

令和 4 年 10 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03304

研究課題名（和文）海馬新CA2領域の回路基盤と社会性記憶のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidating neural circuits of new hippocampal CA2 region and mechanisms of social memory

研究代表者

小原 圭吾（KOHARA, Keigo）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60740917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：海馬CA2は長年、微小な領域であると考えられたため解明が遅れていたが、研究代表者らにより最近、海馬CA2がこれまでより約5倍も大きい領域であることが世界に先駆けて証明された。これにより新CA2領域が出現し、新たな研究潮流が生み出されている。本研究課題において新CA2領域の神経細胞が嗅内皮質へ軸索を投射しないことを見出した。また、社会性記憶形成に重要である新CA2領域の神経細胞が外側中隔へ軸索を投射することを見出した。また新CA2神経細胞の多様性を示す実験データを得ることに成功した。さらに新CA2領域の回路基盤の多様性を解析するための反発分離性の遺伝子導入新戦略技術の開発に予備的に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の記憶中枢である海馬領域において、従来の定義を覆して出現した新CA2領域の新潮流をさらに発展させた研究であり、その歴史的、学術的意義は極めて高いといえる。社会性記憶形成を担う新CA2領域の回路基盤の完全解明へ貢献する意義のある研究である。哺乳類脳の神経回路解明は人工知能開発にも大きく貢献しており、社会性を持つ人工知能の将来的な開発にも基盤的に貢献することから、社会的意義は非常に大きい。さらに新CA2領域の回路基盤の多様性を解析するための反発分離性の遺伝子導入新技術の開発に予備的に成功しており、この技術は様々な生命科学分野で利用可能であり、今後世界で広く利用されていく高い潜在能力を備えている。

研究成果の概要（英文）：Hippocampal CA2 region has been remained unclear for a long time because of the incorrect classical definition. Principal investigator in this research project and his collaborators broke the classical definition of CA2 region, and prove that CA2 region was about five times larger than the classical one. New CA2 region appeared and a new stream was created by that research. In this research project, we found that new CA2 excitatory neurons do not send axonal projections to entorhinal cortex. Furthermore, we also found that new CA2 excitatory neurons sent axonal projections to lateral septum. To reveal the diversity of CA2 neural circuits, we created new technologies using transgenic viruses in pilot studies.

研究分野：神経科学

キーワード：海馬 CA2 神経回路 社会性記憶 神経細胞 シナプス

## 1. 研究開始当初の背景

海馬CA2は、1934年にロレンテ・デノによって発見されたが、微小な領域であると考えられたため、解明が遅れていた。申請者は最近、先端複合技術を駆使することにより、海馬CA2がこれまで考えられていたより約5倍も大きい領域(海馬新CA2領域)であることを世界に先駆けて証明した。そして光遺伝学と遺伝子工学を駆使することにより、100年ぶりに主要な新規記憶神経回路(新CA2を介する新規トライシナプス性神経回路)を発見し、新CA2の入力神経回路を解明した(Kohara et al. *Nat. Neurosci* 2014)。この研究により、記憶中枢部位海馬において事実上新たな研究可能領域が誕生し、新しい研究潮流が生み出された。しかしながら海馬新CA2領域の出力神経回路は、依然として部分的にしか解明されていない。さらなる新規の神経回路が潜んでいる可能性が相当ある。一方、後続の研究グループは、テタヌス毒素と領域特異的遺伝子組換えマウスを用いて、海馬新CA2領域がなんらかの形で社会性記憶に重要な役割を持つことを初めて明らかにした(Hitti, *Nature* 2014)。このため、海馬新CA2領域は世界的にも大きく注目されるようになったが、テタヌス毒素を用いた実験では、海馬新CA2領域が社会性記憶の形成に関与しているのか、想起に役割を持っているのか解析不可能であり、社会性記憶の形成および想起メカニズムについては未だ未解明のまま残されている。本研究では、社会性記憶を司る海馬新CA2の神経回路地図を完成させ、また社会性記憶の形成および想起の回路メカニズムを解明することで、我々が社会活動を行う上で必須であり最も身近な社会性記憶の全貌解明へと大きく前進させる。

