

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16884

研究課題名（和文）記憶の記録と想起を司るラット海馬の神経メカニズム

研究課題名（英文）Neuronal mechanisms of memory encoding and recall in rat hippocampus

研究代表者

中園 智晶（Nakazono, Tomoaki）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10835490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：記憶には記録・保持・想起のステップが存在し、それぞれ関与する神経ネットワークが変化していると考えられる。本研究では、光遺伝学の技術と電気生理学的記録を使用することによって、この記憶の個々のステップに関与する神経ネットワークとその振る舞いを明らかにすることを目指した。光遺伝学を用いた抑制実験においては顕著な行動の変化を見出すことはできなかった。記憶課題遂行中の海馬神経細胞の活動を記録し解析する実験においては記録と想起を切り分ける新規な行動課題を考案しラット3頭に訓練し、電気生理記録を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶、中でも我々の日々の記憶であるエピソード記憶の神経機構の解明はわれわれの「こころ」の物的基盤解明のための大きな手がかりであり、アルツハイマー病などの認知症治療の根幹となる。今回新たに考案した遅延見本合わせ課題は記録のプロセスと想起のプロセスを厳密に切り分けることが可能な課題であり、電気生理記録だけでなく様々な研究手法と組み合わせることで記憶の神経機構を明らかにする手段となりうる。

研究成果の概要（英文）：In this research project attempted to identify the neuronal circuits in the hippocampus that are recruited for different memory processes: encoding and recall. Unfortunately, however, suppression of hippocampal cells by optogenetic stimulation did not result in significant changes in behavioral performance in the memory task. Therefore, I modified a new behavioral task to distinguish between encoding and recall processes, and recorded multi-neuronal activity from hippocampal CA1 when rats performed the memory task.

研究分野：実験心理学

キーワード：海馬 記憶 光遺伝学 オシレーション

## 1. 研究開始当初の背景

経験したことを覚え、そして思い出す「エピソード記憶」は、記憶の中でも我々の日々の生活に最も重要なものと言える。もしもアルツハイマー病などによりエピソード記憶が障害された場合、患者本人の生活の質の低下のみならずその周囲の人々にも困難な状況をもたらしてしまうことはよく知られている。そのため特に今日の高齢化社会においては、エピソード記憶の神経メカニズムの解明は基礎研究のみならず臨床医療の視点からも重要となっている。では我々はどういうようにして日々の出来事を覚え、そして必要に応じて思い出すことができるのだろうか？ 認知症や前向性健忘の症例、ヒト脳機能画像の研究は、エピソード記憶には脳の中でも海馬を含む内側側頭葉が重要な役割を果たしていることを示してきた。さらに神経細胞レベルでのメカニズム研究の手がかりとしては、げっ歯類の海馬で発見された場所細胞が用いられてきた。動物が特定の場所にいるときのみ選択的に発火するという性質を持つ場所細胞は、エピソード記憶の中でも「どこで (where)」の神経表象だと考えられる。さらに局所脳波のシータ波 (6-12Hz) と場所細胞の発火タイミングによって、過去にいた場所・現在いる場所・これから向かう場所、という「いつ (when)」の情報も表象されていることが明らかになった。これは海馬の細胞集団の活動が「いつ・どこで」というエピソード記憶において重要な要素を表象しており、エピソード記憶の神経基盤であることを強く示唆する報告である。海馬の障害による前向性健忘の報告は記憶の固定という「覚える」ことに深く関与していることを示していたが、最近の研究においてはエピソード記憶の重要な要素である「文脈」を思い出す過程にも関与していることも示されている。

