

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07724

研究課題名(和文) 海馬による経験依存的な記憶形成機構

研究課題名(英文) Mechanisms of experience-rependent memory formation in the hippocampus

研究代表者

石川 淳子 (Junko, Ishikawa)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30570808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で、エピソード経験の記憶形成過程において、海馬CA1に超高頻度発火やリップル発火の発生が増え、経験依存的にリップル発火波形の多様化が起きることを明らかにしてきたが、本研究ではムスカリン受容体拮抗薬(scopolamine)によってこれらの神経イベントだけでなく記憶の形成も阻止されることが明らかとなった。また、本研究では超高頻度発火がリップル発火の増加や多様化のトリガとなっていることを調べるため、超高頻度発火を特異的に抑制するシステムを構築した。これによって、超高頻度発火をリアルタイムで検出した直後から約200msec間、超高頻度発火を消去することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピソード経験の記憶形成における超高頻度発火やリップル発火の生理学的意義はまだほとんど解っていないが、本研究でこれらの神経イベントの重要性が明らかとなった。また、リップル発火の増加や多様化はシナプス可塑性に起因したものであると考えられる。記憶や学習のメカニズムには海馬におけるシナプス可塑性が重要であることが解っているが、それを引き起こす内因性神経イベントはまだ見つかっていない。本研究で構築したシステムによって超高頻度発火がそのイベントであることが証明されれば、生理学分野における重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that episodic experience increases super burst and ripple-firings in hippocampal CA1 and induces diversification of ripple firing waveforms. The present study demonstrated that the formation of memory as well as these neural events is prevented by a muscarinic receptor antagonist (scopolamine), indicating that super burst and ripple-firings are important for memory formation for episodic experience. We also made a novel electrophysiological system to confirm that the super burst is the triggering event for the subsequent increase in ripple-firing and diversification of their waveform. This system made it possible to suppress super burst for approximately 200 ms immediately after they were detected in real time.

研究分野：神経生理学

キーワード：記憶 海馬CA1 超高頻度発火 リップル発火

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究で、エピソード経験が海馬 CA1 における超高頻度発火、リップル発火、サイレントピリオドの増加や、興奮性・抑制性シナプスの増強を誘発することを明らかにした。記憶・学習には海馬の長期増強(LTP)が重要であることが知られているが、エピソード記憶形成過程にある生体内で、LTP がどのように起きるかは解っていない。海馬 CA1 の LTP は、CA1 ニューロンに強い興奮性入力が入ることによって起きることが知られているが、超高頻度発火も、CA1ニューロンが強い興奮性入力を受けた結果発生すると推測される。さらに、超高頻度発火が、エピソード経験開始後、最初に起きる CA1 活動イベントであることや、超高頻度発火の発生がリップル発火の発生や形状変化と相関があったことから、超高頻度発火が、エピソード経験後に起きる海馬 CA1 内の神経イベントのトリガとなっていることが示唆されていた。また、これまでの研究で、リップル発火の波形の形状が経験依存的に多様化することも明らかになった。このことは、リップル発火にはエピソード情報が符号化されていることを示唆している。そこで、本研究では、超高頻度発火やリップル発火がエピソード記憶形成に重要であることや、エピソード経験によって起きる海馬 CA1 の活動変化は超高頻度発火がトリガとなっていることを検証する。さらに、リップル発火によるエピソード情報の符号化解明も試みる。

2. 研究の目的

本研究では海馬 CA1 における超高頻度発火がエピソード経験の記憶形成に重要であることを検証するため、超高頻度発火を特異的に除去してその後の記憶形成やリップル発火がどのようになるかを調べる予定であった。このために、海馬交連の電気が海馬 CA1 の神経活動を抑制することに着目し、海馬 CA1 に発生する超高頻度発火をリアルタイムで検出、それをトリガに刺激装置を動作させて海馬交連に埋め込んである刺激電極から刺激をするシステムを作成することにした。しかし、このシステムを完成させるためには、リアルタイム検出のためのプログラム作成、記録電極と刺激電極の手術法の確立、刺激強度の検討など、膨大な時間がかかる可能性があったため、記憶形成を阻害するムスカリン受容体拮抗薬 (scopolamine) を投与して、記憶形成過程にある海馬 CA1 の神経活動への影響を調べた。本研究では、さらに、エピソード経験の符号化情報を解き明かすために、経験依存的なリップル発火の検出を試みた。このために、記録したリップル発火を抽出した後、それらを機械学習させた。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、超高頻度発火、リップル発火の発生を調べるために、これらの神経イベントが顕著に誘発される異性との初交流と拘束ストレスをエピソードとして成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに経験させる。異性との初交流経験では雄ラットのホームケージに雌ラットを 10 分間入れる。拘束ストレスでは、雄ラットを台に乗せて、四肢を紐で強く縛り、その紐を台の四隅にあるフックに固定し、ラットがうつ伏せの状態で大の字になるようにして、10 分間拘束する。

