

ラットにおける海馬機能およびタンパク質発現に対する 母子分離の影響

渡 邊 隆 之

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻
先進医療開発科学講座精神神経医科学

(指導教官：山脇成人教授)

受付：平成16年12月6日

受理：平成17年1月11日

近年、幼少時期の生育環境が思春期、成熟期の脳の特定部位の海馬における機能的、形態学的変化に影響を与えることが報告されている。本研究では、1) 新生児期に母子分離ストレスを与えたラットにおける恐怖条件付けによるすくみ行動の変化に関する検討、2) 新生児期母子分離ストレスによるラット海馬タンパク質発現の変化に関する検討を行った。6週齢の Sprague-Dawley ラットを用い、行動学的には恐怖条件付け、自発運動量測定、高架式十字迷路を、タンパク質発現については抗体アレイ、ウエスタンブロッティングを用いて検討した。行動学的検討では、母子分離によって自発運動量や不安行動に影響を及ぼすことなく恐怖条件付けによるすくみ行動が減少した。タンパク質発現解析では、母子分離によりラット脳の海馬においてインテグリン $\beta 3$ の発現が減弱することが見出された。本研究の結果から、恐怖条件付けにおけるすくみ行動時間の減少は母子分離による海馬依存性記憶の障害と関係しているものと考えられ、その分子生物学的機序として海馬におけるインテグリン $\beta 3$ の発現の低下が関与している可能性が示唆された。

Key words : Neonatal isolation, Hippocampal-dependent behavior, Protein expression, Integrin $\beta 3$

近年、幼少期の生育環境が生理的、精神的機能の発達に重要な役割を果たしているという研究報告が数多くなされている^{4,12,18)}。例えば、げっ歯類において母子分離のような幼少期の不良な体験は、海馬における LTP¹⁵⁾、不安様行動^{2,9)}、新規環境下での摂食行動の抑制¹⁰⁾、能動的回避学習¹⁷⁾などの生理学的、行動学的な変化を引き起こす。さらに、人間を含む多くの哺乳類での研究において、幼少期の不良な養育環境が海馬における機能的、神経科学的、形態学的変化を引き起こすことが報告されている^{5,15,26,27)}。Hout らは、幼少期のラットにおけるストレスやグルココルチコイドに対する暴露が、成熟期の海馬の萎縮や記憶・学習障害と関連していることを報告している¹³⁾。また、Sapolsky らは、学習や記憶と関係している海馬は、視床下部-下垂体-副腎皮質系の活性化を通しストレスに対する感受性が強いことを報告している^{23,24)}。これらのことから、幼少期の不良な養育環境による高濃

度コルチコステロンへの長期間の暴露は、成熟期における海馬機能を変化させる可能性があると考えられる。しかし、幼少期の不良な養育環境が海馬機能を変化させるメカニズムの詳細はいまだ不明である。

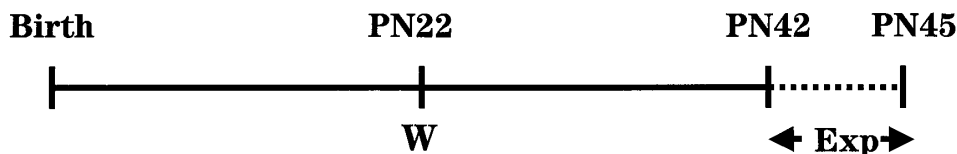
そのため本実験において、母子分離の海馬機能に対する思春期での影響を評価する目的で、思春期ラットにおいて母子分離が恐怖条件付け行動および海馬のタンパク質発現に与える影響について検討した。

方 法

動物

妊娠後期 Sprague-Dawley ラットを日本チャールズリバーから購入した。ラットは個々に飼育し、23±2℃の室温下、60%の湿度、12時間毎の明期と暗期の環境下に置き、餌と水は自由に与えた。1匹の妊娠ラットから産まれた仔ラットの数13匹以上の場合は12匹のみ実験に使用し、11匹以下の場合は実験に

