

平成20年度海外留学補助金による研究成果報告書

平成22年4月9日

1. 研究題目：ラット対連合学習課題を用いた長期記憶固定化の大脳皮質メカニズムの解明

2. 受給者：エディンバラ大学認知神経システムセンター 竹内倫徳

3. 研修経過内容

[目的]

記憶には様々な種類がありますが、昨日の晩ご飯は何を食べたかというような日常的な出来事の記憶や、勉強などによって得た一般的な知識に関する記憶を「陳述記憶」と呼びます。これまでの研究から、陳述記憶は、まず「短期記憶」として海馬にて獲得・形成され、その後約6週間かけてゆっくりと大脳皮質に転送され、「長期記憶」が形成されると考えられてきました(図1A) (Frankland and Bontempi, 2005)。しかし、現在私が在籍しているモリス教授らのグループによる最近の研究から、関連した「スキーマ」(過去の経験や情報を通じて獲得した知識構造)が既に形成されており、新しい情報がその一部に組み込まれる場合には、短期記憶から長期記憶への情報転送は非常に速く、2日間で起こることがわかつてきました(図1B) (Tse et al., 2007)。これは「迅速な長期記憶の固定化」と呼ばれており、自分にとって馴染みのあるトピックや内容は、馴染みのないものよりもはるかに理解しやすく記憶に残りやすい事を裏付けるものです。

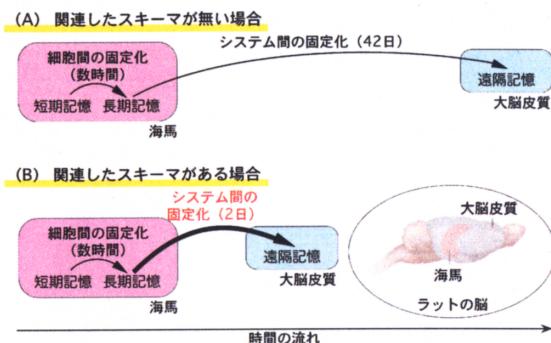


図1 大脳皮質での遠隔記憶形成過程

(A) これまで考えられていた遠隔記憶形成過程

(B) 関連したスキーマが形成されている場合の遠隔記憶形成過程

では、この迅速な長期記憶の固定化の過程に、どの脳領域が関わり、またどのような細胞・分子メカニズムが関与しているのでしょうか？本研究では、「イベントアリーナ装置」(図2A)を用い、異なる味の餌と場所のペアを覚える学習テスト(対連合学習課題)を行わせたラットの脳内イメージングにより、関連したスキーマが存在する場合の新たな対連合記憶の記録に関わる脳領域を同定する事を試みました。具体的には、まず、6種類の味-場所のペアを用いて6週間訓練を行いスキーマを形成させ、その後、2種類の新規の味-場所のペアの1試行の訓練を行いました。続いて、このような課題を行わせたラットの様々な脳領域における、神経活動のマーカーであるzif-268蛋白の発現を免疫組織化学染色により解析しました。

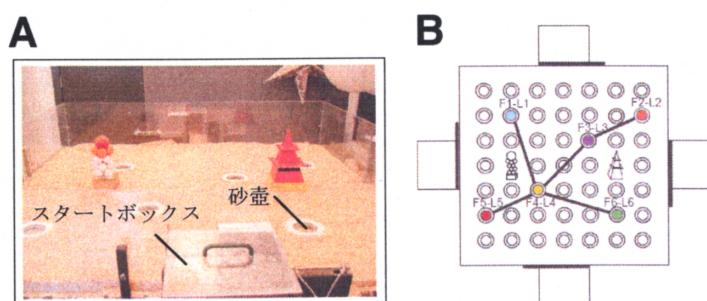


図2 イベントアリーナ装置

(A) 縦1.6m×横1.6mのステージと4つのスタートボックスから構成されています。ステージ上には縦7個×横7個、計49個の穴が存在し、任意の穴に砂壺をセットすることができます。砂壺の底には報酬として特定の味がついた餌をセットします。

