

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25119004

研究課題名(和文) 記憶による時間創成メカニズムの探索

研究課題名(英文) Search for neural mechanisms by which memories create time

研究代表者

池谷 裕二(Ikegaya, Yuji)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：10302613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 65,900,000円

研究成果の概要(和文)：海馬損傷等で記憶ができない患者は「時間の経過」を認識できない。つまり、記憶は「こころの時間」の源泉である。本研究では主に海馬リプル波における経験時間の圧縮のメカニズムと時間進行の操作を探究し、大きな成果としては次の2つの発見を得た。  
(1) 海馬リプル波に記憶が想起されるとき神経回路の興奮抑制バランスが一過性に興奮側にシフトする。本成果はNature Neuroscience誌に掲載された。  
(2) 海馬リプル波は徐波睡眠中に神経回路の興奮性を下方制御し、記憶情報の精度を高めるとともに、記憶容量を確保する。本成果はScience誌に掲載され、新聞等のメディアでも紹介された。

研究成果の概要(英文)：Patients with learning deficits due to hippocampal damage cannot recognize "passage of time", indicating that memory is the source of "mind of time". In this study, we explored the mechanism of time compression and the operation of time progression mainly in hippocampal ripple waves and obtained the following two main findings.  
(1) When memory engrams are reactivated during the hippocampal ripples, the excitation/inhibition balance of the neural circuit transiently shifts toward excitation. These results were published in Nature Neuroscience.  
(2) Hippocampal ripples down-regulate the excitability of the neural circuit during slow-wave sleep, thereby purifying memory engrams and securing the storage capacity for future memories. These results were published in Science and were also highlighted in a newspaper and other media.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶 時間 海馬

### 1. 研究開始当初の背景

リップル波は脳波の一種で、海馬から発生する。おもに安静時や非レム睡眠に生じることが知られている。近年の研究から、リップル波は「オフライン記憶媒体」であるとみなされている。たとえば、リップル波中には海馬ニューロンの一部が活性化するが、これは直前の行動課題で活動したニューロン群が時間圧縮されて再活性化されたものである (Science 265:676-, 1994)。また、リップル波中は皮質と海馬が一過性に同期し (Nature 491:547-, 2012)。さらに、リップル波を選択的に破壊すると記憶・学習が障害される (Science 336:1454-, 2012)。こうした知見から、リップル波は過去の経験を長期記憶に脳内変換するプロセスと考えられる。しかし、いくつかの重要な疑問が未解決のまま残されている。i) 記憶痕跡の問題：なぜそのニューロンが選択され、その後再び活性化されるのか、どのようにして時間圧縮されるのか。ii) 時間操作の可能性：リップル波を促進または抑圧することで記憶形成における内部時計を操作できるか。

### 2. 研究の目的

上記2点の疑問を踏まえて、マウス海馬のリップル波を解析することを目的とした。Arc-dVenus transgenic マウスに空間課題を課し、記憶関連ニューロンを蛍光タンパク質 Venus で標識する。その後、海馬スライス標本内で標識されたニューロンを同定し、リップル波中の電氣的性質をパッチクランプ法および多ニューロン  $Ca^{2+}$  画像法を用いて解析する。この実験により、なぜそのニューロンが選定され、また然るべきタイミングで発火するのかが解明できる。一方、リップル波の制御についてはマウス外側視床下部 (報酬系の一部) の刺激を通じて行う。条件づけ課題の途中で休息を入れ、休息時のリップル波の頻度とその後の課題成績との相関を指標にすることで、リップル波の頻度を人工的に増減させることで学習速度 (つまり、「こころの時間」の進行速度) を自在に制御できることを示すことを目指した。その結果、大きな成果としては次の2つの発見を得た。

i) 海馬リップル波に記憶が想起されるとき神経回路の興奮抑制バランスがシフトする。

ii) 海馬リップル波は徐波睡眠中に神経回路の興奮性を下方制御し、記憶情報の精度を高めるとともに、記憶容量を確保する。

### 3. 研究の方法

以下の項目に記載する。

### 4. 研究成果

i) リップル発生時の海馬 CA1 ニューロンがどのような活動パターンを示すのかについて明らかにするために、海馬急性切片の CA1 野からリップルを記録し、CA1 ニューロン集団の活動を機能的カルシウムイメージング

