

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830023

研究課題名(和文) 仮想現実環境と二光子イメージング法を用いた海馬における物体と空間の記憶連関の研究

研究課題名(英文) Associative memory between object and place in hippocampus using virtual reality and in vivo two-photon calcium imaging

研究代表者

水田 恒太郎 (MIZUTA, KOTARO)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：60632891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウスの海馬において空間と物体の情報が連関されるときに細胞集合体の活動を明らかにするため、海馬CA1に蛍光カルシウムセンサータンパク質G-CaMP7を発現するトランスジェニックマウスを使用し、学習中の神経活動をイメージングした。マウスは報酬を受けるために2秒間仮想直線路内の3つの中の報酬のある正解のターゲットに滞在した。探索中のマウスから一連の細胞群が場所細胞様活動を示した。また、別の細胞群がターゲット滞在中に時間特異的に活動を示した。その中のいくつかは数日安定し、報酬の再配置に関わらず反応が残った。これらの結果は海馬の細胞群では高い価値を持つ情報はより安定して表現されることを示す。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate activity of cell assembly in hippocampus during association of object and place information. For the purpose, we imaged neuronal activities during the learning using transgenic mice that express a fluorescent calcium sensor protein G-CaMP7 in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Mice stayed the correct target of three targets for 2 sec to receive reward in a virtual linear track. While the animals navigate through the track, a population of neurons exhibited place-cell like activity. In addition, another group of neurons demonstrated time-locked activity while the mice stayed at the target zone. The representation of target was stable: some of them remained multiple days and still responded even reward zone were relocated. These results indicate that information with higher value is more stably represented in subpopulations of neurons in hippocampal CA1 than that without value.

研究分野：神経生理学・神経科学一般

キーワード：トランスジェニックマウス 二光子レーザー顕微鏡 可塑性 記憶・学習 場所細胞 報酬

1. 研究開始当初の背景

海馬には特定の空間における自分自身の位置や、ある物体がどこにあるかについての情報を表現する細胞が存在することが知られている(O'Keefe and Nadel, 1978, Manns and Eichenbaum, Learn Mem, 2009)。すなわち、海馬の錐体細胞は、空間のある特定の場所に動物が到達したときのみ特異的に発火する「場所細胞 (place cell)」と呼ばれる細胞活動を示すことが、電気生理学実験により明らかにされている (O'Keefe and Dostrovsky, Brain Res, 1971)。さらに、空間に依存せず物体特異的に発火する細胞 (物体細胞) が海馬に存在することも報告されている (Komorowski et al, J Neurosci, 2009)。海馬において物体と空間の情報に何らかの相互作用が存在することは電気生理学と行動から明らかであるにも関わらず、それを説明するモデル研究は未だにない。海馬の機能イメージングについては、Dombeckら (Nat Neurosci, 2010) により、顕微鏡下に頭部固定し VR 環境をナビゲーションするマウスの海馬 CA1 野で、マウスが VR 上のある特定の場所に来たときのみ、特異的に発火する場所細胞様の活動が観察されている。しかし、特定の物体に反応する細胞活動のイメージング、及び、空間と物体の相互作用に対しては、いまだ報告されていない。

2. 研究の目的

動物は、物体手がかりの存在する空間を探索する経験により、空間自体に関する情報と、その空間内の物体に関する情報とを共に記憶することができる。しかし、このような空間と物体の連関した記憶の形成に関わるとされている海馬の神経回路内で、上記の2種類の情報がどのように結びついているかは明らかでない。本研究は、マウスの海馬において「空間」と「物体」という異なる情報が連関される際の細胞集合体の活動を、単一細胞解像度をもつ *in vivo* 神経活動イメージング実験と電気生理学的手法で明らかにする。

3. 研究の方法

トランスジェニックマウス

蛍光カルシウムタンパク質 G-CaMP7 を *thyl* プロモータ制御下に発現する3-4ヶ月齢のトランスジェニックマウスを使用した。そのマウスの頭蓋骨に、金属製のヘッドプレートを接着した。ヘッドプレートの穴にある頭蓋骨片を取り除き、大脳皮質を海馬表面が露出する最小限の量だけ吸引除去した。皮質除去後の穴に、底部にカバースリップを接着した光学窓を埋め込んだ。回復後、3日間マウスにハンドリングを行い、摂水3日後に行動実験を始めた。

VR のセッティング

マウスを下から空気圧で浮上させた発泡

スチロールの球上に置き、二光子レーザー顕微鏡のフレームにヘッドプレートを介して頭部を固定した。マウスの歩行による球の動きを光学検出器により検出させ、画面に映し出された VR の映像と同期させた。VR の映像を映し出すために、23 インチの液晶モニターを使用した。VR は 3D/VR 空間構築ソフトウェア OmegaSpace3.1 (ソリッドレイ研究所) によって作成された。