(B) 6種類の味(F1-F6)と場所(P1-P6)のペアの空間配置

【結果】

1) 対連合学習課題

-スキーマの学習-

イベントアリーナ装置を用い、ラットにまず6種類の味(F1-F6)と場所(P1-P6)のペア(PA1-P6)を覚えさせました(図2B)。各試行では、まず、4つのうちの1つのスタートボックスで特定の味の餌を手がかり刺激として提示します。スタートボックスのドアが自動的に開き、ラットは、アリーナ内の正しい場所に向かい砂壺を掘ることによって、砂壺の底に埋めてある同じ味の餌を獲得することが出来

ます。このようにして「味」と「場所」の対連合学習を成立させます。6種類の味-場所のペアを1セッションあたり、それぞれ1試行ずつ訓練します。1日1セッションで6週間のトレーニングを続けました(図3A)。各試行中、正しい砂壺にたどり着くまでにおかしたエラー数を評価のパラメーターとしました。訓練を開始した直後では、ラットはほとんど偶然でしか正しい砂壺にたどりつけませんが、トレーニングを続けるうちにエラーの回数は徐々に減少して行きました(図4A)。また、訓練の初期、中期、後期に、プローブテスト(PT1-PT3)を行いました。プローブテストでは、砂壺の下に餌を埋めず、スタートボックスで特定の味の餌の手がかり刺激を提示し、ラットがアリーナに入つてから120秒間、どの程度選択的に正しい砂壺を掘るかを計測します。トレーニング初期に行ったプローブテスト1では、正しい砂壺と間違った砂壺を掘る時間の割合に選択性が見られないのに対し、トレーニングを6週間行った後のプローブテスト3では、正しい砂壺を掘る時間の割合が有意に増加しました(図4B)。これらの結果から、6週間トレーニングを行ったラットは6種類の味-場所のペア(PA1-PA6)を覚え、スキーマが形成されていると考えられます。

-最終トレーニング-

続く最終トレーニングでは、6週間トレーニングを行ったラット(21匹)を3つのグループに分けました(図3B)。第1のNPA(New Paired-Associates)グループ(7匹)には、4種類のオリジナルペア(PA2-PAS5)と2種類の新規ペア(PA7、PA8)の訓練をそれぞれ1試行ずつ行い、関連したスキーマが存在する場合の新規ペアの対連合記憶を形成させました。第2のOPA(Original Paired-Associates)グループ(7匹)には、これまでの6種類のオリジナルペア(PA1-PAS6)の訓練を、第3のNM(New Map)グループ(7匹)では、PA7とPA8を含む6種類の新規ペア(PA7-PAS12)の訓練を行いました。

OPAグループではスキーマの読み出しに関わる脳領域が、NMグループでは、関連したスキーマが存在しない場合の新規ペアの対連合記憶の記録に関わる脳領域がそれぞれ活性化されると想定されます。よってNPA、OPA、NMの3つのグループの課題遂行時のzif-268蛋白の活性化を比較する事で、関連したスキーマが存在する場合の新規ペアの対連合記憶の記録に特異的に関わる脳領域を見つける事ができるはずです(図3B)。

さらにzif-268蛋白発現のベースラインレベルを知る為のコントロールグループとして、ホームケージで飼育されているラット[C-Caged Control]グループ(7匹)を用いました。最終トレーニングの実験スケジュールを図3Cに示しています。zif-268蛋白発現は神経活動誘導後90分後にピークに達し、ピークから120分後にベースラインレベルに戻る事が知られています(Zangenehpour and Chaudhuri, 2002)。このようなzif-268蛋白の発現誘導と減弱のパターンを踏まえ、最終トレーニング5試行目における神経活動を検討するため、4試行目と5試行目の試行間隔を180分とし、5試行目開始から90分後に灌流固定を行い脳サンプルを調整しました。