法で観察した。ニューロンの発火タイミングとリップル発生タイミングの関係について解析を行ったところ、リップルのピークタイミング付近で発火イベント頻度が高くなっていた。また、リップルに参加するのは一部のニューロン集団で、その組み合わせは多様であった。また、各々のニューロンのリップルへの参加パターンの類似度を算出し、Affinity Propagation アルゴリズムを用いて解析を行ったところ、参加パターンの類似したニューロン集団からなる複数のサブグループが抽出された。以上の結果から、リップル発生時には一部の CA1 ニューロン群が活動し、セルアセンブリ様のダイナミクスを示すことが示唆される。

リップル発生時の神経活動は過去の経験 (記憶獲得) を反映する記憶痕跡であるという仮説を検証するために、Arc-dVenus トランスジェニックマウスを用いた。同マウスは強く活動したニューロンを数時間に限り dVenus (蛍光タンパク質) により識別できる利点がある。このマウスに新奇環境を 30 分間自由探索させた後、海馬急性切片を作製し、リップルを記録した。リップル発生時の各ニューロンの活動を記録するために、近赤外線蛍光プローブである CaSiR-1 を用いて多数のニューロンから高速カルシウムイメージングを行った。リップルに参加する確率は、dVenus 陽性ニューロンのほうが dVenus 陰性ニューロンに比べて高かった。この結果から、直近の過去の空間体験に関わったニューロンはリップル発生時に活動しやすいことがわかる。LTP (長期増強) の維持過程を阻害するペプチド ZIP を処置した標本では、リップルは消失した。リップルへの参加確率と、自発活動率には相関があることから、自発活動率はリップルへの参加率のひとつの指標となる。そこで ZIP 処置後の各ニューロンの自発活動率を算出したが、dVenus 陽性ニューロンと陰性ニューロン間で差は見られなかった。以上の結果より、リップル発生時には記憶に関わったニューロンが優先的に選ばれて活動しており、それにはシナプス可塑性が重要であることが示唆された。

リップル発生時に活動するニューロンが選ばれるメカニズムを明らかにするために、ホールセルパッチクランプ法により海馬 CA1 ニューロンがリップル発生時に受けるシナプス入力を観察した。観察した全てのニューロンで、リップル発生時に一過的な興奮性入力と抑制性入力が見られた。興奮性入力のタイミングは抑制性入力に対して先行する傾向にあったが、そのタイムラグ (タイミングの差) に関してはリップル参加ニューロンと不参加ニューロンで違いはなかった。興奮性入力と抑制性入力の大きさについて解析を行ったところ、リップル参加ニューロンは平均振幅、電荷量について、興奮/抑制比が不参加ニューロンより有意に大きかった。つまり興奮/抑制の比が興奮性に傾くことが

リップル発生時の活動の有無を決定していると考えられた。この仮説を検証するために、ダイナミッククランプ法を用いて、CA1 ニューロンにリップル発生時に観察されるような一過性のコンダクタンスを注入した。様々な興奮/抑制比とタイムラグを組み合わせた49通りの興奮性および抑制性コンダクタンスを注入し、各コンダクタンスに対する発火応答確率を算出した。その結果、タイムラグの大きさに関わらず、興奮/抑制比が大きいコンダクタンスを注入されたニューロンでは、再現よく発火応答がみられた。よって興奮/抑制比が興奮性に傾くことにより、リップル時に活動するニューロンが選ばれることが示唆された。

