

10. 睡眠中の新旧ニューロンの相互作用によるパターン分離機構の解明

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構 准教授 坂口 昌徳

概要

本研究では、トラウマ記憶の汎化（類似した安全な状況でも恐怖反応が生じる現象）と消去（恐怖反応の低減）に関する神経基盤を解明するため、海馬の特に歯状回を中心とした脳内神経回路の長期活動追跡技術を開発・活用した。具体的には、1光子カルシウムイメージングの複数セッション間で同一ニューロンを認識・追跡可能な解析アルゴリズム CaliAli を開発し、高解像度の小型顕微鏡システムと組み合わせることで、自由行動下マウスで数ヶ月にわたり海馬ニューロン集団の活動が安定した記憶表現が可能であることを明らかにした (Vergara ら, **Nat Comm**, accept in principle)。また、マウスに恐怖条件付けにより強い記憶を形成させ、恐怖反応が異なる文脈にも及ぶ「記憶汎化」の程度や、条件刺激の提示による恐怖記憶の消去効果を評価した。さらに、睡眠中の脳活動がこれら記憶処理過程に与える影響を検証し、僅か数個の歯状回ニューロンのレム睡眠中の活動が記憶固定化に必要であることを同定した (Srinivasan et al., in revision)。これらの取り組みにより、長期に安定したニューロン活動パターンの可視化と、睡眠を含む生理状態がトラウマ記憶の維持・変容に果たす役割を明らかにし、PTSD などの治療法開発に繋がる知見を得た。

背景および目的

PTSD（心的外傷後ストレス障害）では、トラウマとなった恐怖記憶が時間とともに本来無関係な環境や刺激にまで及ぶ「記憶の汎化」が生じ、些細なきっかけで強い恐怖反応を引き起こすことが問題となる。海馬の歯状回は、類似する記憶を識別する「パターン分離」に関与し、新生ニューロン（成人期に形成されるニューロン）がこの機能を担うと考えられている。しかし、歯状回内で新生ニューロンと既存の成熟ニューロンがどのように相互作用して記憶の汎化や分離に寄与しているかは未解明である。また、睡眠は記憶の固定化（想起できる形で保持すること）に不可欠であり、特にレム睡眠は感情記憶の処理や悪夢など PTSD 症状とも関連が示唆されている。一方でノンレム睡眠（徐波睡眠）は記憶痕跡の再活性化を通じて記憶を安定化させるとされる。以上の背景から、本研究では①長期にわたり同一ニューロンの活動を追跡できるイメージング技術を構築し、新生・既存ニューロンを含む神経回路ダイナミクスを観察すること、②歯状回ニューラルネットワークにおける新生ニューロンと旧ニューロンの相互作用を解析し、恐怖記憶の汎化メカニズムを解明すること、③睡眠中の脳活動が記憶固定化に及ぼす影響を検証し、睡眠を利用したトラウマ記憶の制御法（介入法）を開発することを目的とした。

方法

本研究ではマウスを用いて一連の行動実験と神経活動記録を行った。まず、音刺激と電気ショックに時間差を設けたトレース恐怖条件付け法により、単一試行で強固な恐怖記憶を形成させた。記憶の汎化度合いは、本来の恐怖学習文脈とは異なる安全な文脈（環境 B）におけるフリーズ（すくみ）行動の割合で評価した。その後、恐怖記憶の消去学習として条件刺激音（CS）を繰り返し提示するが、提示スケジュールを変えて連続（マスド）提示群と間隔を空けた（スペースド）提示群を設定し、消去効果の違いを比較した。神経活動の記録では、独自開

発したミニスコプ「T-scope V4」(Wang ら, 2024)を頭部に固定し、海馬歯状回のカルシウムイメージングを自由行動下で実施した。取得した蛍光イメージングデータを CaliAli アルゴリズム (Vergara ら, 2025)により解析することで、複数日にわたる記録セッション間で同一のニューロンを同定して活動タイムコースを抽出した。さらに、一部の実験では光遺伝学的手法を併用し、発現させた発光タンパク質(ChrimsonR)を光刺激することで特定ニューロン（例：歯状回の新生ニューロン）をタグ付けし、その応答から個々のニューロンの同定精度を検証した。睡眠と記憶の関係を調べるため、EEG 電極を装着したマウスの脳波から深層学習モデルによってレム睡眠とノンレム睡眠をリアルタイム判別するシステム(Koyanagi ら, 2023)を用いた。恐怖条件付け後の睡眠時に、このシステムと連動して特定の睡眠段階中（レム期またはノンレム期）に対象の神経活動に介入し、翌日の恐怖反応や記憶想起への影響を評価した。