A. Sham-treatment



B. Neonatal Isolation (NI)

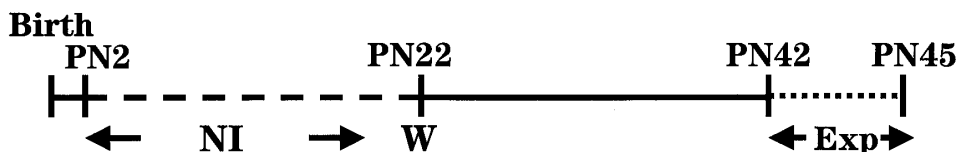


Fig. 1. Animal treatment procedures

(A) Sham-treated rats were left undisturbed. (B) Pups were isolated from the dam, nest, and siblings for a period of one hour per day on post-natal (PN) days 2–22. All litters were weaned on PN days 22 and all behavioral experiments were undertaken on PN days 42–45.

W: weaning, Exp: experiment

使用しなかった。

飼育環境

母子分離ストレスを受けていない母ラットと仔ラットには、離乳以外の処置は行わなかった (Fig. 1A)。母子分離ストレスは Kehoe らの方法に従って行った¹⁵⁾。仔ラットは生後2日から22日目まで1日午前中1時間、母親、同胞の仔ラット、飼育ケージから離し、個々の円筒形容器においた (Fig. 1B)。全ての実験群において母親と12匹の仔ラットは 38×23×20 cm の半透明なプラスチックの飼育ケージの中で離乳時まで飼育した。離乳後 (生後22日目)、雄ラットのみを選んだ。全ての雄ラットは3匹ずつに分け、38×23×20 cm の半透明なプラスチックのケージで飼育した。行動実験は生後42日目から45日目に行った。全ての研究は広島大学大学院医歯薬学総合研究科動物実験指針に基づき行った。

恐怖条件付け

恐怖条件付けは Bourtchuladze らの方法に従って行った³⁾。50×28×32.5 cm のコンディショニングチャンバーは 70×60×60 cm のサウンドブルーボックスの中に設置されている。コンディショニングチャンバーは3方の壁と天井が透明なアクリル製、残り1つの壁がアルミニウム製で、アルミニウム壁にスピーカ

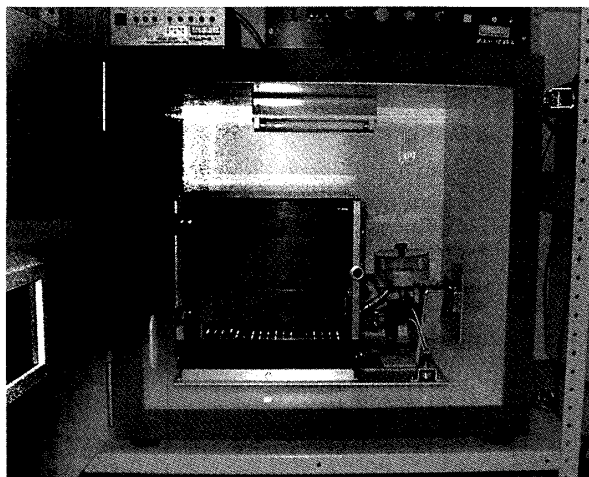


Fig. 2. The picture of apparatus of fear conditioning

ーと 24 V のライトが3個備わっている。チャンバーの床は18本の金属棒からなるショックグリッドになっている。床は取り外し可能で、それぞれのセッション後に70%エタノールと水で洗浄した。直径5 mm の金属棒はハーネスでショックジェネレーター (SGS-003) に接続されている。条件刺激提示のためのソナラート・スピーカーは調整可能な current out put により電源に接続されている (Fig. 2)。行動実験室には1匹のラットのみ搬入され、残りのラットはホームケ