VR 行動実験課題

空間学習として、O 迷路を作成した。摂水制限下で飼育されたマウスにその O 迷路を一周する度に、水を与えることで空間を学習させた。実験は30分間を1日1回行われた。最初の3日間は、マウスがコーナーにたどり着くと自動で曲がるように設定した。その後の8日間はマウスが自身でコーナーを曲がるように設定した。探索行動するマウスの VR 上の位置と走る速度、獲得した報酬の数を記録した。

物体学習には、初めに場所手がかりがない地平線だけの空間に青の三角錐のみをある程度離れた位置に提示した。その物体に十分接近したときに報酬を与えた。報酬後に物体を消し、その2秒後再度提示し再び接近させることにより、物体に対する学習をマウスに行わせた。その学習後に緑の球と青の三角錐を提示し、交互に接近したときに報酬を与えた。実験は10分間を1日1回行われた。

報酬場所学習課題には、VR 直線路を使用した。その外にはマウスから見える3つの高い手がかりを、直線路内の壁にはドット状、床には縞々の模様の手がかりを表示した。その直線路内に3つのゴールエリアを設置した。マウスは VR 直線路 (長さ: 約 120 cm) の一方の端からスタートし、指定されたゴール上で数秒間滞在すると報酬が得られた。その報酬として水が用いられ、マウスが報酬地点で滞在する間に 10 μ l が 1 秒間隔で 3 回与えられた。マウスはもう片方の端にたどり着くと、4 秒後にスタート地点に自動的にテレポートする設定にした。マウスは回転せずに何度も探索行動を簡単に行うことができる。その滞在時間は 0, 1, 1.5, 2 秒と学習が進むにつれて増加させた。実験は 10 分間を 1 日 1-2 回行われた。

カルシウムイメージング

VR 直線路を探索するマウスから以下のイメージング実験を行う。マウスの背側海馬表面から約 150 μ m 下にある CA1 錐体細胞層に二光子顕微鏡の焦点を合わせ、G-CaMP7 の蛍光画像を取得する。低倍率で高 NA 値 (16 \times , NA0.8) の対物レンズを用い 1.5 倍に拡大した 0.5 \times 0.5 mm の視野の中に約 1000 個の錐体細胞の活動が同時にイメージングした。VR 内を探索するマウスの個々の CA1 細胞の活動と同時にマウスの場所とを記録した。2 回目以降のイメージング実験では、1 回目記録

された画像を参照に、同じところをイメージングした。

データ解析

行動データは LabView (National Instrument 社)、および、画像データは NIS-Elements (ニコン社) によって獲得された。獲得されたデータは MATLAB (MathWorks 社) によって解析された。

画像上の記録された約 900 個の神経細胞を non-negative matrix factorization によるプログラムを用い、自動解析を行った(竹川ら投稿準備中)。これにより、細胞を自動的に同定した上で、その活動をカルシウムシグナルとして検出した。

4. 研究成果

空間学習課題

空間学習として、O 迷路を使用した。マウスは O 迷路を右回りに一周し、迷路内に設置されたゲートを通ると報酬が得られる。初期段階では、マウスは O 迷路のコーナーの壁に衝突し曲がるまでに数秒間の時間を費やしたが、学習が進むにつれて、マウスはコーナーを円滑に曲がることができるようになった。学習が進むにつれて、走行距離、速度および得られた報酬の回数が増加した。

物体学習課題

マウスが物体を容易に認識できるように、目の前に青い三角錐のみを提示した。マウスが物体に接近すると報酬が得られた。マウスは時々曲がって物体から離れていた。しかし、物体付近に報酬があることを覚えるとマウスは最短距離で物体に近づくようになった。その後、もう一つの物体である緑の球と青い三角錐の両方をマウスの前に平行に離して並べた。その二つの配置はトライアル毎にランダムに入れ替えた。両方の物体ともに、マウスの接近回数が著しく減少した。学習を繰り返してもその接近回数は増加しなかった。以上のことから、マウスの足下にある球を巧みに操作して物体に接近ことは難しいと考えられる。そこで、物体と空間が両方ある報酬場所学習課題に変更した。

報酬場所学習課題

マウスに物体学習課題を遂行させることが困難であったため、VR 直線路を使用した報酬場所学習課題を行わせた。直線路内に設置された 3 つの手掛かり (物体) のうち、1 つに報酬が得られる場所を設置した。報酬までの遅延時間がないとき、マウスは報酬を持つ手掛かりの場所に辿りつくるとすぐに報酬が得られた。マウスは報酬場所に立ち止まることを学習した。マウスはその報酬のある手掛かりの位置で報酬を得るまでの時間を遅延させると、学習初期にはマウスは報酬場所で停止する事が出来なかった。しかし、訓練を重ねると停止し報酬を得られた。報酬を別