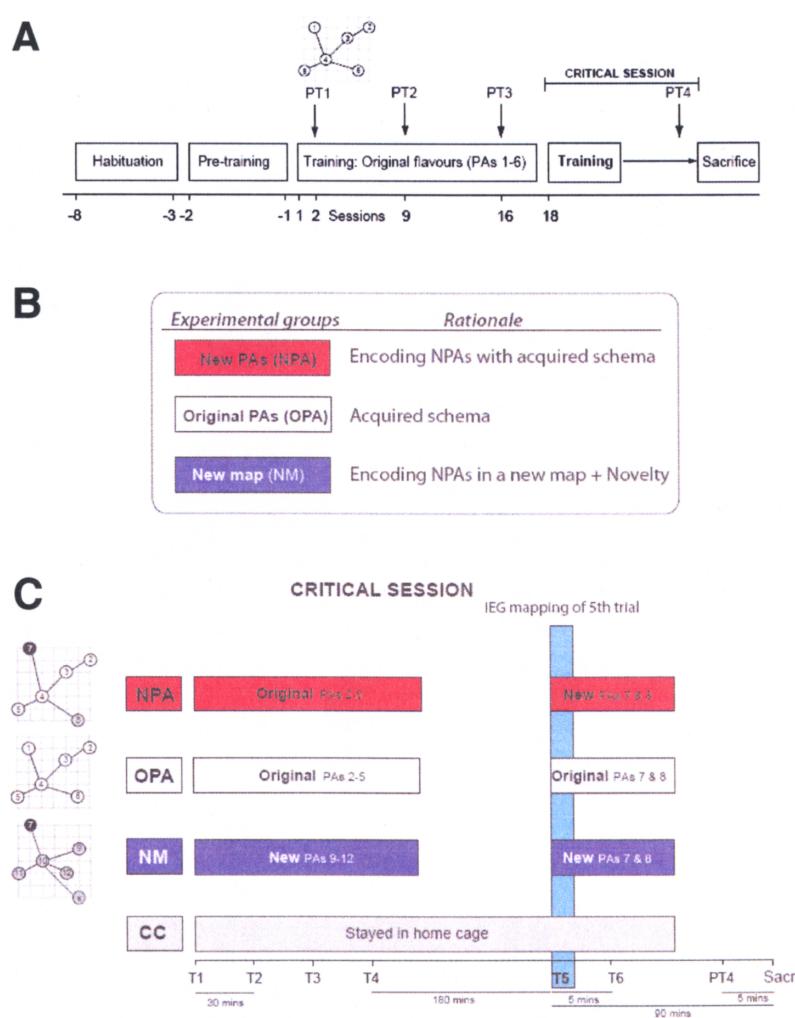


図3 行動実験スケジュール

- 6種類の味-場所ペアのトレーニング
- 最終トレーニングでのグループ分け
- 最終トレーニング

還流固定を行う5分前に行ったプローブテスト4の結果を図4Dに示しています。OPAグループではプローブテスト3の結果と同様、選択的に正しい砂壺を掘る事に時間を費やしました(図4D、左)。NPAグループでは、関連するスキーマが形成されているので、新規ペアの対連合学習は1回の訓練ですみやかに成立し、プローブテストにて、安定した新規ペアの対連合記憶の保持を示しました(図4D、中央)。一方、NMグループでは、6種類の味-場所のペアすべてが入れ替わっている為、迅速な長期記憶の固定化は起こらず、プローブテストにて、新規ペアの対連合記憶は全く保持されていませんでした(図4D、右)。