リップル発生時の入力 of 興奮・抑制比はどのようにして決定されているのだろうか？これを明らかにするために、リップルの大きさと興奮・抑制各入力の大きさの関係を調べた。興奮性入力とリップルの大きさの相関は弱かった。これは、興奮性入力は CA3 野で活動した前シナプス細胞集団とのシナプス結合性を反映しており、そのニューロンの過去の活動履歴に依存しているためと考えられる。一方で、抑制性入力の大きさはリップルの大きさと強い相関があった。つまり抑制性入力はリップルの大きさ、つまり CA3 錐体ニューロンからの入力の全体の大きさを反映していると考えられる。抑制性入力を担うインターニューロンの中で、パルバルブミン陽性インターニューロン（以下 PV ニューロン）に着目した。PV ニューロンの活動とリップルの大きさの関係を調べるために、PV-GFP マウスを用いて急性スライス標本作製し、ホールセルパッチクランプ法により GFP 陽性ニューロンから、リップル中の発火応答を記録した。リップルの大きさが大きいほど、PV ニューロンのスパイク活動数も大きくなり、スパイク数とリップルの大きさは線形の関係にあった。また、PV ニューロンはリップルの大きさと強い相関がある興奮性入力を受けていた。つまり PV ニューロンはリップルの大きさをモニターし、それに応じて周囲の CA1 ニューロンを強力に抑制しており、その抑制から抜け出せるような大きな興奮性入力を受けた一部の CA1 ニューロンのみがリップルに参加することができると考えられる。

本研究により、リップル発生時にはそれまでの経験（記憶）に関わったニューロンが優先的に選ばれて発火することが明らかになった。そしてリップル発生時に選ばれるニューロンにおいては、シナプス入力の興奮・抑制比が興奮性に傾いていることが示された。リップルの大きさに応じた均一な抑制性入力と、個々のニューロンの活動履歴に応じて決まる不均一な興奮性入力により形成されるバランスが、リップル発生時の記憶痕跡の出現を運命づけていることが示唆される

ii) 生体マウスの海馬 CA1 にシリコンプローブを埋め込み、局所場電位を記録した。マウスに新奇環境を探索させ、その前後の徐波睡眠中に発生したリップル波を記録した。頻度及び強度について解析したところ、ともに上昇し、時間とともに元の状態へと戻る傾向にあった。また、この減弱作用は NMDA 受容体阻害薬である MK801 によって阻害されたことから、徐波睡眠時に海馬でシナプス可塑性が生じており、リップルの発生に影響を与えていることがわかった。同様の結果が海馬の単離スライス標本からも確認されたことから、リップルの発生頻度は、海馬内で自発的に生じる可塑性によって調節されていることが明らかになった。

次に、リップルが LTD を誘導する可能性を検証するために in vivo リップルの Inter-event Interval (IEI) で海馬スライス標本のシャプファー側枝を電気刺激し、興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) を記録した。まず、新奇環境探索直後の徐波睡眠中のリップルの IEI で 15 分間シナプスを刺激したところ、fEPSP の頻度、強度ともにベースラインよりも大きく低下し、LTD が誘導された。この変化は NMDA 受容体の拮抗薬である D-AP5 により阻害された。同様の検討を、探索させる前に記録したリップルの IEI を用いて行ったところ、LTD は誘導されなかった。以上の結果から、新奇環境探索により上方調節を受けたリップルの発生タイミングは LTD を誘導するのに十分であることが示唆された。

さらに、リップルが LTD を誘導するかどうかを直接的に検証した。先行研究から、LTD が誘導されるとスパインが退縮することが報告されている。そこで、リップルを発生する状態においてスパインの体積がどのように変化するかを観察した。新奇環境を探索させた Thy1-GFP マウスからスライス標本作成し、リップルを記録しながら CA1 近位樹状突起を撮影した。退縮するスパイン、増大するスパインの両方がそれぞれ存在したが、平均すると有意な退縮が認められた。また、この現象は D-AP5 の適用によって阻害されたことから、この体積の減少にはシナプス抑圧が関与していることが示唆された。

シナプス抑圧が誘導されることにより、海馬の情報処理にどのような利点が生まれるのであろうか。海馬の重要な役割の一つに、リップルによる大脳皮質への情報の転写がある。そこで我々は、LTD が誘導されることによって大脳皮質に送る必要のない不要な神経の発火が優先的に抑制される、すなわち「ノイズ除去」が起こるのではないかと仮説を立てた。それを検証するために、リップル中で発火するニューロン集団に着目した。Arc-dVenus マウスを用いて行動時に活動レベルの高かったニューロンを蛍光タンパク質 dVenus でラベルした (dVenus(+) 群)。

