

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02217

研究課題名（和文）海馬における記憶情報の表現メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms underlying information representation in the hippocampus

研究代表者

山口 瞬（Yamaguchi, Shun）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70304087

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）：われわれの作製したArc-dVenusマウスは、活性化神経細胞が蛍光蛋白質で標識されるトランスジェニックマウスである。このマウスを用いて、海馬歯状回顆粒細胞が、さまざまな刺激によって特有のパターンで活性化され、そのパターン形成に遺伝的な要素が大きく寄与していることを見出した。また、自閉症や統合失調症のモデルマウスにおいて、神経細胞の活性化パターンに特有の異常があることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、海馬における情報処理機構の解明や、さまざまな脳・精神疾患の病態解明に向けての重要な足掛かりとなることが予想される。また本研究は、神経科学の分野において独自性の高いものであり、国内外のさまざまな研究に影響を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Arc-dVenus mouse is a transgenic mouse line that expresses fluorescent protein in activated neurons. By using this mouse line, we analyzed the distribution patterns of the hippocampal dentate granule cells activated by various stimuli. We found that the distribution patterns of the activated neurons are stimulus specific and the pattern formation processes are mainly dominated by genetic factors. Moreover, we found that the activation patterns of neurons in the specific cortical areas are dysregulated in the mouse models harboring autism and schizophrenia-associated mutations.

研究分野：神経科学

キーワード：光脳科学 Arc遺伝子 Arc-dVenusマウス 記憶 エングラム

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 記憶・学習が行われる際には、海馬にさまざまな情報が集約されるが、海馬内での情報処理のメカニズム、特にそれぞれの情報が海馬内でどのように表現されているかについては、ほとんど明らかになっていなかった。

(2) さまざまな脳・精神疾患(自閉症や統合失調症、鬱病など)において、海馬や海馬と関係する脳領域の神経細胞の活性化パターンは、正常なパターンと違いがあるのか、また疾患特有の異常があるのか、ほとんど明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 海馬の入力部に相当する歯状回顆粒細胞は、外界のさまざまな刺激(視覚刺激、聴覚刺激、嗅覚刺激、触覚刺激など)によって活性化される。歯状回顆粒細胞が活性化される際には、さまざまな刺激ごとに、たくさんある歯状回顆粒細胞のうちのごく一部の細胞が選択され、異なる細胞の組み合わせで活性化される。この過程は、外界の情報を活性化された神経細胞のパターンで表現するものと考えられている。したがって、さまざまな刺激によって歯状回顆粒細胞がどのようなパターンで活性化されるのかを明らかにすることは、記憶・学習のメカニズムを解明する上で極めて重要である。

本研究では、正常マウスの歯状回顆粒細胞の活性化パターンに法則性を見出すことを目的とした。

(2) 自閉症や統合失調症などの脳・精神疾患において、神経細胞の活性化パターンに疾患特有の異常があるのか、また疾患特有の異常があった場合、それは症状と対応するものなのか、明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) われわれの研究グループは、活性化された神経細胞が蛍光蛋白質で標識される Arc-dVenus マウスの作製に成功している (Eguchi M and Yamaguchi S, Neuroimage 44(4), 1274-1283, 2009)。このマウスは、Arc 遺伝子 (immediate-early gene の一つで記憶・学習や感覚情報処理に際して誘導される遺伝子) のプロモーターの制御下で分解促進型蛍光蛋白質 dVenus が発現するトランスジェニックマウスである。

さらにわれわれは、1 個体における海馬歯状回・活性化顆粒細胞の分布パターンを、完全に捉えることができる解析手法 Candle-Line (Comprehensive three-dimensional mapping analysis of activated neurons in dentate granule cell layer using a genetically engineered reporter mouse line) を開発した。これは Arc-dVenus マウスの海馬を端から端まで 200  $\mu\text{m}$  厚のスライスにし、各スライスを共焦点顕微鏡で 3.3  $\mu\text{m}$  ごとに撮影した後、全ての dVenus 陽性顆粒細胞の 3 次元的位置情報を取得するものである (引用文献)。

本研究では、さまざまな刺激や課題を与えた Arc-dVenus マウスに対して、この Candle-Line 法による解析を行った。

(2) 自閉症や統合失調症のモデルマウスと Arc-dVenus マウスを交配して得られたマウスに対して、Candle-Line 法や FAST 法 (引用文献) による解析を行い、正常マウスと比較した。