ージに残された。行動実験室へのラットの搬入は、ホームケージと同型の新しいケージを使用した。

文脈的条件付けおよび音による条件付け実験のためにラットをチャンバーに入れ、条件刺激（20秒持続する 2.8 kHz, 120 dB の音刺激）が提示される前の180秒間すくみ行動を観察した（文脈的条件付け）。音による条件刺激後ラットをチャンバー内においたままさらに120秒間すくみ行動を観察し、その後無条件刺激（0.8 mA, 4秒のフットショック）を行った（Fig. 3A）。一連のセッション終了後、ラットをチャンバー内にてさらに30秒間過ごさせた後ホームケージに戻した。条件付け行動はすくみ行動によって評価した：すくみ行動は呼吸に関するものを除いて、骨格筋およびひげ

に動きがないこととして定義した。一連のセッションはビデオにて録画し、すくみ行動時間の総量を計測した。

自発運動量計測

生後42日目に、新規環境下での自発運動量の測定を5分間行った。ラットをそれぞれ 48×48×48 cm の透明なケージに入れ、オートマチック・アクトグラフによって自発運動量を計測した。自発運動量は、ラットの水平方向の運動により近赤外線センサーを横切った回数をパーソナルコンピューターに接続したカウンターインターフェースによってカウントすることにより評価した。

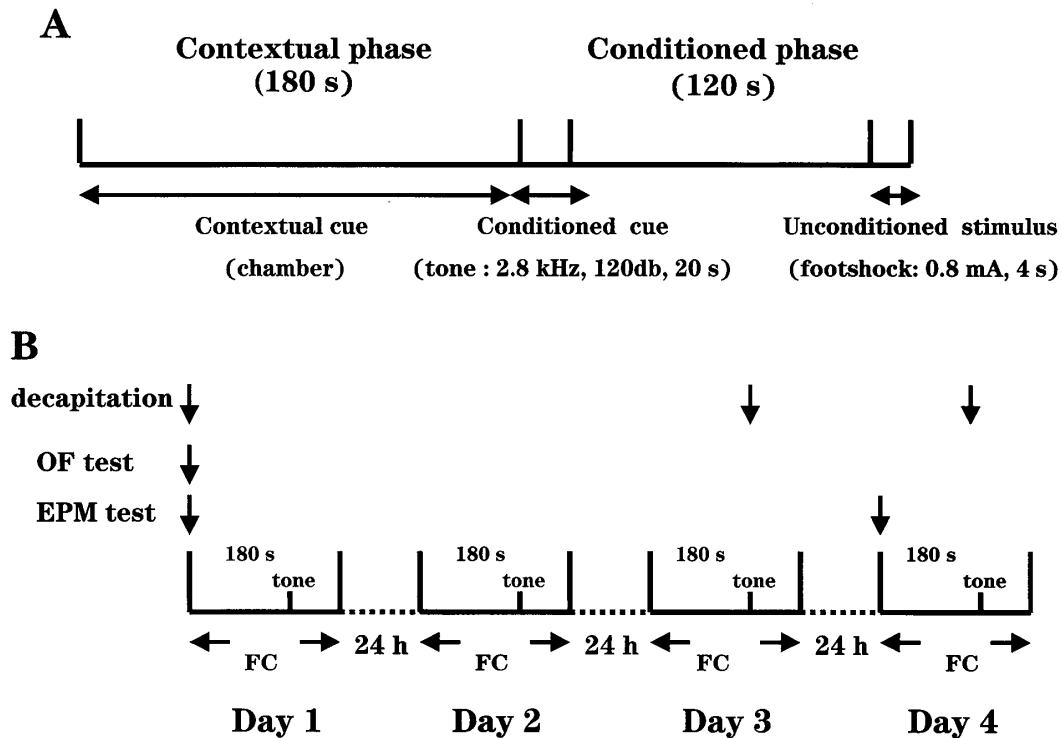


Fig. 3. Behavioral experiments procedures

(A) Fear conditioning paradigm: Rat was placed in a Conditioning box and exposed to a contextual cue (Conditioning chamber) for 180 s. After the exposure to the contextual cue, rat was exposed to a conditioned cue (tone: 2.8 KHz, 120 db, 20 s). After the exposure to the conditioned cue, rat was placed in the chamber for another 120 s, which then received the unconditioned stimuli (footshock: 80 mA, 4 s). Measurement of freezing time was performed 24 h after each conditioning session for 4 consecutive days.