結果および考察

まず、CaliAli アルゴリズムを用いた長期カルシウムイメージングにより、海馬歯状回ニューロンの活動パターンが少なくとも約3か月間（99日）安定して追跡可能であることを示した (Vergara ら, 2025)。本手法により、歯状回におけるニューロン集団の活動は時間経過に伴っても類似したパターンを維持することが分かり、トラウマ記憶の長期保持や想起に関与する神経表現が安定に保たれる可能性が示唆された。さらに、光タグ付け実験により新生ニューロンを含む個々のニューロンを識別した上で長期追跡できることも確認した。次に、恐怖記憶の消去実験では、CS音の間隔を空けた提示（スペースド提示）により、強い恐怖記憶の消去が効率的に進むことを見出した (Kawakami ら, 2024)。連続してCS音を提示した場合に比べ、スペースド提示群では少ない試行回数で恐怖応答が大幅に低減した。この成果は、恐怖記憶の汎化傾向が強い場合でも、適切な間隔を設けた刺激エクスポージャーにより効率的な記憶消去が可能であることを示唆し、PTSDのエクスポージャー療法を改良する手がかりとなる。睡眠解析の結果、レム睡眠中には恐怖記憶に関連する神経活動の再活性化が生じており、記憶汎化に関与する可能性が示唆された。一方、ノンレム睡眠中にCS音を呈示する介入を行うと翌日の恐怖反応が低減し、睡眠時に記憶消去を促進できる可能性も示された。このように、睡眠段階を特定して記憶関連刺激を与える手法は、恐怖記憶の自発的な弱体化を促す可能性があり、新規治療法として注目される。研究期間中には、これら基礎研究の知見を踏まえて PTSD 患者を対象とした臨床研究も開始された (jRCT1030230706; jRCT1032220029)。就寝中にトラウマ記憶と関連付いた音刺激を与えることで悪夢や過剰な記憶固定化を和らげ、覚醒時のトラウマ反応を低減させることを狙った試みであり、安全性と有効性の検証が進められている。以上の成果は、恐怖記憶の維持・汎化・消去メカニズムの理解に大きく貢献するものである。特に、新生ニューロンを含む歯状回路の長期動態解明や睡眠介入による記憶制御の可能性を示した点は、学術的・臨床的にも高いインパクトを持つ。また、これらの研究成果を達成する上で開発した様々な技術を共同研究に応用した（引用文献に記載）。今後、本研究で確立した手法を用いて脳内の記憶痕跡の詳細な追跡と操作を行い、記憶の適応的変容を制御する新たな戦略の創出を目指す。

(完)

発表論文

- 1) Pablo Vergara, Yuteng Wang, Sakthivel Srinivasan, Zhe Dong, Yu Feng, Iyo Koyanagi, Deependra Kumar, Yoan Cherasse, Toshie Naoi, Yuki Sugaya, Takeshi Sakurai, Masanobu Kano, Tristan Shuman, Denise Cai, Masashi Yanagisawa, CaliAli : A Comprehensive Suite for Extracting Neuron Signals Across Multiple Sessions in One-Photon Calcium Imaging, Nature Communications, 2025,
- 2) Wang Y, Vergara P, Hasegawa S, Tomita N, Cherasse Y, Naoi T, Sakurai T, Sugaya Y, Kano M, Sakaguchi M., T-scope V4: miniaturized microscope for optogenetic tagging in freely behaving animals, bioRxiv, 2024Oct11, DOI:10.1101/2024.10.07.616920
- 3) Kawakami C, Naoi T, Sakaguchi M, Spaced conditioned stimulus presentation facilitates the extinction of strong fear memory in mice, BBRC, 718:150071, 2024Jul23, DOI:10.1016/j.bbrc.2024.150071

- 4) Vergara P, Wang Y, Srinivasan S, Cherasse Y, Naoi T, Sugaya Y, Sakurai T, Kano M, Sakaguchi M, CaliAli, a tool for long-term tracking of neuronal population dynamics in calcium imaging, Nat Comm, accept in Principle
- 5) Koyanagi I, Tezuka T, Yu J, Srinivasan S, Naoi T, Yasugaki S, Nakai A, Taniguchi S, Hayashi Y, Nakano Y, Sakaguchi M, Fully automatic REM sleep stage-specific intervention systems using single EEG in mice, Neurosci Res, 186:51-58, 2022Oct4, DOI:10.1016/j.neures.2022.10.001