### 4. 研究成果

(1) 画像解析ソフトの利用と解析用プログラムの作成により、Candle-Line 法によるデータ解析の効率を高めた。すなわち、画像データ (共焦点顕微鏡写真) から活性化神経細胞の位置情報を短時間で取得できるようにし、その位置情報からすぐに分布図や密度マップを作成できるようにした。

(2) 脳全体の活性化神経細胞の分布を高速で解析することができる FAST 法 (引用文献) の確立に貢献した。

(3) 脳全体の血管網と活性化神経細胞の分布を同時に観察することができる SeeNet 法 (引用文献) の確立に貢献した。

(4) Arc-dVenus マウスを、内側に縦縞模様のある容器に入れる実験を行った。解析個体数を増やし、活性化された歯状回顆粒細胞が、海馬内の特定の領域で密度が高い、特有の分布パターンを示すことを明らかにした。この分布パターンは、異なる個体でも共通して見られ、さらに同一個体の左右の脳でも共通して見られた。ただし左右の脳では活性化顆粒細胞の数に違いが見られた。またこの分布パターンは、ホームケージのマウスや、におい刺激を与えたマウスの活性化顆粒細胞の分布パターンと明確に異なっていた。

したがって、歯状回顆粒細胞は、さまざまな刺激に対して特有のパターンで活性化され、そのパターン形成には遺伝的な要素が大きく寄与していると考えられた。

(5) Arc-dVenus マウスを縦縞模様のある容器に入れる実験において、視覚入力(+)が歯状回顆粒細胞の活性化にどの程度寄与するのか調べた。

具体的には、(A)視覚入力(+)マウス：縦縞模様のある容器に入れた Arc-dVenus マウスと、(B)視覚入力(-)マウス：眼瞼を縫合後、縦縞模様のある容器に入れた Arc-dVenus マウスで、歯状回顆粒細胞の活性化パターンを比較した。

その結果、(A)視覚入力(+)マウスと(B)視覚入力(-)マウスで、活性化顆粒細胞の分布パターンに大きな差は見出されなかった。したがって、マウスを縦縞模様のある容器に入れる実験では、視覚入力そのものが活性化顆粒細胞の分布パターンの主たる決定因子ではないことが考えられた。また、(B)視覚入力(-)マウスでは活性化顆粒細胞の数が有意に多かったが、同マウスで不安様行動が増えていたこととの関係性が考えられた。

(6) Arc-dVenus マウスを縦縞模様のある容器に入れる実験において、ヒゲからの触覚入力(+)が海馬歯状回顆粒細胞の活性化パターンにどのような影響を与えるか調べた。

具体的には、(A)ヒゲ正常マウス：縦縞模様のある容器に入れた Arc-dVenus マウスと、(B)ヒゲ感覚遮断マウス：口の周りの左右のヒゲを根元でカット後、縦縞模様のある容器に入れた Arc-dVenus マウスで、歯状回顆粒細胞の活性化パターンに違いがあるかどうかを調べた。

その結果、(A)と(B)で大きな差は見出されなかった。したがって、本実験の条件では、ヒゲからの入力、歯状回顆粒細胞の活性化に対する寄与は小さいと考えられた。

(7) Arc-dVenus マウスを新奇環境(内面が白い箱)に入れた際に活性化される歯状回顆粒細胞の分布パターンを明らかにした。さらに、その箱の床にオブジェクト(金属製の立方体)を配置した場合と配置しなかった場合で、活性化神経細胞の分布パターンに違いを見出した。

(8) Arc-dVenus マウスに対して、さまざまなタイミングで餌を与え、餌を与えるタイミングと歯状回顆粒細胞の活性化パターンに相関性があることを見出した。

(9) 自閉症や統合失調症と関係の深い 3q29 欠失症候群のモデルマウスで、大脳皮質聴覚野の dVenus 陽性細胞が増加していることを報告した。

(10) 自閉症様行動を示す POGZ (Pogo transposable element derived with ZNF domain) 変異導入マウスで、anterior cingulate cortex の dVenus 陽性細胞が増加していることを報告した。

以上をまとめると以下の通りである。

- ・脳内の活性化神経細胞の分布の3次元解析手法を発展させた。
- ・海馬歯状回顆粒細胞は、さまざまな刺激に対して特有のパターンで活性化され、そのパターン形成には遺伝的な要素が大きく寄与していることを見出した。
- ・自閉症や統合失調症のモデルマウスにおいて、神経細胞の活性化パターンに特有の異常があった。