(B) A series of behavioral experiments. Rats were decapitated at the indicated time points (before fear conditioning (FC) (PN 42), immediately after the exposure to conditional context on Day 3 and 4. Open field test (OF) was performed before FC. Elevated plus maze test (EPM) was performed before FC (PN 42) and 24h after the Day 3 session, as indicated.

高架式十字迷路

高架式十字迷路は、互いに直交した2本のオープンアーム (50×10 cm) と2本のクローズドアーム (50×10×38 cm) が地上から73 cmの高さのところに設置してある。実験開始時にラットを迷路の中央にクローズドアームに正対した状態で置き、5分間自由に探索行動をさせた。実験は静かで明るく照明された部屋で行った。1回のセッション終了ごとに、迷路をきれいにした。恐怖条件付け実験実施前と恐怖条件付け実験に3日間暴露した後の2つの時点において実験を行い、オープンアーム滞在時間を測定した (Fig. 3B)。

抗体アレイ

抗体アレイはAndersonらの方法に従って行った¹⁾。非母子分離群/母子分離群それぞれのラットを、恐怖条件付け実験3日目の文脈的刺激暴露直後に断頭し (Fig. 3B)、海馬を取り出し使用時まで-70℃にて保存した。

各群6匹から摘出した海馬をエクストラクション/ラベリングバッファー中にてホモゲナイズし、タンパク定量を行った。除塩カラムを通す前に各群から得た蛋白をCy3 Cy5 dyeにて標識した。サンプルの標準化を目的にスライドを2枚用意し、非母子分離群-Cy5と母子分離群-Cy3をスライド1へ、非母子分離群-Cy3と母子分離群-Cy5をスライド2へそれぞれ10 μgの総タンパク量で加えた。室温で30分間ハイブリダイゼーション後、洗浄してスライドを乾燥させ、GRI 780 スライドスキャナーとイメージン・ソフトウェアでスキャンした。スキャンしたデータは、クロンテック アンド ジェネスプリング ソフトウェアにて解析を行い、スキャッター・プロットとコリレーション・バリューを作成した。スキャナーファイルはイメージン・ソフトウェアを用いて解析を行い、シグナルインテンシティーを作成した。各々のスライドの反復測定値を平均し、マイクロソフト エクセルを用いてインターナル・ノーマライズド・レシオを計算した。

ウエスタンブロットティング

インテグリンβ3のウエスタンブロット解析は、Chanらの方法に従って行った⁷⁾。

すばやく断頭した後 (Fig. 3B) ラット海馬を-70℃にて保管した。海馬を氷冷したホモジネーションバッファー (320 mM スクロース, 5 mM HEPES, pH 7.4) 中でホモジネートした後、1000 g, 4℃, 10分間の条件で遠心し、上清 (S1) とペレット (P1)

に分離した。P1をホモジネーションバッファーにて洗浄し、1000 g, 4℃, 10分間の条件で再度遠心してP1', S1'を得た。S1とS1'を合わせて12500 g, 4℃の条件で30分間遠心した。40 μgのタンパク質をトリスグリシン SDS-PAGE (7.5%) を用いて電気泳動した。

電気泳動後、タンパク質をPVDFメンブレンに転写し、ブロッキングバッファーにて希釈した抗インテグリンβ3抗体の希釈抗体 (1:1000) を一次抗体として4℃で一晩反応させた。メンブレンをTTBSにて洗浄した後、抗マウスIgG抗体 (1:1000) と反応させた。プロットは比色定量法により検出し、シグナル定量はマッキントッシュのアトー・イメージ解析プログラム (version 4.0) により行った。

