馬のリップル発生頻度が上昇する

A) リップル発生頻度の変化。黒はコントロール群、赤はストレス群を表す。

B) レスト(プレ)とレスト(ポスト)でのリップル発生頻度。ストレス負荷によってリップルの発生頻度が有意に上昇した。コントロール群;  $p = 0.22$ ,  $n = 3$  mice; ストレス群:  $*p = 0.028$ ,  $n = 8$  mice, paired  $t$ -test.

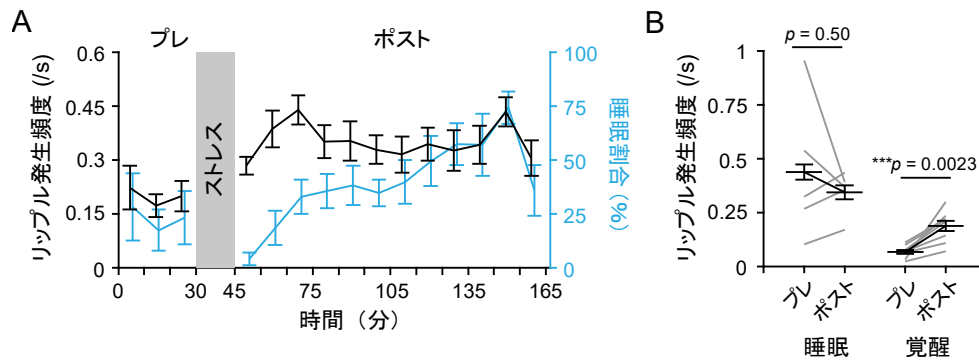


図 6 社会的敗北ストレス負荷によるリップル発生頻度の上昇は睡眠依存ではない

A) リップル発生頻度の変化と睡眠時間割合の変化。黒がリップル発生頻度、青が睡眠時間割合を表す。両者に相関関係はみられなかった。

B) 睡眠覚醒状態におけるリップル発生頻度の変化。覚醒中においてのみリップル発生頻度の有意な上昇がみられた。睡眠:  $p = 0.50$ ,  $n = 5$  mice; 覚醒:  $***p = 0.0023$ ,  $n = 8$  mice, paired  $t$ -test.

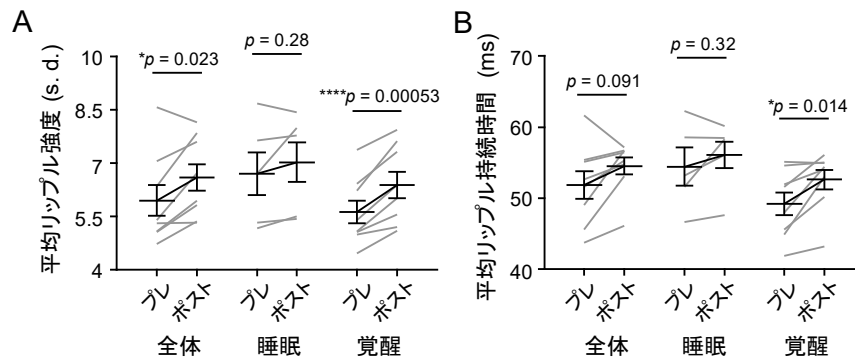


図 7 社会的敗北ストレス負荷によるリップルの増強は覚醒中にのみ見られる

A) ストレス負荷前後のリップルの振幅強度の変化。覚醒中においてのみリップル振幅強度の有意な上昇がみられた。全体: \* $p = 0.023$ ,  $n = 8$  mice; 睡眠:  $p = 0.28$ ,  $n = 5$  mice; 覚醒: \*\*\*\* $p = 0.00053$ ,  $n = 8$  mice, paired  $t$ -test.

B) ストレス負荷前後のリップルの持続時間の変化。覚醒中においてのみリップル持続時間の有意な上昇がみられた。全体:  $p = 0.091$ ,  $n = 8$  mice; 睡眠:  $p = 0.32$ ,  $n = 5$  mice, paired  $t$ -test; 覚醒: \* $p = 0.014$ ,  $n = 8$  mice, paired  $t$ -test.

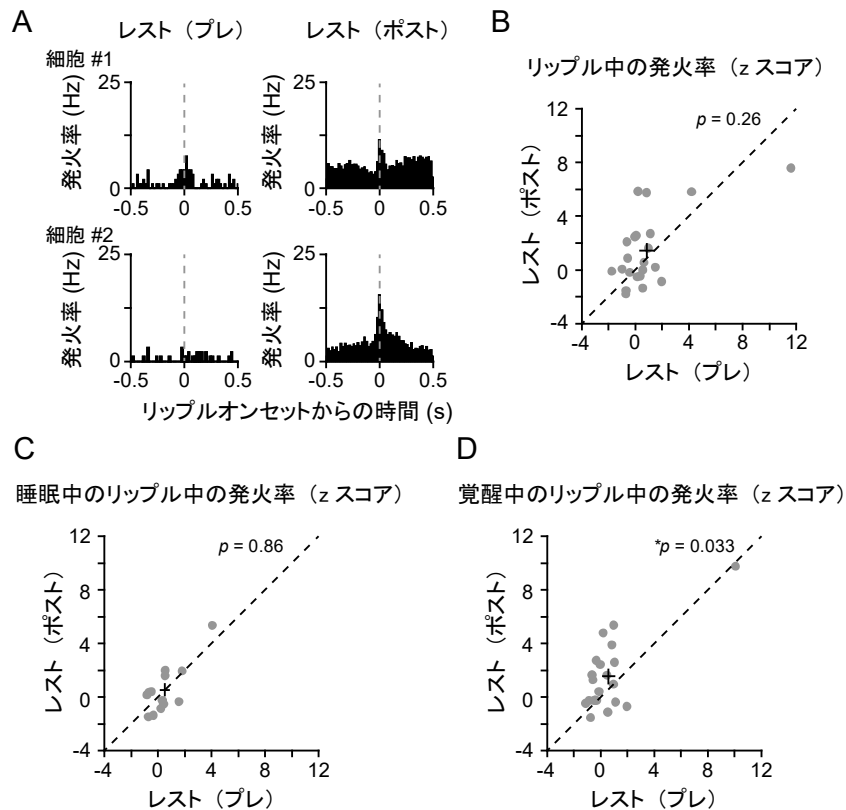


図 8 腹側海馬神経細胞は社会的敗北ストレス負荷により覚醒中のリップルにロックして発火しやすくなる

A) リップルにロックした発火率のヒストグラム of 2 細胞の例。リップルの発生時間を 0 として、その前後における個々の神経細胞の発火タイミングを記録した全リップルに対してヒストグラム化した。左がレスト(プレ)、右がレスト(ポスト)を示す。ストレス負荷によって 0 付近での発火率が上昇している様子がみられた。

B) 記録した全 22 細胞の、レスト(プレ)とレスト(ポスト)での全体のリップルにロックした発火率の比較。プレとポストで有意な変化はみられなかった。 $p = 0.26$ ,  $n = 22$  cells, paired  $t$ -test.

C) 記録した全 13 細胞の、レスト(プレ)とレスト(ポスト)での睡眠中のリップルにロックした発火率の比較。プレとポストで有意な変化はみられなかった。 $p = 0.86$ ,  $n = 13$  cells, paired  $t$ -test.

D) 記録した全 21 細胞の、レスト(プレ)とレスト(ポスト)での覚醒中のリップルにロックした発火率の比較。ポストで有意にリップルにロックした発火を示すようになった。 $*p = 0.033$ ,  $n = 21$  cells, paired  $t$ -test.

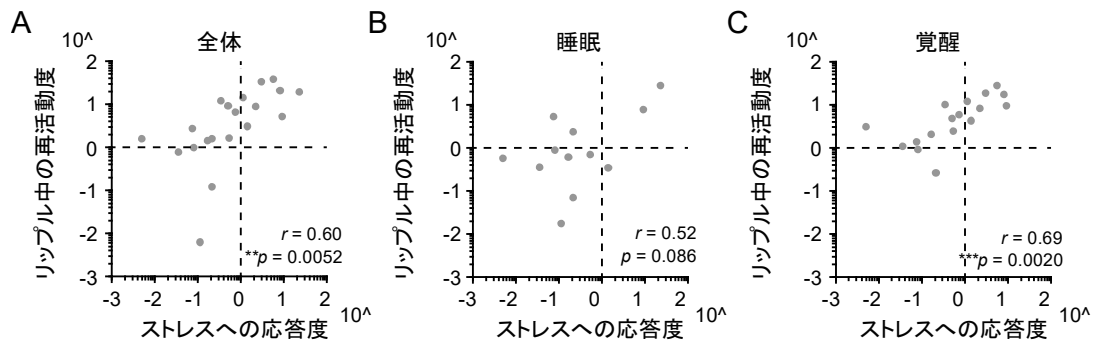


図 9 社会的敗北ストレス負荷時に応答して活動した腹側海馬神経細胞ほど、ストレス負荷後のリップル中に発火しやすくなる

A) 個々の腹側海馬神経細胞のレスト(プレ)時に対する、間接ストレス時の発火率変化と「応答度」、レスト(ポスト)時でのリップル中の発火率変化「再活動度」の相関。レスト全体でみると有意な正の相関がみられた。 $r = 0.60$ ,  $**p = 0.0052$ ,  $n = 22$  cells, Pearson's correlation

B) 個々の腹側海馬神経細胞の「応答度」と睡眠中の「再活動度」の相関。両者に有意な相関関係はみられなかった。 $r = 0.52$ ,  $p = 0.086$ ,  $n = 13$  cells, Pearson's correlation

C) 個々の腹側海馬神経細胞の「応答度」と覚醒中の「再活動度」の相関。両者に有意な正の相関がみられた。 $r = 0.69$ ,  $***p = 0.0020$ ,  $n = 21$  cells, Pearson's correlation.

## 5. 考察

本研究では、マウスの社会的敗北ストレスモデルを用いることにより、社会的ストレスによる嫌悪記憶の固定化には腹側海馬が必要であることを明らかにした。加えて、自由行動下のマウス腹側海馬から電気生理学的記録を行うことによって、ストレス負荷後に腹側海馬でリップルの発生頻度が上昇していることを示し、さらにそれが特に睡眠中ではなく覚醒中に生じていることを見出した。また、個々の神経細胞の活動を解析することによって、ストレスに応答した腹側海馬神経細胞がリップル中に再活動することを示した。以上の結果から、腹側海馬で生じる、リップルにロックした同期発火活動が記憶の固定化に関与することが示唆された。

### 5-1. 社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶の形成

一般に嫌悪記憶を評価する実験系として用いられるものに、恐怖条件付け課題がある。恐怖条件付け課題は連合学習課題の一種であり、それ自体は正あるいは負の情報を持たない **conditioned stimuli (CS)** と、それ自体が情報を持つ **unconditioned stimuli (US)** を組み合わせて提示することで、CS と US の関係性を学習させる、というものである。例えば、ある特定の環境に提示される、あるいは特定の音を聞かされると、その後足元に嫌悪刺激である電気ショックがくる、という具合に用いられる。そして、その後特定の環境や音を再提示された際に恐怖反応を示せば、CS-US の連合学習が成立し嫌悪記憶が形成されている、と解釈できる。本研究で用いた社会的敗北ストレスは、Resident の ICR マウスという個体の情報(=CS)と、攻撃という嫌悪の情動情報(=US)を連合させることによって嫌悪記憶が形成されると考えられる。すなわち、本実

験系においては、嫌悪記憶を形成するためには、他個体の情報と嫌悪の情報をともに保持し、さらにこれら2つの情報を連合させる必要がある。本研究において、腹側海馬を抑制することによって嫌悪記憶の形成が阻害されたが、その理由として考えられるメカニズムは3つある。1つ目は他個体の情報の保持ができなくなったため、2つ目は嫌悪の情報が保持できなくなったため、そして3つ目はこれら2つの情報を連合できなくなったため、である。これら3つの可能性について考察する。

もし1つ目のメカニズムによって嫌悪記憶の形成が阻害されているならば、CSに腹側海馬に依存しない異なる情報、例えば場所を用いた場合には、腹側海馬が必要でなくなり、腹側海馬が嫌悪記憶の固定化に必要である、という主張を否定するものとなる。実際、序論で紹介したように、他個体の情報の保持には腹側海馬 CA1 が関与することが近年の研究から明らかとなっており (Okuyama et al., 2016; Meira et al., 2018; Phillips et al., 2019)、腹側海馬の抑制による嫌悪記憶の消失は、他個体の情報を保持できなくなったためである、という可能性がある。しかしその一方で、特定の環境情報を CS として用いた文脈的恐怖条件付け課題において、環境の情報を保持する背側海馬を抑制した場合だけでなく、環境の情報保持に関与しない腹側海馬を抑制した場合にも嫌悪記憶の形成が阻害されることが知られている (Zhu et al., 2014)。このことから、少なくとも腹側海馬は他個体の情報の保持だけに関与しているのではなく、嫌悪の情報の保持、あるいは2つの情報の連合に関与している可能性がある。

次に、2つ目のメカニズムについて考察する。もし腹側海馬が嫌悪の情報を保持する役割を担うのであれば、腹側海馬が除去されたとき嫌悪記憶が形成されなくなるはずである。しかし、上述の CS-US 連合学習を、音を CS として用いた場合、腹側海



馬を含む海馬全体を除去しても恐怖記憶が成立することが知られている (Phillips and LeDoux, 1992)。このことから、腹側海馬は嫌悪の情報の保持のみに関与しているのではないと考えられる。

以上より、腹側海馬が社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶形成に必要であるメカニズムは、3 つ目のメカニズム、すなわち、他個体の情報と嫌悪の情報の連合であると考えられる。これは、本実験系を用いることによって初めて明らかになったことであり、これによって、本研究における腹側海馬からの神経活動記録の意義がサポートされると考えている。

## 5-2. 腹側海馬のリップル

リップルは、海馬の神経細胞の同期発火によって作られる高周波の脳波だが、リップル発生時に海馬全体が同期活動している、というわけではない。実際、海馬内の各所で局所的に生じるリップルや、広範囲で生じるリップルなど、様々なリップルがある。その中でも、背側海馬内あるいは腹側海馬内のリップルは同期しやすい一方で、背側海馬と腹側海馬のリップルは独立に生じやすいことが知られている (Patel et al., 2013)。さらに近年、背側海馬でリップルが発生したタイミングと腹側海馬でリップルが生じたタイミングで、側坐核の神経細胞の活動に与える影響が異なることが報告された (Sosa et al., 2019)。リップルは海馬内のみで終始する神経活動ではなく、リップルのタイミングで大脳皮質も皮質下領域も含め脳全体で活動に変化が生じることが知られている (Logothetis et al., 2012)。以上の内容から考えるに、背側海馬と腹側海馬では、独立にリップルを生じさせており、それぞれのタイミングで記憶にかかわる情報を海馬から他

の脳領域へと送っている可能性がある。特に腹側海馬は嫌悪記憶の形成に重要な扁桃体との直接投射も有しているため、こうした経路を用いてリップル中に情報が送られ、嫌悪記憶の固定化が行われているのかもしれない。

空間学習課題を用いた研究において、睡眠中に背側海馬で生じるリップルを阻害すると、記憶成績が低下することが示されている (Girardeau et al., 2009; Ego-Stengel and Wilson, 2010)。本実験系においても、腹側海馬特異的なリップル阻害実験を行うことによって、記憶の固定化におけるリップルを伴う腹側海馬神経細胞の同期発火の必要性を検証することができる可能性がある。

また、本研究において、覚醒中特異的にリップルの発生頻度および強度の上昇がみられた。このような現象が生じる理由として 2 つのことが考えられる。1 つは、ストレス負荷直後は興奮状態にあるため睡眠せず、その結果を見ているという可能性である。もう 1 つは睡眠中と覚醒中でリップルの機能が異なるという可能性である。現時点でレストにおける睡眠中と覚醒中のリップルの持つ機能や役割の違いについては何も明らかとなっていない。しかし、上述のようなリップル阻害の実験を睡眠中あるいは覚醒中に分けて行うことで、その詳細を詰められる可能性がある。

### 5-3. 社会的敗北ストレスとうつ病

マウスに繰り返し社会的敗北ストレスを与えることで、うつ様行動が誘発される (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007)。うつ様行動の発現に関与すると考えられている前頭前皮質や扁桃体、側坐核といった脳領域は、みな腹側海馬と投射関係を有している。また、うつ病患者は健常者と比較してネガティブな記憶を思い出しやすいこ

とや、ネガティブな記憶を忘れにくく、逆にポジティブな記憶を思い出しにくいことなど、記憶との関連も示唆されている (Hertel and Gerstle, 2003; Koster et al., 2010; Gaddy and Ingram, 2014)。さらに最近、腹側海馬歯状回の同じ細胞集団がストレス経験時に応答するほど、うつ様行動が惹起されやすくなることが明らかとなった (Zhang et al., 2019)。これらのことを踏まえると、本研究で見出した腹側海馬におけるストレス経験の記憶の再生が、うつ病発症の引き金となっている可能性がある。これも前項と同様、リップル阻害実験と組み合わせることによって、その必要性を検討することが可能になると考えられる。

また、慢性的な社会的敗北ストレスを与えた際に、うつ様行動を示す個体と示さない個体が存在することが報告されている (Golden et al., 2011)。ストレス感受性の高い個体とストレス感受性の低い個体では、報酬系として知られる腹側被蓋野-側坐核経路のドパミンシグナルの活動が異なること (Krishnan et al., 2007) や、腹側海馬から側坐核へのグルタミン酸性投射 (Bagot et al., 2015)、青斑核から腹側被蓋野へのノルアドレナリン性投射 (Isingrini et al., 2016) が変化することが知られている。もし上段のように記憶の再生がうつ病発症の引き金となっているとすれば、こうしたストレス感受性の違いが、記憶の再生の程度によって説明できる可能性がある。すなわち、ストレス感受性の低い個体では、あまり記憶の再生が生じていない可能性がある。この仮説が支持された際には、記憶の再生が上述のような神経活動を変化させるメカニズムを調べることによって、うつ病の発症メカニズムを記憶の観点から明らかにすることができると考えている。

## 6. 総括

本研究では、マウスの社会的敗北ストレスモデルを用いることで、社会的ストレスによって形成される嫌悪記憶を捉える動物モデルを確立した。さらに、本モデルを用いることで、以下の3点を明らかにした。

1. 社会的敗北ストレスによる嫌悪記憶の固定化には、ストレス直後の腹側海馬における神経活動が必要である
2. ストレス負荷によって、覚醒中の腹側海馬におけるリップルの発生頻度が上昇し、またリップルの強度も増加する
3. ストレス負荷に応答して活動した腹側海馬神経細胞ほど、ストレス負荷後のリップルにロックして発火しやすくなる

以上のように、社会的敗北ストレス経験の記憶が腹側海馬において固定化されることを見出した。また、それがストレス経験後の覚醒中にリップルを伴う同期活動によって担われていることが示唆された。本研究は、社会的ストレスによる嫌悪記憶の固定化における腹側海馬の役割を電気生理学的に明らかにした初めての知見であり、今後ストレスに起因した精神疾患の発症メカニズムを解明する一端となることが期待される。

## 7. 参考文献

- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA (2011) Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. *Neuron* 71:898-910.
- Bagot RC, Parise EM, Pena CJ, Zhang HX, Maze I, Chaudhury D, Persaud B, Cachope R, Bolanos-Guzman CA, Cheer JF, Deisseroth K, Han MH, Nestler EJ (2015) Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. *Nat Commun* 6:7062.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864-868.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357-374.
- Brunetti PM, Wimmer RD, Liang L, Siegle JH, Voigts J, Wilson M, Halassa MM (2014) Design and fabrication of ultralight weight, adjustable multi-electrode probes for electrophysiological recordings in mice. *J Vis Exp*:e51675.
- Buzsaki G (2015) Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 25:1073-1188.
- Carr MF, Jadhav SP, Frank LM (2011) Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat Neurosci* 14:147-153.
- Ciocchi S, Passecker J, Malagon-Vina H, Mikus N, Klausberger T (2015) Brain computation. Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons. *Science*

348:560-563.

Dichter GS, Gibbs D, Smoski MJ (2015) A systematic review of relations between resting-state functional-MRI and treatment response in major depressive disorder. *J Affect Disord* 172:8-17.

Drysdale AT, Grosenick L, Downar J, Dunlop K, Mansouri F, Meng Y, Fetcho RN, Zebbley B, Oathes DJ, Etkin A, Schatzberg AF, Sudheimer K, Keller J, Mayberg HS, Gunning FM, Alexopoulos GS, Fox MD, Pascual-Leone A, Voss HU, Casey BJ, Dubin MJ, Liston C (2017) Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. *Nat Med* 23:28-38.

Dupret D, O'Neill J, Pleydell-Bouverie B, Csicsvari J (2010) The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nat Neurosci* 13:995-1002.

Ego-Stengel V, Wilson MA (2010) Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus* 20:1-10.

Eschenko O, Ramadan W, Molle M, Born J, Sara SJ (2008) Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn Mem* 15:222-228.

Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7-19.

Gaddy MA, Ingram RE (2014) A meta-analytic review of mood-congruent implicit memory in depressed mood. *Clin Psychol Rev* 34:402-416.

Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsaki G, Zugaro MB (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci* 12:1222-1223.

Golden SA, Covington HE, 3rd, Berton O, Russo SJ (2011) A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc* 6:1183-1191.

Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*

2:1120-1124.

- Hertel PT, Gerstle M (2003) Depressive deficits in forgetting. *Psychol Sci* 14:573-578.
- Isingrini E, Perret L, Rainer Q, Amilhon B, Guma E, Tanti A, Martin G, Robinson J, Moquin L, Marti F, Mechawar N, Williams S, Gratton A, Giros B (2016) Resilience to chronic stress is mediated by noradrenergic regulation of dopamine neurons. *Nat Neurosci* 19:560-563.
- Jimenez JC, Su K, Goldberg AR, Luna VM, Biane JS, Ordek G, Zhou P, Ong SK, Wright MA, Zweifel L, Paninski L, Hen R, Kheirbek MA (2018) Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron* 97:670-683 e676.
- Koster EH, De Raedt R, Leyman L, De Lissnyder E (2010) Mood-congruent attention and memory bias in dysphoria: Exploring the coherence among information-processing biases. *Behav Res Ther* 48:219-225.
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131:391-404.
- Lee AK, Wilson MA (2002) Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron* 36:1183-1194.
- Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S (2012) Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484:381-385.
- Logothetis NK, Eschenko O, Murayama Y, Augath M, Steudel T, Evrard HC, Besserve M, Oeltermann A (2012) Hippocampal-cortical interaction during periods of subcortical silence. *Nature* 491:547-553.
- Meira T, Leroy F, Buss EW, Oliva A, Park J, Siegelbaum SA (2018) A hippocampal circuit linking

- dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. *Nat Commun* 9:4163.
- Miyamoto D, Hirai D, Fung CC, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, Boehringer R, Adaikkan C, Matsubara C, Matsuki N, Fukai T, McHugh TJ, Yamanaka A, Murayama M (2016) Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory. *Science* 352:1315-1318.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R (2014) Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511:348-352.
- Norimoto H, Makino K, Gao M, Shikano Y, Okamoto K, Ishikawa T, Sasaki T, Hioki H, Fujisawa S, Ikegaya Y (2018) Hippocampal ripples down-regulate synapses. *Science* 359:1524-1527.
- Okuyama T, Kitamura T, Roy DS, Itohara S, Tonegawa S (2016) Ventral CA1 neurons store social memory. *Science* 353:1536-1541.
- Patel J, Schomburg EW, Berenyi A, Fujisawa S, Buzsaki G (2013) Local generation and propagation of ripples along the septotemporal axis of the hippocampus. *J Neurosci* 33:17029-17041.
- Phillips ML, Robinson HA, Pozzo-Miller L (2019) Ventral hippocampal projections to the medial prefrontal cortex regulate social memory. *Elife* 8.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.
- Ramirez S, Liu X, Lin PA, Suh J, Pignatelli M, Redondo RL, Ryan TJ, Tonegawa S (2013)



- Creating a false memory in the hippocampus. *Science* 341:387-391.
- Ramirez S, Liu X, MacDonald CJ, Moffa A, Zhou J, Redondo RL, Tonegawa S (2015) Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. *Nature* 522:335-339.
- Redondo RL, Kim J, Arons AL, Ramirez S, Liu X, Tonegawa S (2014) Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature* 513:426-430.
- Roberson-Nay R, McClure EB, Monk CS, Nelson EE, Guyer AE, Fromm SJ, Charney DS, Leibenluft E, Blair J, Ernst M, Pine DS (2006) Increased amygdala activity during successful memory encoding in adolescent major depressive disorder: An FMRI study. *Biol Psychiatry* 60:966-973.
- Sadowski JH, Jones MW, Mellor JR (2016) Sharp-Wave Ripples Orchestrate the Induction of Synaptic Plasticity during Reactivation of Place Cell Firing Patterns in the Hippocampus. *Cell Rep* 14:1916-1929.
- Sosa M, Joo HR, Frank LM (2019) Dorsal and Ventral Hippocampal Sharp-Wave Ripples Activate Distinct Nucleus Accumbens Networks. *Neuron*.
- van de Ven GM, Trouche S, McNamara CG, Allen K, Dupret D (2016) Hippocampal Offline Reactivation Consolidates Recently Formed Cell Assembly Patterns during Sharp Wave-Ripples. *Neuron* 92:968-974.
- Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265:676-679.
- Zhang TR, Larosa A, Di Raddo M-E, Wong V, Wong AS, Wong TP (2019) Negative Memory Engrams in the Hippocampus Enhance the Susceptibility to Chronic Social Defeat Stress. *J Neurosci* 39:7576-7590
- Zhu H, Pleil KE, Urban DJ, Moy SS, Kash TL, Roth BL (2014) Chemogenetic inactivation of ventral hippocampal glutamatergic neurons disrupts consolidation of contextual fear

memory. *Neuropsychopharmacology* 39:1880-1892.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、いつも親身にご指導・ご鞭撻いただきました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室教授の池谷裕二先生に、心より感謝致します。研究に対する適切な御指摘・御助言を賜るだけでなく、いつも温かい励ましの言葉を掛けて下さり、研究生活を送る上で大きな支えでした。

研究室内でのセミナーをはじめとする議論の場において、研究に対する適切な御指摘・御助言を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室准教授の小山隆太先生に心より感謝致します。研究に対する考え方や熱い想いを学ばせていただきました。

本研究を遂行するにあたり、直接のご指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室助教の佐々木拓哉先生に心より深くお礼申し上げます。研究のアイデア、実験の進め方、データの解析、論文やプレゼンの作成にいたるまで、常に丁寧なサポートをしてくださいました。また、それだけでなく、研究に対する姿勢や日々の研究室での過ごし方など、ありとあらゆる面で叱咤激励をいただき、自分自身のありかたを見直す機会をたくさん与えてくださりました。

研究室内でのセミナーをはじめとする議論の場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科特任准教授の竹内春樹先生、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室助教の中嶋藍先生、松本信圭先生に、

心より感謝致します。

博士課程を同期として共に過ごし、切磋琢磨した東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の井形秀吉君、伊原尚樹君、西村侑也君、星雄高君、渡邊裕亮さんに深くお礼申し上げます。研究生活がより充実したものになったのは皆さんのおかげです。

同じ研究グループとして本研究をあらゆる面からサポートしていただき、多くの助言をいただきました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の鹿野悠博士、鹿山将君、青木勇樹君、岡田桜さん、八木佐一郎君、小此木闘也君、三宅功朔君に心よりお礼申し上げます。

日々の研究活動の中で、どんなときも真剣にディスカッションの相手をしてくださいました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 森川勝太博士、香取和生君に心より感謝申し上げます。お二人とのディスカッションがあればこそ、ここまでくることができたと感じています。

薬品作用学教室での日々の生活を送る中で、絶えず的確な助言とあたたかい支援をいただきました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の先輩、後輩の皆様心より感謝申し上げます。

本研究において、実験に使用した動物たちに謹んで感謝の意を表すとともに、ご冥福をお祈り申し上げます。

学会や学外セミナーなどで出会った研究者の方々、及び私を叱咤激励してくださった全ての人々に感謝申し上げます。

最後になりましたが、博士課程を過ごすうえで日々ただならぬサポートをし続けてくれた家族に謹んで感謝の意を表し、本博士論文の結びとさせていただきます。