しかしながら、「覚える (記録)」「思い出す (想起)」という異なる情報処理において、海馬の神経細胞集団はそれぞれどのように機能しているのだろうか？ 近年のげっ歯類を用いた研究においては、海馬の局所脳波が重要な役割を果たしていると考えられている。海馬においては、シータ波 (6-12Hz) とガンマ波 (30-90Hz) が同時出現している。Colgin らのグループは、まずこのガンマ波にはローガンマ (30-60Hz) とハイガンマ (60-90Hz) の二種類が存在し、それぞれが記憶を思い出すモードと、新しい記憶を作るモードに対応している可能性を示した。この報告によれば、ローガンマが強く出現するシータ波サイクルにおいては、海馬 CA3 CA1 の情報経路が機能し保持した記憶を想起しているとされる。逆にハイガンマが強いシータサイクルにおいては、内側嗅内皮質 (Medial Entorhinal Cortex, MEC) から海馬 CA1 への情報経路が機能し、感覚情報を記憶として覚える (記録) しているモードを作っている (図 1)。さらに Colgin らは海馬場所細胞の発火パターンとこの 2 つのガンマ波の発生を比較し、ハイガンマが優勢であるシータサイクルでは直前に通り過ぎた地点の場所細胞が活動して記憶を作っており、ローガンマが優勢であるシータサイクルではこれから向かう地点の場所細胞が活動して記憶を想起している可能性を示した。

しかしながら、先行研究はあくまで直線迷路を往復しているラットからの記録であり、実際の動物の認知との対応は不明である。この 2 つのガンマの切り替わりによる 2 つのモードは、実際に記憶のモードの切り替えを担っているのだろうか？ また仮に仮説が正しいとした場合、この 2 つのモードはどのように切り替わっているのだろうか？ そのメカニズムについては未だに研究がなされてはいない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 海馬における 2 つのガンマ波が実際に異なる記憶の過程と対応しているのかどうか、認知行動課題実行中の動物から *in vivo* 電気生理記録を行い、さらに光遺伝学的手法による活動抑制実験を行うことにより検証する、(2) 2 つのガンマ波のモードを切り替えるメカニズムとは何なのか明らかにする、の 2 点である。目的 1 についてはすでに提唱されている仮説の検討であるが、この仮説について神経活動のデータと実験心理学に基づいた行動データを比較し解釈することは記憶の神経メカニズムの解明に向けて必要不可欠である。目的 2 については、実験心理学でのワーキングメモリモデルにおいて記憶全体を司るとされる中央実行系が他の記憶モジュールをどのようにコントロールするのか、神経回路レベルで解明しようとする試みと言える。

## 3. 研究の方法

### [実験 1. 電気生理記録による 2 つのガンマ波と記憶過程の対応の検討]

ハイガンマとローガンマは実際の認知においても記憶の記録・想起とそれぞれ対応しているのかどうかを明らかにすることを試みた。そのために記録と想起のそれぞれの期間を明瞭に区別できる認知行動課題をラットに訓練し、課題実行中のラット海馬から神経細胞集団の活動と局所脳波を同時計測し、解析した。この神経活動の記録においては、自由行動下の動物から多数の神経細胞の活動と局所脳波を同時記録する必要があるため、テトロード (四点電極) を用いた多細胞記録法を用いた。

[実験 2. 光遺伝学的手法によるガンマ波の抑制の記憶への影響の検討]

実験 1 で見られた海馬の神経ダイナミクスと実際の記憶過程の間の因果関係を明らかにするため、光遺伝学を用いた抑制実験を行った。ラットの海馬に抑制性の光感受性タンパク質であるハロロドプシンをウイルスベクターにより発現させ、さらに刺激用光ファイバーを埋めこんだ。これによって、ウイルスを発現させた神経細胞を特定の時間でのみ選択的に抑制することが可能となった。行動課題における特定のイベントにのみ光による抑制を行い、その行動への影響を評価した。

4. 研究成果

[実験 1. 電気生理記録による 2 つのガンマ波と記憶過程の対応の検討]

まずラットが行動課題についての新しい知識を獲得してゆくルールスイッチング課題を徐々に学習してゆく過程にラット海馬 CA1 から記録した局所脳波を解析した。この解析については特に、ラット海馬で顕著に見られるシータ波の位相に対するローガンマ/ハイガンマそれぞれの強度を解析した(周波数帯間カップリング)。まずラットがルールに従って行動している条件では、ルールに従わずランダムに行動している際に比べてカップリングの強度が有意に低下していることが示された(図 1)。