データ解析

統計学的検討は2群間でマン-ホイットニーのU検定を、4群間で二元配置分散分析を用いて行った。有意水準はp<0.05とした。

結 果

恐怖条件付けに与える母子分離の影響

母子分離群における文脈的刺激暴露時のすくみ行動時間は、非母子分離群に比べ2, 3日目において有意に減少していたが、4日目では有意な差を認めなかった (Table 1)。一方、条件刺激暴露後のすくみ行動時間は、母子分離・非母子分離群間で有意な差を認めなかった (データ未掲載)。

自発運動量計測

自発運動量は、非母子分離群・母子分離群の間において有意な差は認めなかった (Table 2)。

Table 1. Effect of neonatal isolation on fear conditioning

	Contextual freezing time (s)		
	Day 2	Day 3	Day 4
Sham	128.7 ± 4.6	151.0 ± 3.2	147.8 ± 2.2
NI	48.2 ± 17.1 *	93.6 ± 12.9 *	137.2 ± 6.4

Contextual freezing of rats subjected to NI was significantly lower than those of rats with sham treatment on day 2 and 3. However, no differences in freezing time were found on day 4. Data were collected from 12 rats per group, and expressed as means ± SEMs. *p<0.05, compared to sham (Mann-Whitney U test)

NI: neonatal isolation

Table 2. Locomotor activity in open field test

Locomotor activity (counts / 5 min)	
Sham	1980 ± 231
NI	1555 ± 336

The levels of locomotor activity in rats between sham treatment and rats subjected to NI. Data were collected from 6 rats per group, and expressed as means ± SEMs.

NI: neonatal isolation

Table 3. Time spent in open arm in Elevated Plus Maze

	Before FC (open arm time: s)	After 3-day exposure to FC (open arm time: s)
Sham	39.2 ± 13.9	49.0 ± 15.0
NI	29.2 ± 11.7	63.3 ± 17.6

Total time spent in the open arm of the elevated plus maze in rats with sham treatment and NI before FC and after the 3 day-consecutive exposure to FC.

Data were collected from 6 rats per group, and expressed as means ± SEMs.

NI: neonatal isolation, FC: fear conditioning

高架式十字迷路

オープンアーム滞在時間は、非母子分離群・母子分離群の間で有意な差を認めなかった (Table 3)。

ラット海馬におけるタンパク質発現の検索

思春期ラット海馬のストレス因性のタンパク質発現に対する母子分離の影響を調べるために、我々はクロンテック社の抗体アレイを用いた。恐怖条件付けに暴露した非母子分離群と母子分離群間において、タンパク質が非母子分離群において1.2倍以上の発現であったものなから、海馬依存性記憶と関係があることが知られているインテグリンに注目した。

思春期ラット海馬におけるインテグリンβ3の発現に対する母子分離の影響

インテグリンは海馬依存性記憶と関係があることが知られている。そこで、著者は抗体アレイの結果からこのタンパク質を選び、さらにウエスタンブロッティングによる解析を行った。

母子分離群において、恐怖条件付け実験3日目での海馬におけるインテグリンβ3の発現は非母子分離群に比べ有意に低下していた (Table 4)。さらに、海馬におけるインテグリンβ3発現に対する恐怖条件付け実験の影響を評価するために、著者は恐怖条件付け実

Table 4. The influence of neonatal isolation on the levels of integrin β3 protein in the hippocampus of adolescent rats with sham treatment and NI

	Before FC (% of sham)	After 3-day exposure to FC (% of sham)	After 4-day exposure to FC (% of sham)
Sham	100.0 ± 2.9	100.2 ± 4.2	100.0 ± 3.3
NI	83.5 ± 5.1 *	81.4 ± 5.1 *	88.0 ± 2.7 *