の手掛かり位置に移動してもマウスはその新たな報酬場所で止まるがすぐにできた。これらの学習行動中のマウスの海馬をイメージングし、約 900 個の海馬錐体細胞の活動を記録することができた。VR 下学習行動でのマウスの海馬神経細胞の中から、約 20-30% の場所に関与する細胞集合体が同定されると同時に報酬場所での滞在時間特異的に活動する細胞集合体が新たに発見された。さらに、同じ個体で同じ細胞を数ヶ月に亘りイメージングすることができた。長期的に神経活動を観察することで細胞の活動変化を調べたところ、多くの細胞は数日でターンオーバーしていく一方、観察された全ての細胞のうちの 2% は報酬場所で安定した活動を示し、報酬場所を変えてもまだ活動した。しかし、報酬を得るまでの遅延時間をなくすとその活動は減少した。これらの細胞は物体非依存的に報酬の価値に対する記憶に重要な役割を果たすことが示唆された。

多くの細胞がターンオーバーするので、単一の場所細胞などを狙ってパッチクランプ記録することは難しかった。そこで、多電極記録による局所細胞外電位を、イメージングと同時に記録することに成功した。今後、場所一物体特異的な細胞集合体が発火するとき、どの脳領域から入力が必要かを検討できるようにになった。

本研究結果に関するデータについては論文投稿にむけて準備している。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 10 件)

- ① 水田恒太郎、佐藤正晃、関根友紀子、河野真子、イスラムタンビル、大倉正道、中井淳一、林康紀. 海馬 CA1 における価値表現の選択的保持. 第 92 回日本生理学会大会 2015 年 3 月 21-23 日「神戸国際会議場 (兵庫県、神戸市)」
- ② Kotaro Mizuta, Masaaki Sato, Masako Kawano, Yukiko Sekine, Tanvir Isram, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi. Two-photon calcium imaging of hippocampal CA1 circuit activity during virtual spatial memory task. 生理学研究所「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」2014 年 12 月 12-13 日「生理学研究所 (愛知県、岡崎市)」
- ③ Kotaro Mizuta, Masaaki Sato, Masako Kawano, Yukiko Sekine, Tanvir Isram, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi. Two-photon calcium imaging of hippocampal CA1 circuit activity during virtual spatial memory task. Cold Spring Harbor Asia Conference, Neural Circuit Basis of

- Behavior and its Disorders, May 12-16, 2014, 「 Suzhou Dushu Lake Conference Center (Suzhou, China)」
- ④ 水田恒太郎、佐藤正晃、河野真子、関根友紀子、大倉正道、中井純一、林康紀. バーチャルリアリティ直線路における記憶に基づいたマウスのナビゲーション行動. 第91回日本生理学会大会 2014年3月16-18日「鹿児島大学 郡元キャンパス (鹿児島県、鹿児島市)」
- ⑤ Kotaro Mizuta, Masaaki Sato, Masako Kawano, Yukiko Sekine, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi. Memory-guided behavior of mice in a virtual environment. International Symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014", Mar 16-17, 2014 「Tokyo Medical and Dental University (Tokyo, Japan)」
- ⑥ Masaaki Sato, Kotaro Mizuta, Masako Kawano, Takashi Takekawa, Tanvir Islam, Hiroshi Yamakawa, Yoko Yamaguchi, Tomoki Fukai, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi. Hippocampal CA1 network dynamics during locomotion in virtual reality. The 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Nov 9-13, 2013 「San Diego Convention Center (San Diego, USA)」
- ⑦ Yuhei Uemura, Tsugumi Fujita, Sena Ohtsubo, Akihiro Matsushita, Chang-Yu Jiang, Kotaro Mizuta, Eiichi Kumamoto. Effects of anticonvulsants on compound action potentials in the frog sciatic nerve: Comparison with those of local anesthetics. The 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Nov 9-13, 2013 「San Diego Convention Center (San Diego, USA)」
- ⑧ 水田恒太郎、佐藤正晃、河野真子、林康紀. 仮想現実環境における記憶に基づく空間ナビゲーション課題. 第36回日本神経科学大会 2013年6月20-23日「国立京都国際会館 (京都府、京都市)」
- ⑨ 佐藤正晃、水田恒太郎、河野真子、竹川高志、イスラムタンベル、山川宏、山口陽子、深井朋樹、大倉正道、中井淳一、林康紀. 生体における海馬神経回路活動の可視化. 第36回日本神経科学大会 2013年6月20-23日「国立京都国際会館 (京都府、京都市)」
- ⑩ Kotaro Mizuta, Masaaki Sato, Masako Kawano, Yasunori Hayashi. Development of a memory-guided virtual navigation task for mice. The 6th MCCS (Molecular Cellular Cognition Society) Asia Symposium, June 19, 2013 「Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)」

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/bsi/em_mech/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水田 恒太郎 (MIZUTA KOTARO)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：60632891

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし