

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07086

研究課題名(和文) SW-R発生時の記憶再生を支える細胞選択的な活動メカニズムの解明

研究課題名(英文) Physiological mechanism of sequential firing of hippocampal neurons during SW-R

研究代表者

石川 智愛 (Ishikawa, Tomoe)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20804587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：海馬においてsharp waves/ripples(SW-R)発生時に繰り返し観察されるシークエンス発火が記憶の固定を担うといわれている。しかし、シークエンス発火が下流の細胞においてどのように受容されているのかは未解明である。そこで、SW-Rに参加する細胞としない細胞のシナプス入力を大規模に可視化し、参加する細胞は参加しない細胞に比べ、SW-R時に多数のシナプス入力を受けることを発見した。さらに、このシナプス入力はシークエンス構造を持ち、空間的に近接したスパインに収束することを見出した。空間的に近接した入力は非線形演算を誘導することから、この入力様式が細胞選択的な発火に関与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、SW-Rに参加するか否かを明確に分け、シナプス入力の時空間パターンを比較し、SW-Rに参加する細胞は近接したスパインが繰り返しシークエンス入力を受け取ることを見出した。この結果は、記憶再生時の細胞選択的な発火メカニズムに「シークエンス構造をもつシナプス入力」が関与していること示唆した点で意義深い。また、シークエンス入力の存在を初めて捉えた知見でもあり、今後、樹状突起の演算様式のより詳細な解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Sequential reactivation of memory-relevant neuron ensembles during hippocampal sharp-wave ripple (SW-R) oscillations reflects cognitive processing. However, how a downstream neuron decodes this spatiotemporally organized activity remains unexplored. Using subcellular calcium imaging from CA1 pyramidal neurons in ex vivo hippocampal networks, we discovered that neighboring spines are activated serially along dendrites toward or away from the cell bodies. The sequential spine activity was engaged repeatedly in different SW-Rs in a complex manner. In a single SW-R event, multiple sequences appeared discretely in dendritic trees, but as a whole, sequences occurred preferentially in some dendritic branches. Thus, sequential replays of multineuronal spikes are distributed across several compartmentalized dendritic foci of a postsynaptic neuron with their spatiotemporal features preserved.

研究分野：神経生理学

キーワード：sharp waves/ripples シナプス入力 スパイン シークエンス入力 海馬

1. 研究開始当初の背景

新たに形成された記憶は、「固定化」というプロセスを経ることで安定化し、長期的に保存される。このプロセスにおいて、海馬では、記憶形成時に活動した細胞が **SW-R** という特徴的な脳波を伴い自発的に活動する (Lee AK et al., *Neuron*, 2002)。記憶に関わる特定の細胞が繰り返し活動すること、すなわち記憶の再生こそが固定化の本質であると考えられている。それにもかかわらず、記憶再生時に特定の細胞集団が選択的に活動するメカニズムに関してはほとんどが未解明である。

神経細胞の活動は、スパインという突起構造を介したシナプス入力を受けることで惹起される。このとき、樹状突起において、どのスパインが、いつ、どのような入力を受けるかが、神経細胞の活動性を大きく左右する。このようなシナプス入力の時空間パターンを説明するモデルとして、現在、クラスター型と分散型が提唱されている (Polsky A et al., *Nat Neurosci*, 2008, Larkum ME et al., *Curr Opin Neurobiol*, 2008)。クラスターモデルとは、近接したスパインが時間的なまとまりをもった入力、すなわちクラスター入力を受ける、というものである。こうした入力パターンは、シナプスの可塑的变化を誘導し、特定の神経細胞を選択的に活動させる上で効率がよいと推察されている。このような背景から、「記憶に関わる細胞は **SW-R** 発生時に、より多くクラスター入力を受けることで、選択的に再生する」という仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、記憶再生時の細胞選択的な活動メカニズムを明らかにすることである。個々の神経細胞の活動様式は、シナプス入力の時空間パターンにより決定される。この時シナプス入力は線形的に足し合わせられるわけではなく、非線形的に加算されると推察されている。しかし、シナプス入力の時空間パターンを可視化する技術は限られており、樹状突起の情報演算に関しては未解明な点が多い。本研究では、**SW-R** 発生時に海馬 CA1 野の錐体細胞が受け取るシナプス入力を大規模に捉え、記憶再生のカギになるシナプス入力の時空間パターンを探索した。**SW-R** に参加するか否かを明確に分け、シナプス入力の時空間パターンを比較することで、記憶再生時の細胞選択的な発火メカニズムに「シーケンス構造をもつシナプス入力」が関与していることを示した。

3. 研究の方法

シナプス入力の時空間パターンの可視化には、**CMOS** カメラと **CSU** ユニットを用いた「大規模スパインイメージング」を用いた。大規模スパインイメージングでは、海馬培養スライスの単一細胞に電極を刺入することでカルシウム蛍光指示薬である **Fluo-4** を導入する。これにより、シナプス後部構造であるスパインのカルシウム蛍光強度変化を捉えることが可能になる。さらに本研究では、**SW-R** に参加するか否かを調べるため、ホールセルに移行する前に、**LFP** とセルアタッチの同時記録を行った。**LFP** 記録から **SW-R** のタイミングを、セルアタッチ記録から細胞の発火タイミングを読み取ることができる。その後、ホールセルに移行し、**LFP** 記録と大規模スパインイメージングを同時に行うことで、**SW-R** 発生時に海馬錐体細胞が受けるシナプス入力の時空間パターンを可視化した。