Western blot analysis of integrin β3 expression in the hippocampus between rats with sham treatment and rats subjected to NI before FC and after the 3 and 4 day-consecutive exposure to FC. Integrin β3 expression in rats with NI were significantly lower than those in sham-treated rats. Data were collected from 12 rats per group, and expressed as means ± SEMs. *p<0.05
NI: neonatal isolation, FC: fear conditioning

験暴露前のラット海馬におけるインテグリンβ3の発現を検討した。母子分離群において、海馬におけるインテグリンβ3の発現は非母子分離群に比べ恐怖条件付け実験暴露時と同様有意に低下していた (Table 4)。また、非母子分離群と母子分離群間での海馬依存性記憶の差を認めていない恐怖条件付け実験4日目におけるインテグリンβ3の発現も併せて検討した。母子分離群において海馬におけるインテグリンβ3の発現は3日目同様非母子分離群に比べ有意に低下していた (Table 4)。

考 察

海馬依存性記憶に対する母子分離の影響

今回の実験で、非母子分離群と母子分離群の間において自発運動量や高架式十字迷路でのオープンアーム滞在時間などに有意な差を認めなかったことから、自発運動や不安に影響を与えることなく、母子分離により文脈的刺激暴露時のすくみ行動が減少することが示された。一方、母子分離は音による条件刺激暴露後のすくみ行動には影響を与えなかった。恐怖を引き起こす電気刺激といった重要な出来事が起こっている間の空間的文脈に対する急速な記憶の形成は、海馬の重要な機能の一つであることが知られている^{16,21)}。海馬を傷害されたラットは、対象物の空間配置の変化を見つけないことが出来ないことが報告されている²⁵⁾。他方、音や光などの刺激による条件付けの形成は、本質的に扁桃体の機能を必要とすることが知られている^{16,21)}。海馬ではなく扁桃体のみの傷害では、このタイプの条件付けが障害されることが報告されている²¹⁾。これらのことから、本実験で認められた文脈的刺激暴露時に

おけるすくみ行動時間の減少は、母子分離による海馬依存性記憶の障害と関係しているものと考えられる。Houtらは母子分離により空間記憶が障害されることを報告しており、このことは本実験の結果と同一のものである¹³⁾。

海馬のタンパク質発現に対する母子分離の影響

母子分離による海馬依存性記憶の障害に関する分子生物学的メカニズムを調べるために、著者は恐怖条件付け実験3日目の文脈的刺激暴露直後のラット海馬におけるタンパク質の発現を検討した。抗体アレイおよびウエスタンブロッティングによる検討において、母子分離群でのインテグリン $\beta 3$ の発現が非母子分離群に比べ有意に減少していることが示された。

インテグリンは海馬などの様々な組織に存在する、細胞接着因子受容体ファミリーであり、19の α サブユニットと8の β サブユニットからなる24種類のヘテロダイマーを形成し、細胞外の情報を増殖、分化、生存などのシグナルに解釈して細胞内へと伝える役割を担っていることが知られている¹¹⁾。昨今の研究において、インテグリンは細胞-細胞間の連結を司っており、それによってシナプスの強度と興奮性を変化させることが報告されている^{14,19)}。例えば、インテグリン受容体のメンバーをブロックすることで知られているArg-Gly-Asp (RGD)を含むペプチドを用いて海馬スライスをインキュベートすると、成熟期ラット海馬のCA1領域におけるLTPの減弱が増強することが報告されている²⁸⁾。また、インテグリン $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 8$ 遺伝子の発現を減弱させた遺伝子操作マウスでは、NMDA受容体依存性の海馬LTPの振幅が減弱し、恐怖条件付けに影響をあたえることなく、モリス水迷路での空間記憶が障害されることが報告されている⁷⁾。さらに、ChavisとWestbrookは活動依存性の高頻度グルタミン酸放出の減少とシナプスNMDA受容体のサブユニット切り替えは、インテグリン $\beta 3$ サブユニットに対する抗体によって防がれることを報告している⁸⁾。これらの結果は、中枢神経系興奮性シナプスの協調のとれた成熟に、インテグリンを介した情報伝達が不可欠であるということを示している。これらのことから、インテグリン $\beta 3$ が海馬依存性記憶と関係しているという直接的な証拠はないが、本実験においてみられた海馬におけるインテグリン $\beta 3$ の発現の低下からインテグリン $\beta 3$ ファミリーとして現在のところ確認されている $\alpha 5\beta 3$ や $\alpha 2b\beta 3$ の形成が減少し、インテグリンを介する情報伝達機構が減弱することにより母子分離による海馬依存性記憶の障害を引き起