これらの成果は、海馬における情報処理機構の解明や、さまざまな脳・精神疾患の病態解明に向けての重要な足掛かりとなることが予想される。また本研究は、神経科学の分野において独自性の高いものであり、国内外のさまざまな研究に影響を与えることが期待される。

<引用文献>

山口 瞬、江口 恵、遺伝子工学を用いた活性化神経細胞の可視化、日本神経精神薬理学雑誌、37 巻、2017、147 - 153

Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue K, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H: High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates. *Neuron* 94(6), 1085-1100, 2017

Miyawaki T, Susaki EA, Yamaguchi S, Ueda HR, Ikegaya Y: Visualization and molecular characterization of whole-brain vascular networks with capillary resolution. *Nat Commun* 11, Article number: 1104, 1-11, 2020

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato Yu, Miyawaki Takeyuki, Ouchi Ayako, Noguchi Asako, Yamaguchi Shun, Ikegaya Yuji	4. 巻 94
2. 論文標題 Quick visualization of neurons in brain tissues using an optical clearing technique	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 199 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-018-00473-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 山口 瞬、江口 恵	4. 巻 37
2. 論文標題 遺伝子工学を用いた活性化神経細胞の可視化	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本神経精神薬理学雑誌 (Jpn. J. Neuropsychopharmacol.)	6. 最初と最後の頁 147-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oya Michiko, Suzuki Hiromi, Anas Andrea Roxanne J., Oishi Koichi, Ono Kenji, Yamaguchi Shun, Eguchi Megumi, Sawada Makoto	4. 巻 410
2. 論文標題 LC-MS/MS imaging with thermal film-based laser microdissection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 491 ~ 499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-017-0739-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wu Qi, Ono Kenji, Suzuki Hiromi, Eguchi Megumi, Yamaguchi Shun, Sawada Makoto	4. 巻 666
2. 論文標題 Visualization of Arc promoter-driven neuronal activity by magnetic resonance imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 92 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2017.12.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seiriki Kaoru, Kasai Atsushi, Hashimoto Takeshi, Schulze Wiebke, Niu Misaki, Yamaguchi Shun, Nakazawa Takanobu, Inoue Ken-ichi, Uezono Shiori, Takada Masahiko, Naka Yuichiro, Igarashi Hisato, Tanuma Masato, Waschek James A., Ago Yukio, Tanaka Kenji F., Hayata-Takano Atsuko, Nagayasu Kazuki, Shintani Norihito, et al.	4. 巻 94
2. 論文標題 High-Speed and Scalable Whole-Brain Imaging in Rodents and Primates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1100.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2017.05.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Daisuke, Koppensteiner Peter, Odagiri Saori, Eguchi Megumi, Yamaguchi Shun, Yamada Tetsuya, Katagiri Hideki, Wada Keiji, Sekiguchi Masayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Common Hepatic Branch of Vagus Nerve-Dependent Expression of Immediate Early Genes in the Mouse Brain by Intraportal L-Arginine: Comparison with Cholecystokinin-8	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2017.00366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Baba Masayuki, Yokoyama Kazumasa, Seiriki Kaoru, Naka Yuichiro, Matsumura Kensuke, Kondo Momoka, Yamamoto Kana, Hayashida Misuzu, Kasai Atsushi, Ago Yukio, Nagayasu Kazuki, Hayata-Takano Atsuko, Takahashi Akinori, Yamaguchi Shun, Mori Daisuke, Ozaki Norio, Yamamoto Tadashi, et al.	4. 巻 44
2. 論文標題 Psychiatric-disorder-related behavioral phenotypes and cortical hyperactivity in a mouse model of 3q29 deletion syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 2125 ~ 2135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-019-0441-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyawaki Takeyuki, Morikawa Shota, Susaki Etsuo A., Nakashima Ai, Takeuchi Haruki, Yamaguchi Shun, Ueda Hiroki R., Ikegaya Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Visualization and molecular characterization of whole-brain vascular networks with capillary resolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14786-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura Kensuke, et al. (Yamaguchi Shun 全38名中29番目)	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathogenic POGZ mutation causes impaired cortical development and reversible autism-like phenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14697-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山口 瞬
2. 発表標題 記憶された情報は海馬でどのように表現されているのか -活性化された神経細胞を遺伝子工学で可視化する-
3. 学会等名 第63回「脳の医学・生物学研究会」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺川 洋平、江口 恵、山口 瞬
2. 発表標題 海馬歯状回の活動マップ作成による記憶情報処理機構の解明
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺川 洋平  (Terakawa Youhei)  (10709512)	岐阜大学・大学院医学系研究科・助教    (13701)	