それらと dVenus(-) ニューロンのうち何%がリップル中で発火するか(参加率)を求め、それが時間とともにどう遷移するかを検証した。dVenus(+)群の参加率は0分、40分の間で差が認められなかったのに対し、dVenus(-)群は両タイムポイントの間で有意な低下が確認された。この現象は D-AP5 の適用によりブロックされたことからシナプス可塑性によって誘導されたものであると考えられる。以上の結果から、シナプス抑圧により、行動時に活動しなかったニューロンのリップルへの参加が優先的に抑制されることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計24件)

- Norimoto, H., Makino, K., Gao, M., Shikano, Y., Okamoto, K., Ishikawa, T., Sasaki, T., Hioki, H., Fujisawa, S., Ikegaya, Y. Hippocampal ripples down-regulate synapses. *Science*, 359:1524-1527, 2018. Activation of Hilar Mossy Cells and Dentate Granule Cells During Sharp Wave/Ripples
- Watanabe, Y., Ikegaya, Y. Caffeine increases hippocampal sharp waves in vitro. *Biol. Pharm. Bull.*, 40:1111-1115, 2017. Juvenile Hippocampal CA2 Region Expresses Aggrecan
- Minamisawa, G., Funayama, K., Matsumoto, N., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Flashing lights induce prolonged distortions in visual cortical responses and visual perception. *eNeuro*, 4:e0304-16, 2017.
- Matsumoto, N., Okamoto, K., Takagi, Y., Ikegaya, Y. 3-Hz subthreshold oscillations of CA2 neurons in vivo. *Hippocampus*, 26:1570-1578, 2016.
- Funayama, K., Hagura, N., Ban, H., Ikegaya, Y. Functional organization of flash-induced V1 offline reactivation. *J. Neurosci.*, 36:11727-11738, 2016.
- Iwasaki, S., Sakaguchi, T., Ikegaya, Y. Brief fear preexposure facilitates subsequent fear conditioning. *Neurosci. Res.*, 95:66-73, 2015.
- Hongo, Y., Ogawa, K., Takahara, Y., Takasu, K., Royer, S., Hasegawa, M., Sakaguchi, G., Ikegaya, Y. Topological organization of CA3-to-CA1 excitation. *Eur. J. Neurosci.*, 42:2135-2143, 2015.
- Nakayama, D., Iwata, H., Teshirogi, C., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nomura, H. Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. *J. Neurosci.*, 5:819-830, 2015.
- Nomura, H., Hara, K., Abe, R., Hitora-Imamura, N., Nakayama, R., Sasaki, T., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Memory formation and retrieval of neuronal silencing in the auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 10. Hitora-Imamura, N., Miura, Y., Teshirogi, C., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nomura, H. Prefrontal dopamine regulates fear reinstatement through the downregulation of extinction circuits. *eLife*, 4:e08274, 2015.
- Funayama, K., Minamisawa, G., Matsumoto, N., Ban, H., Chan, A. W., Matsuki, N., Murphy, T. H., Ikegaya, Y. Neocortical rebound depolarization enhances visual perception. *PLOS Biol.*, 13:e1002231, 2015
- Norimoto, H., Ikegaya, Y. Visual cortical prosthesis with a geomagnetic compass restores spatial navigation in blind rats. *Curr. Biol.*, 21:1091-1095, 2015.
- Makino, K., Funayama, K., Ikegaya, Y. Spatial clusters of constitutively active neurons in mouse visual cortex. *Anat. Sci. Int.*, 91:188-195, 2016.
- Takahashi, N., Kobayashi, C., Ishikawa, T., Ikegaya, Y. Subcellular imbalances in synaptic activity. *Cell Rep.*, 14:1348-1354, 2016.
- Ishikawa, D., Matsumoto, N., Sakaguchi, T., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Operant conditioning of synaptic and spiking activity patterns in single hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 34:5044-5053, 2014.
- Onoue, K., Nakayama, D., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nomura, H. Fear extinction requires Arc/Arg3.1 expression in the basolateral amygdala. *Mol. Brain*, 7:30, 2014.
- Abe, R., Sakaguchi, T., Matsumoto, N., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Sound-induced hyperpolarization of hippocampal neurons. *Neuroreport*, 25:1013-1017., 2014.
- Nonaka, A., Toyoda, T., Miura, Y., Hitora-Imamura, N., Naka, M., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nomura, H. Synaptic plasticity associated with a memory engram in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.*, 34:9305-9309, 2014
- Miyawaki, T., Norimoto, H., Ishikawa, T., Watanabe, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Dopamine receptor activation reorganizes neuronal ensembles during hippocampal sharp waves in vitro. *PLOS One*, 9:e104438, 2014.
- Okamoto, K., Ishikawa, T., Abe, R., Ishikawa, D., Kobayashi, C., Mizunuma, M., Norimoto, H., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Ex vivo cultured neuronal networks emit in vivo-like spontaneous activity. *J. Physiol. Sci.*, 64:421-431, 2014.
- Abe, R., Sakaguchi, T., Kitajo, K., Ishikawa, D., Matsumoto, N., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Sound-induced modulation of hippocampal theta oscillations. *Neuroreport*, 25:1368-1374, 2014.
- Nakayama, D., Baraki, Z., Onoue, K., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nomura, H. Frontal