さらに学習の過程に着目して解析するとシータ・ハイガンマ間カップリング強度は学習に伴って強くなるが、シータ・ローガンマ間カップリングは逆に学習が進むに連れて減弱していることが明らかになった。これはルールを理解するにつれてラットはハイガンマ波を用いて伝播される感覚情報をより使用するようになり、一方でローガンマ波によって情報処理される報酬情報とその想起は学習に従って使用する必要性が小さくなっていったと解釈でき、これは 2 つのガンマ波がそれぞれ記憶の異なる側面に関与していることを支持するデータである。

しかしながら、この行動パラダイムだけではあくまで感覚情報の処理と想起という 2 つの情報処理の神経メカニズムの違いと解釈するにとどまってしまう、記憶の符号化/想起の明確な切り離しとしては不十分であった。そのため、この欠点を克服すべく新たな行動課題を開発した。

従来用いられてきた音程弁別課題と遅延見本合わせ課題を組み合わせた本課題は試行タイプ

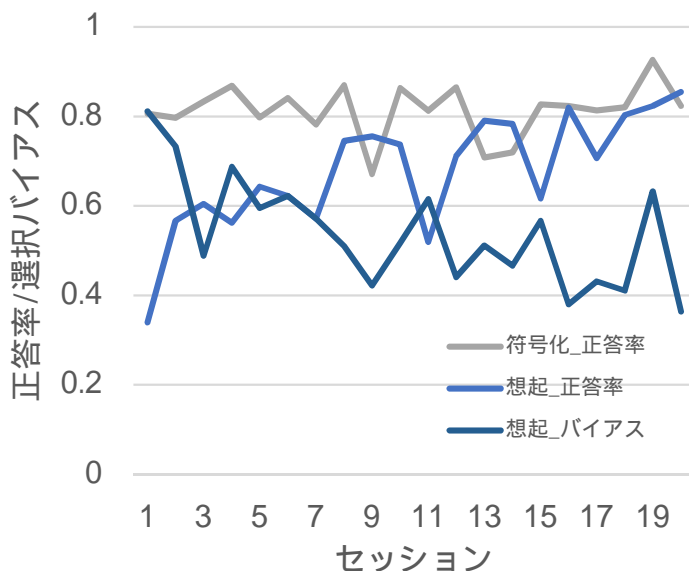


図 2. 符号化/想起課題の学習成績の例

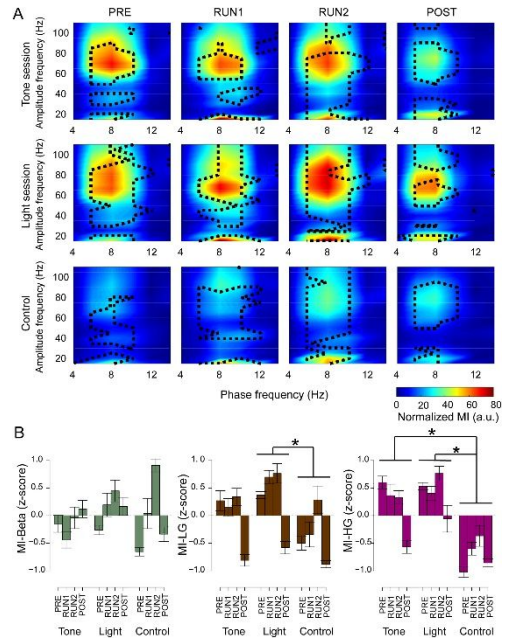


図 1. ルールスイッチングにおける条件ごとカップリング強度

が 2 種類に分かれる。まず一つ目の「符号化試行」では、ラットは 800 ミリ秒間のノーズポーキングの間に提示される高音/低音の音刺激に応じて左右のノーズポークをそれぞれ選択すると報酬が得られた。この符号化試行が正解した場合は続いて 50%の確率で符号化試行/50%の確率で想起試行と分岐する。この想起試行では音刺激が提示されず、直前の符号化試行と同じ反応を行うことで正解となった。すなわち、どちらも 800m 秒ノーズポークを行うという運動や体の位置という条件は統制されていながらも符号化試行では音刺激を左右の行動へと変換し一時的に記憶する符号化が行われているはずであり、一方で想起試行では直前の試行で符号化した情報を想起しているはずである。