引用文献

- 1) Kashiwagi M, Beck G, Kanuka M, Arai Y, Tanaka K, Tatsuzawa C, Koga Y, Saito YC, Takagi M, Oishi Y, Sakaguchi M, Baba K, Ikuno M, Yamakado H, Takahashi R, Yanagisawa M, Murayama S, Sakurai T, Sakai K, Nakagawa Y, Hayashi Y, A pontine-medullary loop crucial for REM sleep and its deficit in Parkinson's disease, Cell, in press, 2024Sep19, DOI:10.1016/j.cell.2024.08.046
- 2) Li K, Koukoutselos K, Sakaguchi M, Cioocchi S, Distinct ventral hippocampal inhibitory microcircuits regulating anxiety and fear behaviors, Nat Comm, 15:8228, 2024Sep19, DOI:10.1038/s41467-024-52466-4
- 3) Taniguchi M, Tezuka T, Vergara P, Srinivasan S, Hosokawa T, Cherasse Y, Naoi T, Sakurai T, Sakaguchi M, Open-Source Software for Real-time Calcium Imaging and Synchronized Neuron Firing Detection, IEEE EMBC 2021, 2021Dec9, DOI:10.1109/EMBC46164.2021.9629611
- 4) Yu J, Naoi T and Sakaguchi M, Fear generalization immediately after contextual fear memory consolidation in mice, BBRC 558:102-106, 2021Jun18, DOI:10.1016/j.bbrc.2021.04.072
- 5) Tezuka T, Kumar D, Singh S, Koyanagi I, Naoi T and Sakaguchi M, Real-time, automatic, open-source sleep stage classification system using single EEG for mice, Sci Rep 11:11151, 2021May27, DOI:10.1038/s41598-021-90332-1
- 6) Carrier-Ruiz A, Sugaya Y, Kumar D, Vergara P, Koyanagi I, Srinivasan S, Naoi T, Kano M and Sakaguchi M, Calcium imaging of adult-born neurons in freely moving mice, STAR Protocols 2(1):100328, 2021Mar19, DOI/10.1016/j.xpro.2020.100238
- 7) Vergara P, Kumar D, Srinivasan S, Koyanagi I, Naoi T, Singh S and Sakaguchi M, Remapping of adult-born neuron activity during fear memory consolidation in mice, IJMS 22(6):2874, 2021Mar12, DOI:10.3390/ijms22062874
- 8) Koyanagi I, Sonomura K, Naoi T, Ohnishi T, Kaneko N, Sawamoto K, Sato T and Sakaguchi M, Metabolic fingerprints of fear memory consolidation during sleep, Mol Brain 14:30, 2021Feb10, DOI:10.1186/s13041-021-00733-6
- 9) Vergara P and Sakaguchi M, Mechanisms underlying memory consolidation by adult-born neurons during sleep, Front Cell Neurosci 14(594401):1-7, 2020Nov26, DOI/10.3389/fncel.2020.594401
- 10) Kumar D, Koyanagi I¥, Carrier-Ruiz A¥, Vergara P¥, Srinivasan S¥, Sugaya Y, Kasuya M, Yu T, Vogt KE, Muratani M, Ohnishi T, Singh S, Teixeira CM, Cherasse Y, Naoi T, Wang S, Nondhalee P, Osman BAH, Kaneko N, Sawamoto K, Kernie SG, Sakurai T, McHugh TJ, Kano M, Yanagisawa M and Sakaguchi M, Sparse activity of hippocampal adult-born neurons during REM sleep is necessary for memory consolidation, Neuron 107:552-65, 2020Jun4, DOI:10.1016/j.neuron.2020.05.008, ¥equal contribution, Recommended by Faculty Opinions (DOI:10.3410/f.738073111.793578641), Nat Rev Neurosci (DOI:10.1038/s41583-020-0339-6) Link for accepted manuscript (including supplemental data).
- 11) Srinivasan S¥, Hosokawa T¥, Vergara P, Cherasse Y, Naoi T, Sakurai T and Sakaguchi M, Miniaturized microscope with flexible light source input for neuronal imaging and manipulation in freely behaving animals, BBRC 517:520-4, 2019, DOI:10.1016/j.bbrc.2019.07.082, ¥equal contribution

- 12) Purple R, Sakurai T and Sakaguchi M, Auditory conditioned stimulus presentation during NREM sleep impairs fear memory in mice, Sci Rep 7:46247, 2017, DOI:10.1038/srep46247
- 13) Fujinaka A¥, Li R¥, Hayashi M, Kumar D, Changarathil G, Naito K, Miki K, Nishiyama T, Lazarus M, Sakurai T, Kee N, Nakajima S, Wang SH and Sakaguchi M, Effect of context exposure after fear learning on memory generalization in mice, Mol Brain 9:2, 2016, DOI:10.1186/s13041-015-0184-0, ¥equal contribution, undergraduates at the time, Research award from the president of the university.