している可能性が示唆される。

恐怖条件付け実験4日目において非母子分離群・母子分離群間での行動学的な有意差はなくなっているにもかかわらず、インテグリン $\beta 3$ の発現は3日目までと同様非母子分離群に比べ有意に低下したままであった。このような結果から、恐怖条件付けの繰り返しの暴露によって、インテグリン $\beta 3$ ファミリー以外のインテグリン・ダイマーが代償的に増加し海馬依存性記憶を回復させた可能性が考えられる。その一方で、アポリポプロテインEノックアウト・マウスにおいてモリス水迷路の成績が悪くなることや⁶⁾、GAP-43ノックアウト・マウスにおいて恐怖条件付け実験における文脈記憶の減弱を認めることが報告されている²²⁾。これらの知見から、海馬依存性の記憶にはアポリポプロテインEやGAP-43などを介したさまざまな経路が関与していることが示唆され、インテグリン以外の系を介した海馬依存性記憶の回復の可能性も考えられる。本実験で認めた恐怖条件付け実験4日目のすくみ行動の回復は、インテグリン $\beta 3$ ファミリーとは異なる代償的な経路を介したものと推察され、母子分離による機能障害の回復機構にどのような経路が関与しているかに関して今後の検討が必要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、御高閲を賜りました山脇成人教授に深甚なる謝意を捧げます。また、直接懇意なる御指導を賜った森信繁助教授に深謝いたします。更に本研究に当たりご協力、ご援助頂きました精神科実験アシスタントの貞富聖子さんに心より感謝いたします。

参 考 文 献

1. Anderson, K., Potter, A., Baban, D. and Davies, K.E. 2003. Protein expression changes in spinal muscular atrophy revealed with a novel antibody array technology. *Brain* 126: 2052-2064.
2. Boccia, M.L. and Pedersen, C.A. 2001. Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 26: 657-672.
3. Bourchuladze, R., Freguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G. and Silva, A.J. 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79: 59-68.
4. Bremner, J.D. and Vermetten, E. 2001. Stress