(2) 海馬 CA1 神経活動記録のための電極刺入手術の 1 ~ 2 週間前からハンドリングを毎日 5 ~ 10 分行う。手術後は、最低 1 週間の回復期間を設け、神経活動記録を行う。神経活動記録実験では海馬 CA1 に記録電極を、リアルタイム超高頻度発火除去システム構築のためには海馬 CA1 へ記録電極を海馬交連へ刺激電極を刺入する。Scopolamine 投与実験では、ラットにエピソードを経験させる前に、scopolamine (2mg/kg ip) 投与を行う。比較対照群には saline の腹腔内投与を行う。投与は、ラットをホームケージに戻し、ホームケージ内での CA1 神経活動を 15 分記録した後、10 分間エピソード経験をさせる。その後、ホームケージ内における神経活動を 30 分間行う。

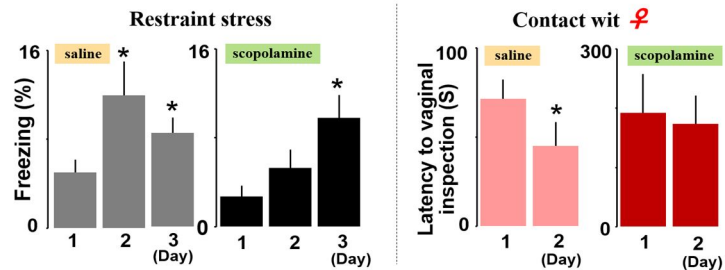
(3) エピソード経験の記憶が形成されているかどうかを確認するため、神経活動記録を行った翌日に記

憶形成確認テストを行う。拘束ストレスについては、前日 (Day1) に拘束ストレスを行った台の上に雄ラットを再度置き、フリージング時間を計測する (Day2)。その後、再度拘束ストレスを施し、その翌日 (Day3) にフリージング時間を計測する。異性 () との初交流では、雄ラットのホームケージに再度雌ラットを入れ、陰部確認までの潜時間を計測する。

(4) 全ての実験プロセスが終了した後、ソムノペンチルにて動物を深麻酔し、4%パラホルムアルデヒドにて脳の還流固定を行う。その後、40 μ m の冠状切片を作製し、HE染色を行って、電極刺入位置を確認する。

4. 研究成果

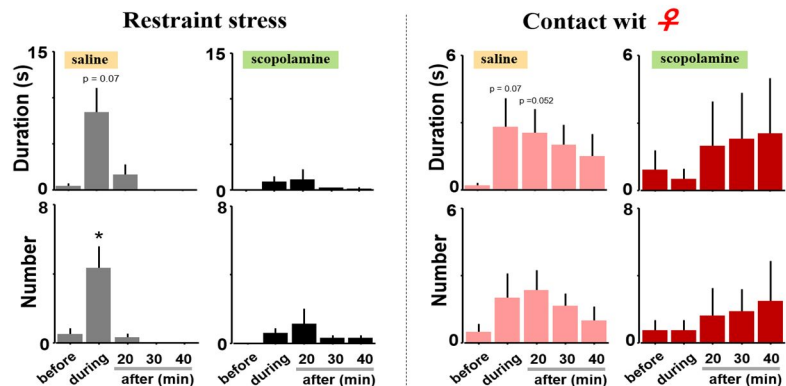
(1) Saline 投与群では拘束ストレスを Day1 に施すと、Day2 で freezing 行動が有意に増えるが、scopolamine を投与すると増えなかったことから、scopolamine 投



(図1) 記憶形成確認テスト2

与により拘束ストレスの記憶形成が阻害されることが解った (図1)。また、本研究では Day2 の Freezing 行動テスト後に、再度 Day1 と同じプロトコルで拘束ストレスを施した。Saline 投与群では Day2 と Day3 間に差はなかったが、scopolamine 投与群は Day3 では freezing 行動が増えた (図1)。このことから、Scopolamine 投与群に割り当てられた動物の記憶形成能力には問題がないことが確認できた。一方、異性 () との初交流前に

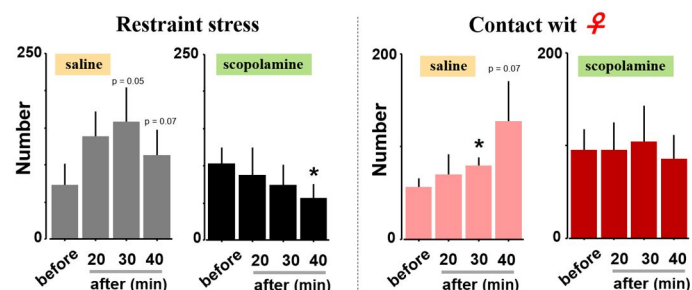
scopolamine を投与すると、Day2 における陰部確認までの潜時の短縮が見られなかった。このことから、Scopolamine は異性との初交流の記憶形成も障害することが解った。



(図2) 超高頻度発火の発生

の初交流後には超高頻度発火の発生総潜時が増加したが、scopolamine 投与群ではこれが確認されなかった (図2)。このことから、scopolamine は超高頻度発火の発生を抑制することが解った。今回の結果では saline 投与群の総潜時について、エピソード経験後に増加傾向は認められたものの有意差は無かったため (n = 7)、今後、更に実験数を増やして明らかにする必要がある。

(3) Saline 投与群では拘束ストレスや異性 () との初交流後にリップル発火の発生が増加したが、scopolamine 投与群では増加しなかった (図3)。このことから、scopolamine はリップル発火の発生も抑制することが明らかとなった。

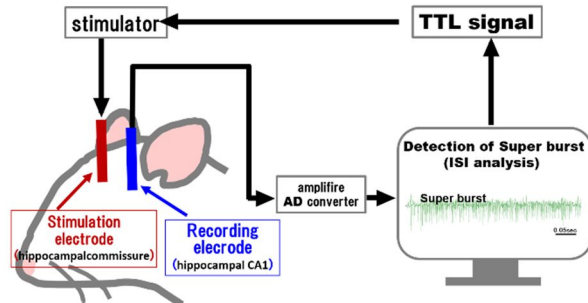


(図3) リップル発火の発生

(4) 以上の結果より、scopolamine

による記憶形成阻害のメカニズムに、海馬 CA1 超高頻度発火とリップル発火の抑制が関与していることが示唆された。

(5) これまでの研究で、リップル発火には経験情報が符号化されていることが示唆されているため、本研究ではAI技術を用いてその符号化様式の解明を試みている。機械学習を用いて経験特異的なリップル発火を検出するために、まず、手でリップル発火データを抽出した。一方、1記録データには数百～数千のリップル発火が含まれているため



(図4) リアルタイム超高頻度発火除去システム

ために、全てを手動で抽出することは不可能である。そこで、リップル発火を自動抽出できないかを検証した。機械学習を用いて自動抽出を試みたが、機械によるリップル発火の判定と目視による判定にまだ相違があるので、今後これを是正していく必要がある。

(6) 本研究では超高頻度発火が記憶形成メカニズムのトリガイイベントであることを検証することを目標にしている。そのため、本研究期間中にこのためのシステムを構築した。このシステムでは海馬CA1の電気活動を記録しながらリアルタイムで inter-spike interval (ISI) を計算し、ISI が規定値以下のものが規定値数検出されたら、刺激装置にTTL信号を送り、そこから海馬交連に電気刺激が入るものである (図4)。レコーディング毎に記録できるニューロン数が異なるため、これに応じて ISI 検出のための規定値は変更することとした。このシステムにより、1回の海馬交連の刺激で約 200msec 間超高頻度発火が抑制することが出来るようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Kuremoto T, Sasaki T, Ishikawa J, Mabu S, Mitsushima D	4. 巻 7
2. 論文標題 Episodic memory recognition of the hippocampus using a deep learning method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine Review	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） 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 Ishikawa J, Sakurai Y, Ishikawa A, Mitsushima D.	4. 巻 237
2. 論文標題 Contribution of the prefrontal cortex and basolateral amygdala to behavioral decision-making under reward/punishment conflict	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychopharmacology	6. 最初と最後の頁 639 ~ 654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00213-019-05398-7	査読の有無 無
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 Kuremoto T, Sasaki T, Ishikawa J, Mabu S, Mitsushima D	4. 巻 7
2. 論文標題 Episodic memory recognition of the hippocampus using a deep learning method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine Review	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18103/imr.v7i1.915	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川淳子 美津島大
2. 発表標題 Roles of basolateral nucleus of the amygdala in episode-processing by hippocampal CA1
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國本知志、石川淳子、美津島大
2. 発表標題 The role of ripple firing in memory formation and decoding of encoded information
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 淳子、友景 琢人、美津島 大
2. 発表標題 経験依存的に変化する海馬CA1神経活動とシナプス可塑性
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美津島大、妹尾耕志、石川淳子
2. 発表標題 経験内容を符号化する海馬CA1リップル様発火活動：動的時間伸縮法を用いた網羅的類似解析
3. 学会等名 第98回日本生理学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 淳子、岡野 航大、美津島 大
2. 発表標題 Spontaneous high-frequency firings in hippocampal CA1 neurons: a role of "super bursts" to initiate memory process
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2023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	西井 淳 (Nishii Jun) (00242040)	山口大学・大学院創成科学研究科・教授 (15501)	
研究分担者	村井 礼 (Murai Hiroshi) (30279111)	山口大学・国際総合科学部・准教授 (15501)	
研究分担者	呉本 堯 (Kuremoto Takashi) (40294657)	日本工業大学・先進工学部・教授 (32407)	
研究分担者	美津島 大 (Mitsushima Dai) (70264603)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

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
---------	---------