計画を進めていく上で申請者は、次のような予備的な研究結果を得ている。

- (1) 海馬新CA2領域で特異的にCreリコンビナーゼが発現するノックインマウスを世界に先駆けて作ることに成功した。
- (2) 光遺伝学と遺伝子工学を用いることにより、海馬新CA2領域神経細胞の入力先を解明した。
- (3) 海馬新CA2領域特異的に光遺伝学的オプシン(ChR2)を発現させ、青色光により海馬新CA2の神経活動を高速で制御することに成功した(Kohara et al. *Nat. Neurosci* 2014)。

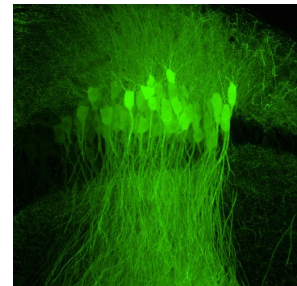


図1 蛍光マーカータンパク質(GFP)を選択的に発現した海馬新 CA2 領域神経細胞

## 2. 研究の目的

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は、まだ全容が解明されていない海馬新CA2領域の出力回路を同定する。社会性記憶の形成、想起における海馬新CA2領域の役割を解明し、社会性記憶の回路メカニズムを解明することで、我々の社会活動の根幹機能である社会性記憶の完全解明への基盤となる研究を行う。

## 3. 研究の方法

ステレオタキシックインジェクターを用いて、麻酔下で、Cre 依存的に蛍光タンパク質マーカーを発現するアデノ随伴ウィルスを、海馬新 CA2 領域特異的 Cre ノックインマウス(MAP3K15-2A-Cre)の海馬新 CA2 領域に注入感染する。

光遺伝学スライスパッチクランプ実験を行い、新 CA2 神経細胞と優先的選択的にシナプス結合する神経細胞種の同定を行う。これにより社会性記憶の基盤となる海馬 新 CA2 領域の出力神経回路の解明を行う。

Cre 依存的に光遺伝学抑制性オプシンである ArchT を発現するアデノ随伴ウイルス、海馬新 CA2 領域特異的 Cre ノックインマウス(MAP3K15-2A-Cre)を用いて光遺伝学行動実験を行い、社会性記憶の形成または想起時における海馬新 CA2 領域神経活動の役割の解明を行う。

新 CA2 領域神経細胞および神経回路の多様性を解析する

#### 4 . 研究成果

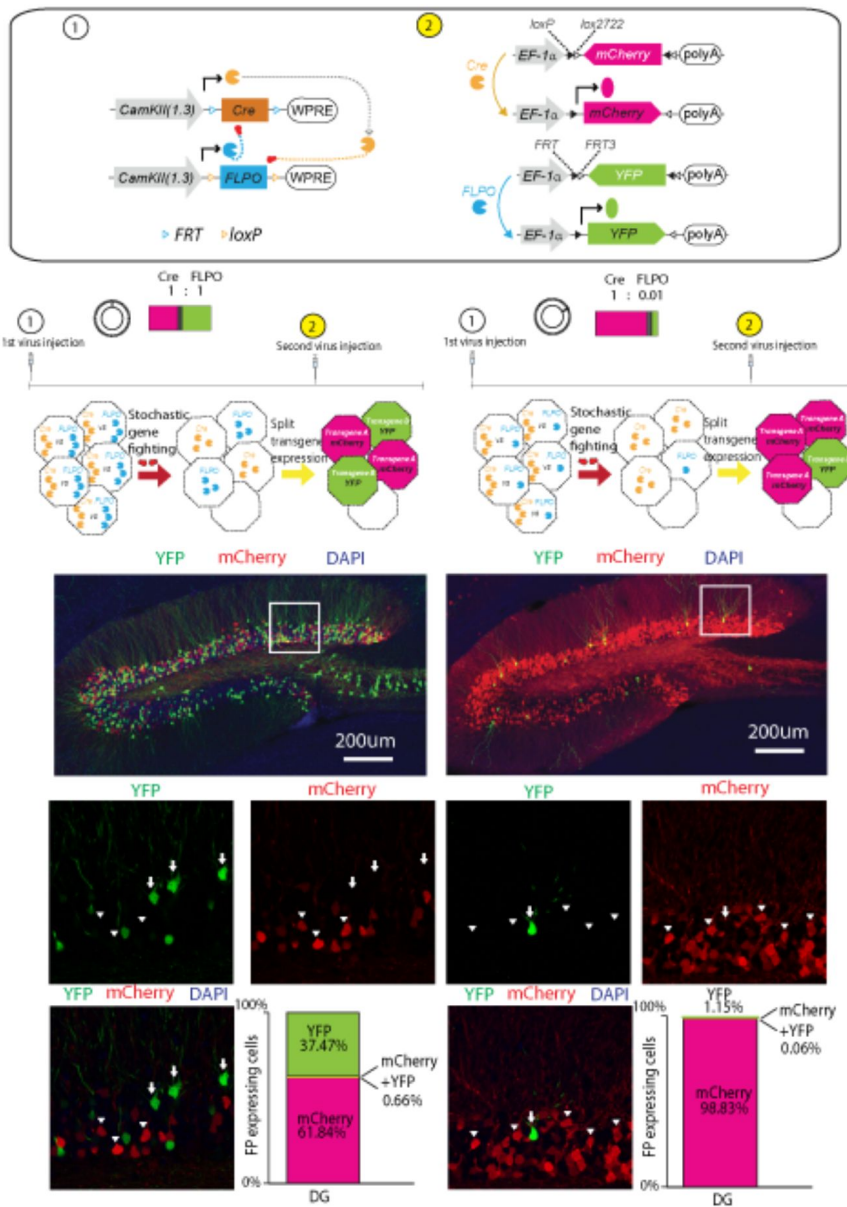
海馬 CA2 は長年、微小な領域であると考えられたため解明が遅れていたが、研究代表者らにより最近、海馬 CA2 がこれまでより約 5 倍も大きい領域であることが世界に先駆けて証明された。これにより新 CA2 領域が出現し、新研究潮流が生み出された。本課題において、新 CA2 領域の興奮性神経細胞が嗅内皮質へ軸索を投射しないことを見出した。また、社会性記憶形成に重要である新 CA2 領域の神経細胞が外側中隔へ軸索を投射することを見出した。また新 CA2 領域神経細胞の多様性を示す実験データを得ることに成功した。

さらに当初は予期していなかったが、偶然に、遺伝子組換え酵素同士が戦い合うことによって、遺伝子発現がスプリットされるという新たな着想を予備的に得ることができ、新 CA2 領域の回路基盤の多様性を解析するための遺伝子組換えウイルスを用いた反発分離性の遺伝子導入新戦略技術の開発に予備的に成功した。そして、この発明技術に関して、2019 年 12 月 27 日に特許出願を行なった。

1. 「遺伝子の戦い」を利用した新たな戦略を用いた遺伝子導入ウイルス技術の開発が原理的に可能かどうかを、レポーター蛍光蛋白質の発現を指標として、海馬歯状回における興奮性細胞を対象にして予備的に検証した。すなわち、Cre と FLPO の前後に、それぞれ 2 つの FRT、2 つの loxP で挟んで配置したレンチウイルスを 1 対 1 の割合で混合して同時に海馬歯状回付近に注入した。そしてその 3 週間後に、同一部位に Cre 依存的 AAV、FLPO 依存的 AAV を混合して注入した。その 1 週間後に遺伝子発現検証した結果、YFP と mCherry という複数の蛍光レポーター蛋白質が、海馬歯状回においてスプリット状に、別々の興奮性神経細胞に発現するという結果を得た。(N=3,n=8)(予備実験図, unpublished)

2. YFP と mCherry という複数の蛍光レポーター蛋白質の導入比率をチューニングして(異なる比率 1:100 で)別々の興奮性神経細胞に導入することに予備的に成功した(N=3,n=8)。

本研究で予備的に開発された反発分離性の遺伝子導入新戦略技術は、予備段階を経て本格的に開発されたのちには、脳神経科学分野だけでなく、様々な生命科学分野で利用可能であり、今後国内外において広く利用されていく極めて高い潜在能力を備えている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

ブレインサイエンス・レビュー2018(クバプロ) P73-P92 (2018) (分担執筆)

小原 圭吾

古典定義の打破と新 CA2 領域の出現、そして新たな海馬地図

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

出願番号: 特願 2019-238481 (出願日 2019年12月27日)

名称「遺伝子の分離発現方法、ポリヌクレオチド、及び遺伝子組換え用キット」

発明者: 小原 圭吾

出願人: 関西医科大学

〔その他〕  
ホームページ等 <http://keigokohara.com>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：武藤 恵

ローマ字氏名：(TAKETO, Megumi)

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：50298189

### (2)研究分担者

研究分担者氏名：松田 博子

ローマ字氏名：(MATSUDA, Hiroko)

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：教授 (現在は退官)

研究者番号(8桁)：10181736

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。