- and development: behavioral and biological consequences. *Dev. Psychopathol.* 13 : 473–489.
5. **Bremner, J.D., Vythilingam, M., Vermetten, E., Southwick, S.M., McGlashan, T., Nazeer, A., Khan, S., Vaccarino, L.V., Soufer, R., Garg, P.K., Ng, C.K., Staib, L.H., Duncan, J.S. and Charney, D.S.** 2003. MRI and PET study of deficits in hippocampal structure and function in women with childhood sexual abuse and posttraumatic stress disorder. *Am. J. Psychiatry* 160 : 924–932.
 6. **Champagne, D., Dupuy, J.B., Rochford, J. and Poirier, J.** 2002. Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: analysis of learning strategies in three versions of the task. *Neuroscience* 114 : 641–654.
 7. **Chan, C.S., Weeber, E.J., Kurup, S., Sweatt, J.D. and Davis, R.L.** 2003. Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *J. Neurosci.* 23 : 7107–7116.
 8. **Chavis, P. and Westbrook, G.** 2001. Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411 : 317–321.
 9. **Daniels, W.M., Pietersen, C.Y., Carstens, M.E. and Stein, D.J.** 2004. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab. Brain Dis.* 19 : 3–14.
 10. **Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M. and Meaney, M.J.** 2002. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J. Neurosci.* 22 : 7840–7843.
 11. **Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E.** 1999. Integrin signaling. *Science* 285 : 1028–1032.
 12. **Gilmer, W.S. and McKinney, W.T.** 2003. Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies. *J. Affect. Disord.* 75 : 97–113.
 13. **Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H. and McNamara, R.K.** 2002. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.* 950 : 52–63.
 14. **Jones, L.S.** 1996. Integrins: possible functions in the adult CNS. *Trends Neurosci.* 19 : 68–72.
 15. **Kehoe, P. and Bronzino, J.D.** 1999. Neonatal stress alters LTP in freely moving male and female adult rats. *Hippocampus* 9 : 651–658.
 16. **Kim, J.J. and Fanselow, M.S.** 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256 : 675–677.
 17. **Lehmann, J., Pryce, C.R., Bettschen, D. and Feldon, J.** 1999. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64 : 705–715.
 18. **Meaney, M.J.** 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu. Rev. Neurosci.* 24 : 1161–1192.
 19. **Murase, S. and Schuman, E.M.** 1999. The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol.* 11 : 549–553.
 20. **Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O. and Eriksson, P.S.** 1999. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* 39 : 569–578.
 21. **Phillips, R.G. and LeDoux, J.E.** 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106 : 274–285.
 22. **Rekart, J.L., Meiri, K. and Routtenberg, A.** 2004. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus.*
 23. **Sapolsky, R.M.** 1996. Why stress is bad for your brain. *Science* 273 : 749–750.
 24. **Sapolsky, R.M.** 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 57 : 925–935.
 25. **Save, E., Poucet, B., Foreman, N. and Buhot, M.C.** 1992. Object exploration and reactions to spatial and nonspatial changes in hooded rats following damage to parietal cortex or hippocampal formation. *Behav. Neurosci.* 106 : 447–456.
 26. **Stein, M.B., Koverola, C., Hanna, C., Torchia, M.G. and McClarty, B.** 1997. Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. *Psychol. Med.* 27 : 951–959.
 27. **Vythilingam, M., Heim, C., Newport, J.,**

Miller, A.H., Anderson, E., Bronen, R., Brummer, M., Staib, L., Vermetten, E., Charney, D.S., Nemeroff, C.B. and Bremner, J.D. 2002. Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major

depression. *Am. J. Psychiatry* 159 : 2072–2080.

28. **Xiao, P., Bahr, B.A., Staubli, U., Vanderklisch, P.W. and Lynch, G.** 1991. Evidence that matrix recognition contributes to stabilization but not induction of LTP. *Neuroreport* 2 : 461–464.

Influence of Neonatal Isolation on Hippocampal-Dependent Function and Protein Expression in Rats

Takayuki WATANABE

Department of Psychiatry and Neurosciences, Division of Frontier Medical Science,
Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University
(Director: Prof. Shigeto YAMAWAKI)

Recent studies demonstrated that early adverse experiences induce long-lasting functional and neurochemical alternation in the brain. The aim of this study was to identify the influence of neonatal isolation (NI) on hippocampal function and protein expression. We examined the influence of NI on fear conditioning (FC) with other behavioral assessments (open field test and elevated plus maze) in adolescent rats. Rats subjected to NI showed the significant decreases in contextual freezing compared with sham-treated rats on day 2 and 3, but not on day 4. There were no significant differences in locomotor activity and anxiety between rats with sham treatment and NI. Next, I examined the influence of NI on hippocampal protein expression. As compared with sham-treated rats, the levels of integrin $\beta 3$ were significantly reduced in the rats subjected to NI before FC and after 3 and 4-day exposure to FC. These findings suggest that the decrease in hippocampal integrin $\beta 3$ levels may, at least in part, play a role in the impairment of hippocampal-dependent memory. In addition, dissociation between contextual freezing and integrin $\beta 3$ on day 4 implied that the recovery of the impairment of hippocampal-dependent memory induced by NI may be modulated by other mechanisms.