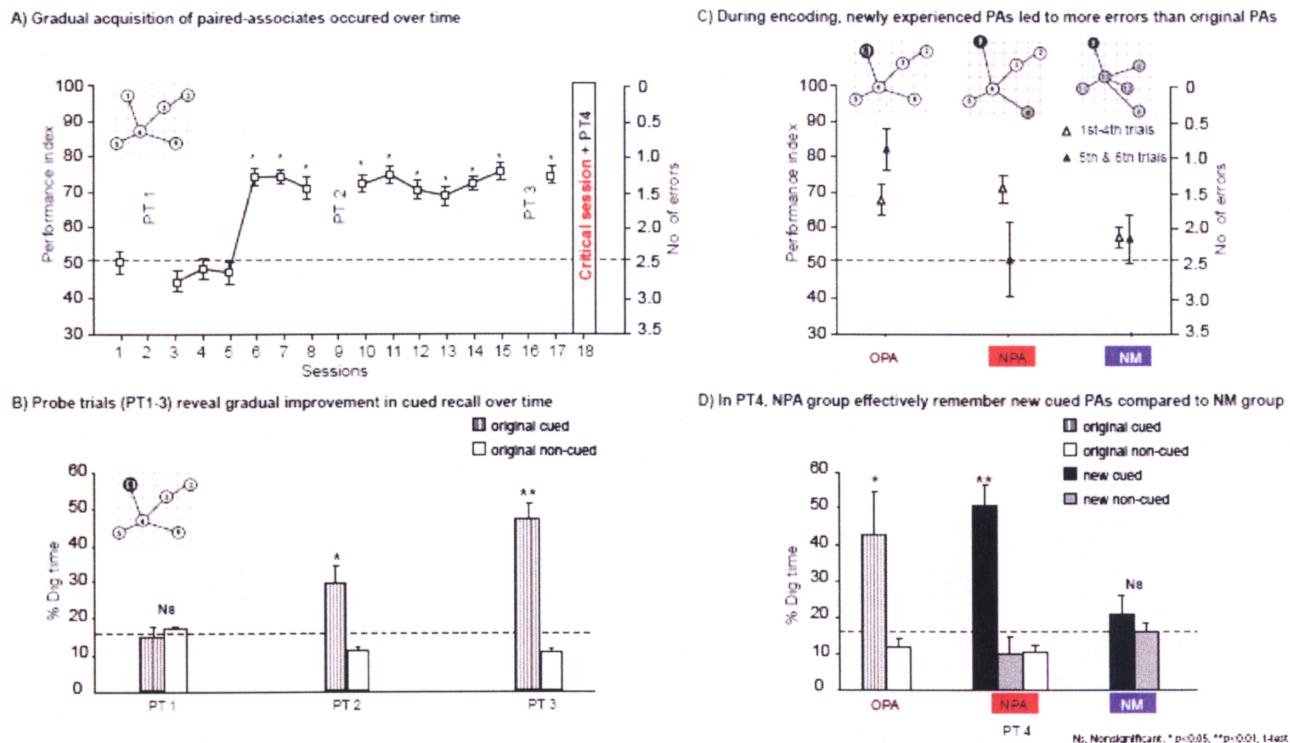


図4 イベントアリーナ装置を用いたラット対連合学習課題

- (A) 6種類の味-場所ペアの獲得
- (B) プローブテスト (PT) 1-3
- (C) 最終トレーニングでのエラー数
- (D) PT 4

2) zif-268免疫組織化学染色による脳内イメージング

灌流固定を行ったラット脳より凍結マイクロトームで $40 \mu\text{m}$ 厚の冠状断面の連続浮遊切片を作成し、市販の抗zif-268抗体(Santa Cruz社)を用いて免疫組織化学染色を行いました。免疫組織化学染色の際、各グループ間の染色条件によるばらつきを最小限にする為、各染色壺に必ず4つのグループの切片が同様の割合で含まれる様に染色を行いました。

抗体染色された細胞数の定量解析を、前辺縁皮質(prelimbic cortex, PrL)、前部帯状回(anterior cingulated cortex, ACC)、海馬CA1野を含む10領域において行いました(図5)。各領域、 $240 \mu\text{m}$ おきの3枚の連続切片の両半球よりCCDカメラ付き光学顕微鏡(10倍対物レンズ)を用いてデジタル画像を直接

