

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18332

研究課題名(和文)学習時の新生神経細胞の活動の可視化

研究課題名(英文)Calcium imaging of adult born neurons during learning tasks

研究代表者

菅谷 佑樹 (Sugaya, Yuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：00625759

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)：海馬歯状回では神経細胞新生が生涯続き、記憶の形成や消去、忘却、記憶パターンの分離に重要な働きを担っていると報告されている。しかし、記憶課題遂行中の新生神経細胞の具体的な活動パターンはほとんど明らかになっていない。本研究では記憶想起課題中の新生細胞、成熟細胞をカルシウムイメージング法により観察し、記憶想起課題中の新生、成熟細胞の活動を明らかにした。その結果、新生細胞では成熟細胞に比べて行動による発火率の変動が少なかった。新生細胞は成熟細胞の活動を抑制しているとの報告があることから、新生細胞は成熟細胞の過剰な活動を定常的に抑制し記憶の精度を上げている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neurogenesis persists throughout life in the dentate gyrus of mammals. Many previous studies reported the role of newborn neurons in memory consolidation, memory extinction, forgetting and pattern separation. However, the detailed activity of newly generated neurons during behavioral task was still unclear. In this study, we performed calcium imaging of the activity of newly-generated young neurons and compared them with that of old neurons. We found that the activity of young neurons was rather stable when compared to that of old neurons. Young neurons are considered to suppress the activity of old neurons and the increase of the activity of old neurons resulted in impaired retrieval of memory. These results suggest that the suppression of the activity of old neurons by newly-generated neurons reduces the noise and increases the accuracy of memory expression by old neurons.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬 神経細胞新生

1. 研究開始当初の背景

げっ歯類などでは主に脳室の周囲の脳室下層と海馬歯状回顆粒下層において、またヒトにおいても海馬歯状回顆粒下層と脳室下層、線条体において神経細胞新生が生涯続く。この中で、海馬歯状回は記憶に重要な役割を果たす領域であることから、海馬歯状回の新生神経細胞の特徴や機能については多くの研究がある。げっ歯類海馬歯状回の新生神経細胞数やその回路への組み込みはさまざまな環境要因によって変動し、学習の維持、想起に関連しているという報告や、パターン分離に関連しているとする報告、学習の消去に関連しているという報告があるが、具体的にどのように情報を表現しているのかについては現時点でほとんど明らかになっていない。その理由は、これまでのマルチユニット記録による細胞活動の記録では成熟顆粒細胞と新生顆粒細胞の活動を明確に区別できないからである。近年、細胞外記録に変わる神経活動の観察方法としてカルシウムイメージングが発展している。最新のカルシウムインジケータでは活動電位一発による細胞内カルシウム濃度の変化を観察でき、ウイルスベクター技術と組み合わせることで、特定の細胞に時期特異的にカルシウムインジケータを発現させ、神経細胞の活動パターンの詳細な解析を行うことが可能となっている。

2. 研究の目的

行動中のマウスの歯状回の新生顆粒細胞のカルシウムイメージングを行うことによって、新生顆粒細胞がどのような状況で活動し、周りの成熟顆粒細胞の活動とどのように関連しているのかを明らかにする。

また、新生顆粒細胞の活動の変化を各成熟段階で明らかにする。

最後に、新生顆粒細胞の活動パターンを操作することによって、新生顆粒細胞の情報処理の変化が記憶学習に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

カルシウムインジケータ GCaMP3 の floxed マウスと、タモキシフェン存在下で神経幹細胞特異的に Cre 依存性の組み換えが起こる Nestin-Cre ERT2 マウスを交配し、タモキシフェン投与により神経幹細胞特異的に GCaMP3 の発現を開始するマウスを作成した。またウイルスベクターを用いて Nestin-Cre ERT2 マウスまたは歯状回で幼若神経細胞特異的に Cre を発現する POMC-Cre マウスに floxed GCaMP6f 遺伝子を導入し、神経幹細胞または幼若神経細胞特異的に GCaMP6f の発現を開始するマウスも作成した (図 1)。

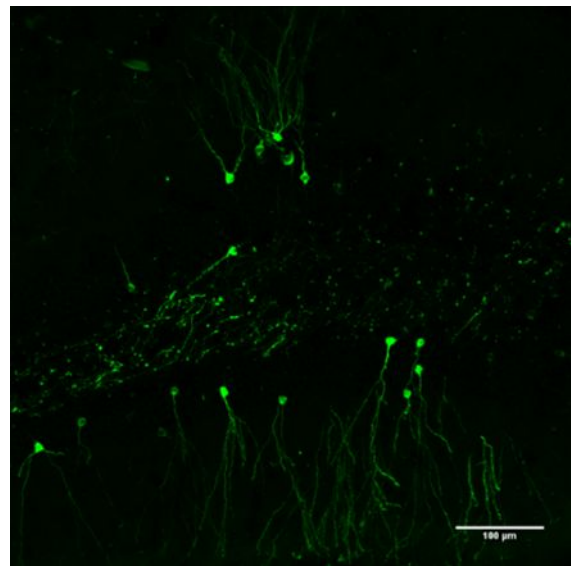


図 1、歯状回新生細胞特異的カルシウムインジケータ-GCaMP6f の発現

Scale bar = 100 μm

タモキシフェン投与またはウイルス注入後、4 週間後に歯状回の直上に屈折率分布型 (GRIN) レンズをデンタルセメントで固定した。

レンズ設置後、2 週後に行動実験を開始した。

行動実験は 5 日間からなり、1 日目はオープンフィールドを用いて探索行動中の新生顆粒細胞の活動を 5 分間計測した。

2 日目は音依存性恐怖条件付けを行った。

3 日目に同じコンテキストでのプローブテストを 5 分間行い、4 日目、5 日目に異なるコンテキストで音を用いたプローブテストを 10 分間行った。恐怖記憶の程度はすくみ行動の時間で測定した。音を用いたプローブテストでは条件付け記憶の消去能力も検討した。30 秒間の音刺激を 16 回、フットショックなしで与え、すくみ行動の時間を計測した。