この新規な課題をすでに音程弁別を十分に訓練したラット 3

頭にトレーニングしたところ、すべての個体において学習を完了させることができた(図2)。図2にラット一頭の学習過程を例示する。この個体においては想起試行の正答率が21セッションを通じて上昇し、学習基準に達した様子を示している。ラットは左右弁別時に判断に迷った際には左右どちらか特定のホールを洗濯し続ける行動が見られるため、右ホールを選択した確率をバイアスとしてプロットしたところ、これは学習の進展に連れて0.5付近に収束し、ラットがルールを用いない条件から新たなルールを学習できたことを示している。一方で符号化試行の正答率は学習を通じて高い水準を維持していた。

引き続きこの課題を実行中のラット海馬 CA1 から神経活動を記録したがそのデータについてはいまだ解析途中であるため引き続き解析し、符号化と想起でことなるダイナミクスが見られたかどうか検討してゆく。しかしながら本研究で考案した符号化/想起課題は記憶プロセスを厳密に分離できる課題であるため、電気生理学的記録以外にも様々な神経活動記録手法と組み合わせることで記憶ダイナミクスの解明に繋がるツールとして考えられる。一方で学習に3週間かかってしまうなど、より洗練させてゆく余地は残っているため、記録実験を通じてより良い行動課題へと改良してゆくことが必要と考えられる。

#### [実験2. 光遺伝学的手法によるガンマ波の抑制の記憶への影響の検討]

本実験の目的である経路特異的な抑制実験の予備実験として、時間知覚課題(ピークインターバル課題)を訓練したラットが新しい時間長を学習する過程において海馬 CA1 の錐体細胞の活動を光抑制し時間知覚や学習に影響がないかどうかを検討した。

まず刺激時間変更前の刺激時間としては10秒を、試行間隔として30秒を設定した。その後で刺激時間20秒/試行間隔60秒を設定し訓練した。光刺激による抑制がないコントロール条件下での行動成績を図3に示す。刺激終了時にピークを示す反応頻度の分布が、上の10秒条件でも下の20秒条件でもタイムスケールを合わせることによってほぼ同じ分布を示す時間知覚の

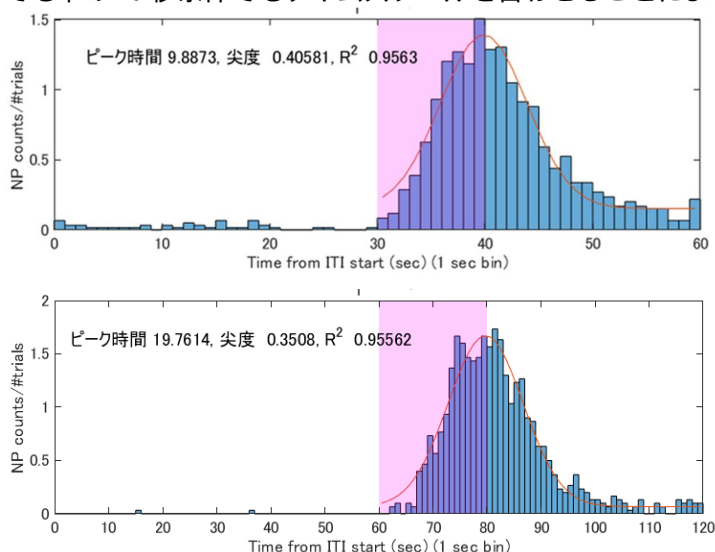


図3. ピークインターバル課題の行動成績の例

スカラー性がここで見られている。しかしながらこの学習過程において CA1 の活動を光抑制した際にも学習のスピードに変化は見られなかった。また学習が完了した後に光抑制を行っても同様に行動における変化は見られなかった。

これはピークインターバル課題が海馬依存ではない可能性も示唆するが、先行研究を参照するとむしろ抑制のメソッドに不適切な点があったと考えるのが妥当と考える。

より適した抑制のメソッドを改良し、符号化/想起課題において実施して行動の変化を解析することがこれからの大きな課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakazono Tomoaki, Takahashi Susumu, Sakurai Yoshio	4. 巻 412
2. 論文標題 Enhanced Theta and High-Gamma Coupling during Late Stage of Rule Switching Task in Rat Hippocampus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 216 ~ 232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.05.053	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------