association cortex is engaged in stimulus integration during associative learning. Curr. Biol., 25:117-123, 2015.

23. Nakayama, D., Iwata, H., Teshirogi, C., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nomura, H. Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. J. Neurosci., 5:819-830, 2015.
24. Mizunuma, M., Norimoto, H., Tao, K., Egawa, T., Hanaoka, K., Sakaguchi, T., Hioki, H., Kaneko, T., Yamaguchi, S., Nagano, T., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons. Nat. Neurosci., 17:503-505, 2014.

〔学会発表〕(計9件)

1. 池谷裕二、脳回路活動の構造解析、第38回日本神経科学大会(神戸)、2015年7月28日、記念講演
2. 池谷裕二、共感とトラウマの神経回路メカニズム、第111回日本精神神経学会学術総会(大阪)、2015年6月6日、特別講演9
3. 池谷裕二、脳の限界に挑む、第15回東京大学生命科学シンポジウム(東京)、2015年6月27日、講演6
4. 池谷裕二、脳を拓く、第38回日本神経科学大会(神戸)、2015年7月29日、ランチョンセミナー
5. 池谷裕二、脳の意味論、第4回日本精神科医学会学術大会(沖縄)、2015年10月8日、招待講演
6. 池谷裕二、記憶による時間創成メカニズムの探索、新学術領域研究「予測と意思決定」「こころの時間学」合同公開シンポジウム、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム(東京)、2014年12月13日
7. 宮脇健行、乗本裕明、松木則夫、池谷裕二 ドパミン受容体刺激による海馬 Sharp Wave-Ripple の調節 第134回日本薬学会年会(熊本)2014年3月28日、
8. 石川大介、松本信圭、坂口哲也、松木則夫、池谷裕二 海馬シナプス活動の自己制御 第134回日本薬学会年会(熊本)2014年3月30日
9. Ikegaya, Y. Watching neuronal networks at work. Brain Solution Workshop (Shanghai), 15 September 2

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称：脳観察用カッタおよび観察用カッタの製造法  
特許、05783509

発明者：平田唯史、池谷裕二  
権利者：オリンパス  
種類：特許  
番号：05783509  
取得年月日：2015年7月31日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.yakusaku.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池谷 裕二 (IKEGAYA, Yuji)  
東京大学・大学院薬学系研究科・教授  
研究者番号：10302613

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

野村 洋 (NOMURA, Hiroshi)  
北海道大学・大学院薬学研究院・講師  
研究者番号：10549603

藤澤茂義 (FUJISAWA, Shigeyoshi)  
理化学研究所・脳科学総合研究センター・主任研究員  
研究者番号：20589395

(4) 研究協力者

なし