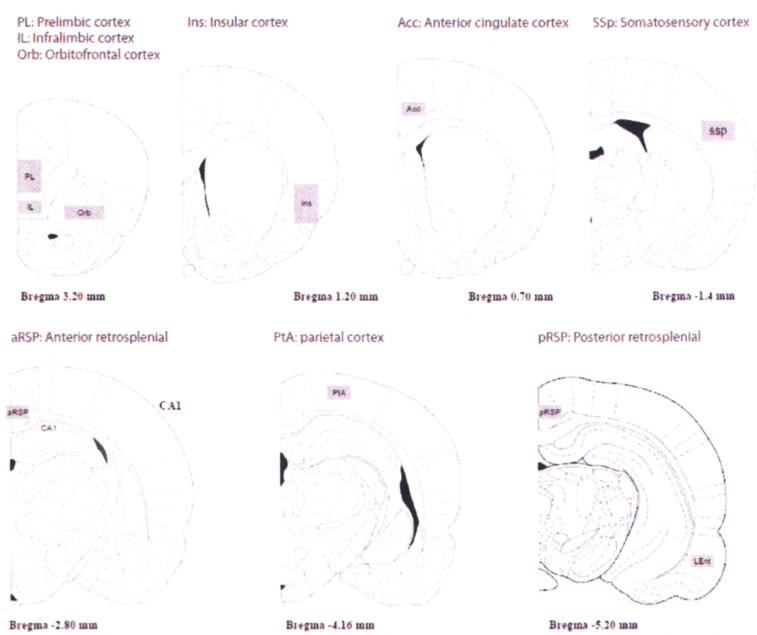


図5 Zif-268陽性細胞数の定量解析を行った脳領域

パソコン用コンピューターに取り込みました。その後、Image-Pro PLUS 6.2 (Media Cybernetics社) を用いて大脳新皮質の場合は第1層から第6層における、また、海馬CA1野の場合は錐体細胞層における単位平方ミリメートル当たりのzif-268陽性細胞数の計測を行いました。zif-268陽性細胞の判定を客観的に行う為、各切片において、大脳新皮質の場合は第1層内の、海馬CA1野の場合は上昇層内の任意の10カ所よりバックグラウンドOD値の計測を行い、数式

$$\text{閾値} = \text{バックグラウンドOD値の平均値} + \text{バックグラウンドOD値の標準偏差} \times 2.75$$

を用いて閾値を決定し、閾値を超えるシグナル強度を有する細胞をzif-268陽性細胞と定義しました。最終的に各染色バッチ間の補正を行うため、各染色バッチのCCグループの平均値を100%として、標準化を行いました。

定量解析の結果、前辺縁皮質におけるNPAグループのzif-268陽性細胞数はOPAとNMグループに比べ有意に高いと言う事を見いだしました(図6、図7)。前部帯状回、前脳梁膨大後部皮質(anterior retrosplenial cortex, aRSC)でも同様の傾向を示しましたが、有意な差はありませんでした。一方、一次感覚野(primary somatosensory cortex, SSP)では、3グループ間でzif-268陽性細胞数に差はみられませんでした。

関連したスキーマが存在する場合の新たな対連合記憶の記録には海馬のNMDA型グルタミン酸受容体依存的な可塑性が必要な事が以前の薬理学的実験より明らかになっています(Bethus et al., 2010)。そこで、海馬CA1野におけるzif-268陽性細胞の定量解析を同様に行いました(図7)。その結果、NPAグループはOPAやNMグループに比べ高い発現傾向を示しましたが、有意な差はありませんでした。zif-268は比較的ベースラインレベルの発現が高い事が知られており、検出感度が不十分だった可能性が考えられます。