次に、ウイルスベクターを用いて歯状回の CaMKII 陽性細胞に GCaMP6f を発現させ、同様の行動課題を行った際の成熟顆粒細胞の活動を記録した。

データ解析は動き補正、コントラスト補正を行ったのち、取得された画像の中で空間的に偏ったピクセルで画素の変化が認められた際に細胞と判断するプログラムを用いて自動的に細胞候補を抽出したあと、手動で細胞であるか否かの判断を行った。

畳み込みによる活動電位数の推定は行わず、すべてのピクセル値の平均値に対する相対的なピクセル値の大きさをカルシウムシグナル強度とした。

次に、成熟顆粒細胞の活動が記憶の想起に与える影響を検討するために、ウイルスベクターを用いて歯状回の興奮性細胞に Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug (DREADD) の一種である hM4D を発現させ、リガンドを投与することで成熟顆粒細胞の活動を恐怖条件付け記憶の想起の際に増加させた。統計は t-test を使い、95%の確率で帰無仮説が棄却される場合に統計的有意と判定した。

4. 研究成果

場所依存性恐怖条件付け記憶の想起課題において、条件付け群と対照群で神経細胞内のカルシウムシグナルの強さを比較したところ、条件付け群では、探索行動時の成熟顆粒細胞のカルシウムシグナルが対照群と比較して有意に増加していた(図2)。

カルシウムシグナルの強さはマウスの静止時には探索行動時と比べて有意に低下するが、条件付け群と対照群で有意な差はみとめられなかった(図2)。

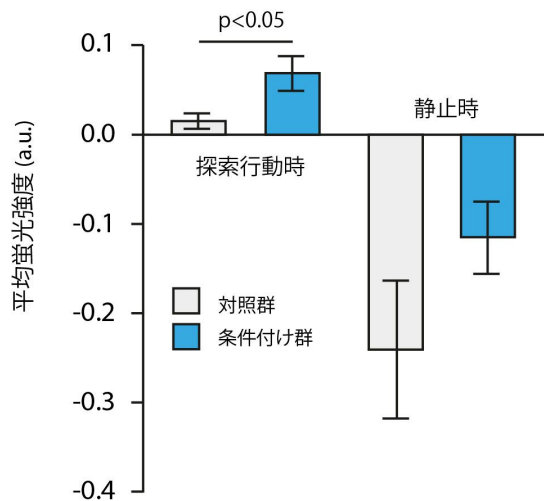


図 2、記憶想起時の成熟顆粒細胞のカルシウムシグナル強度

条件付けされたマウスにおける分裂後 6 週の新生顆粒細胞でも静止時と比較した際の探索行動時のカルシウムシグナルの増加が認められたが、成熟顆粒細胞と比較して静止時のカルシウムシグナルの低下が少なかった(図3)。

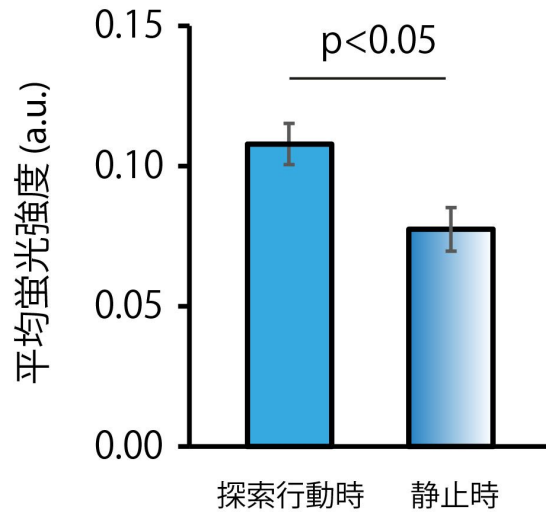


図 3、記憶想起時の新生顆粒細胞のカルシウムシグナル強度

次に、成熟顆粒細胞の活動変化と行動の因果関係を明らかにするため、hM4D を歯状回興奮性細胞に発現させ、条件付け時または想起時に歯状回の活動を増加させた。

すると、条件付けの際に歯状回の活動を増加させると記憶の形成が障害され、音による条件付け記憶の想起時に顆粒細胞の活動を増加させると、記憶の想起が障害された。

先行研究で新生顆粒細胞は抑制性細胞を介して成熟顆粒細胞に再帰性の抑制性入力を与え、顆粒細胞の活動を抑制していることが報告されていることから、新生顆粒細胞は想起課題中に常に活動することで成熟顆粒細胞の余分な活動を抑制し、記憶の想起を促進している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

“Dentate granule cell activity during fear memory retrieval and extinction in freely moving mice.”, Alvaro Carrier Ruiz, Yuki Sugaya and Masanobu Kano, The 47th international symposium “Decoding Synapses”, 2016年10月28日, 岡崎市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷 佑樹 (SUGAYA, Yuki)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00625759