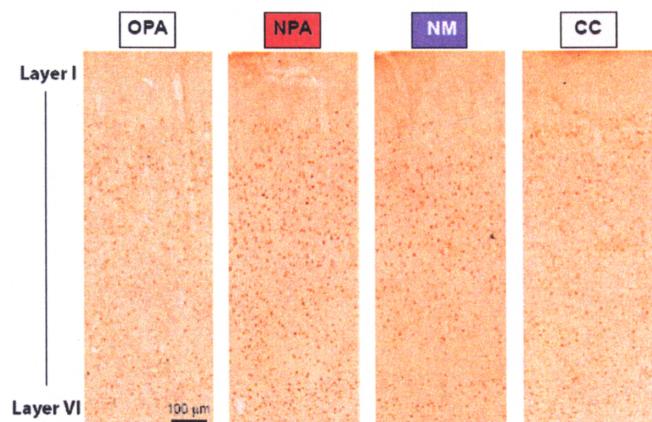


図6 前辺縁皮質での抗Zif-268抗体による免疫組織化学染色

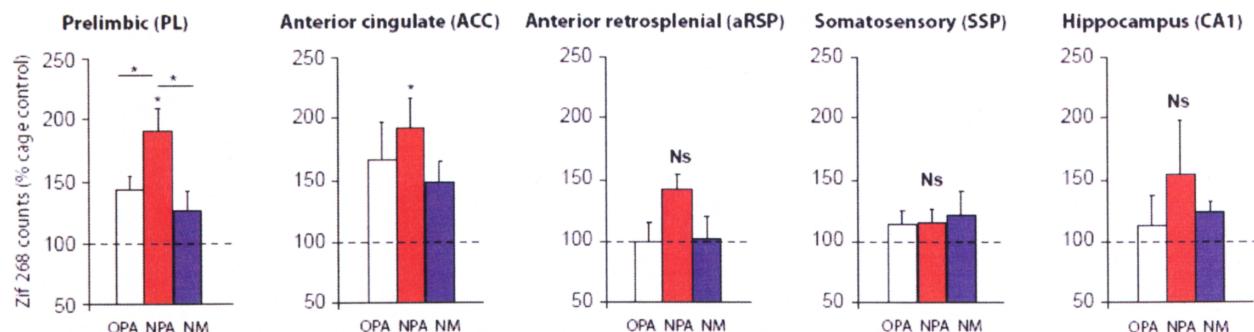


図7 Zif-268陽性細胞数の定量解析

[まとめと今後の方針]

zif-268免疫組織化学染色による脳内イメージングより、前辺縁皮質において、NPAグループではOPAとNMグループと比較してzif-268陽性細胞数が有意に増加している事を見いだしました。この結果は、関連したスキーマが存在する場合の新たな対連合記憶の記録に前辺縁皮質が関わっている事を強く示唆します。私たちの研究グループの最近の行動薬理学的な実験から、スキーマ存在下における新たな対連合記憶の記録には海馬のNMDA型グルタミン酸受容体依存的な可塑性が必須の役割を果たす事が明らかになっています(Bethus et al., 2010)。以上の事から、私たちは、スキーマ存在下における新たな対連合記憶の獲得時に、海馬と前辺縁皮質の2つの脳領域が、平行、あるいは協調的に関与しているのではないか、とのモデルを考えております(図8)。この仮説を検証すべく、前辺縁皮質にシナプス伝達を阻害するAMPA型グルタミン酸受容体阻害剤を脳内投与し、スキーマ存在下における新たな対連合記憶の記録に与える影響を検討しよう

としています。

今回の私たちが見いだした知見は、迅速な長期記憶の固定化の過程を分子あるいは細胞レベルで理解していく第一歩だと言えるでしょう。今後は、今回用いた行動学、解剖学的手法に加えて、薬理学、分子生物学、生理学的手法を総合的に適応することによって、スキーマ形成のメカニズム及び記憶の形成と固定化におけるスキーマの役割、すなわち知識の獲得と固定化のメカニズムを明らかにしていきたいと考えています。また、将来的には、否定的なスキーマにより認知の歪みが生じ、起こると考えられている精神疾患の疾病メカニズム解明の手掛かりとなる可能性があると期待しています。

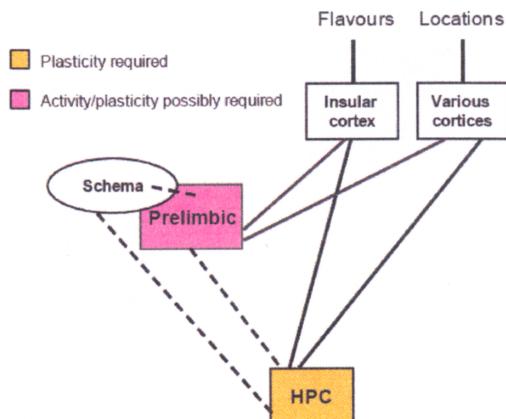


図8 スキーマ存在下での新たな対連合記憶の記録の神経機構モデル

[参考文献]

- Bethus, I., Tse, D., Morris, R.G. (2010) Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *J. Neurosci.* 30:1610-1618.
- Frankland, P.W. and Bontempi, B. (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:119-130.
- Tse, D., Langston, R.F., Kakeyama, M., Bethus, I., Spooner, P.A., Wood, E.R., Witter, M.P., Morris, R.G. (2007) Schemas and memory consolidation. *Science* 316:76-82.
- Zangenehpour, S. and Chaudhuri, A. (2002) Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 109:221-225.