4. 研究成果

当初は急性スライスを用いた検証を予定していたが、条件検討の結果、十分なスパイン数を確保できなかったことから、培養スライスを用いた検証に切り替えた。これにより、二光子顕微鏡ではなく、**CMOS** カメラと **CSU** ユニットを用いた高速イメージングが可能となり、数百に及ぶスパインへのシナプス入力を同時に捉えることが可能になった。

はじめに、培養スライスで観察される **SW-R** が生体マウスや急性スライスで観察される **SW-R** と同様の特性を保持しているか確認するため、**CSD** 解析や薬理学的検討を行った。その結果、培養スライス上で観察される **SW-R** は生体マウス、急性スライスで観察される **SW-R** と同様の特性を持つことが確認できた。

SW-R に参加するか否かを調べるために、ホールセルに移行する前にセルアタッチ記録を行った。この時に得られた発火が、サロゲートデータと比較して有意に **SW-R** と同期していた細胞を **SW-R** に参加する細胞、サロゲートデータと同程度またはそれよりも低い値を示した細胞を参加しない細胞とした。記録した全 21 細胞のうち、12 細胞が **SW-R** に参加する細胞、9 細胞が参加しない細胞と判定された。その後、ホールセル記録に移行し、大規模スパインイメージングを行った。観察領域はスペースクランプの問題を考慮して細胞体から 200 μm 以内とした。高速イメージングによって得られたシナプス入力の時空間パターンを **SW-R** に参加する細胞とそうでない細胞で比較し、記憶再生時に見られる特徴的なシナプス入力の時空間パターンの抽出を行った。その結果、**SW-R** に参加する細胞は **SW** 時に多数のシナプス入力を受け取り、その入力は空間的に近接したスパインが受け取ることを発見した。**SW-R** に参加しない細胞でも **SW-R** の 500ms 程度前にシナプス入力の上昇は認められたものの、**SW-R** 時に最大値をとることはなかった。

さらにシナプス入力の時空間パターンをより詳細に解析したところ、特定のスパインが特定の順番で入力をうけるシーケンス様構造を持つことを見出した。このシーケンス構造は

SW-R に参加する細胞において、SW-R 発生時に高頻度に観察された。また、シーケンス構造は単体で生じることもあれば同時に複数のシーケンス入力も観察されることもあった。SW-R 発生時に観察される記憶の再生も特定の細胞が順序だった発火を示すシーケンス構造を持つことが知られている。本研究は、細胞体レベルで報告されてきたシーケンス発火が樹状突起スパインレベルでも保持されたまま下流の細胞に伝わることを示した初めての知見である。

さらに、シーケンス入力も樹状突起上のどのスパインで生じているのか明らかにするため、観察されたシーケンスに含まれるスパインの空間分布を再構築した。その結果、10 μm 以内のスパインが共通のシーケンスに参加しやすいことを発見した（ローカルシーケンス）。つづいて、ローカルシーケンスが、単独で生じるのか複数同時に発生するのか、また方向性を持つのか検証した。その結果、ローカルシーケンスは複数の樹状突起において同時に発生し、それぞれ特定の方向性を示すことを明らかにした。

これらのデータは、SW-R に参加する細胞が、近接したスパインでシーケンス入力を受け取ることを示すものである。これまでに、近接したシナプス入力や細胞体に向かうシナプス入力は効率よく細胞体を脱分極させることが知られている。本研究で示した SW-R 時のシナプス入力の時空間パターンは SW-R 発生時の細胞選択的な活動のメカニズムの一端を担う可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件) 全て査読あり

1. Kobayashi, C., Okamoto, K., Mochizuki, Y., Urakubo, H., Funayama, F., Ishikawa, T., Kashima, T., Szymanska, A. F., Ouchi, A., Ishii, S., Ikegaya, Y. GABAergic inhibition reduces the impact of synaptic excitation on somatic excitation. *Neurosci. Res.*, *in press*
2. Nomura, H., Mizuta, H., Norimoto, H., Masuda, F., Miura, Y., Kubo, A., Kojima, H., Ashizuka, A., Matsukawa, N., Baraki, Z., Hitora-Imamura, N., Nakayama, D., Ishikawa, T., Okada, M., Orita, K., Saito, R., Yamauchi, N., Sano, Y., Kusuhara, H., Minami, M., Takahashi, H., Ikegaya, Y. Central histamine boosts perirhinal cortex activity and restores forgotten object memories. *Biol. Psychiat.*, *in press*
3. Norimoto, H., Makino, K., Gao, M., Shikano, Y., Okamoto, K., Ishikawa, T., Sasaki, T., Hioki, H., Fujisawa, S., Ikegaya, Y. Hippocampal ripples down-regulate synapses. *Science*, 359:1524-1527, 2018

[学会発表] (計 8 件)

1. 松岡将司、満倉靖恵、石川智愛、安井正人 髄膜リンパ管が脳機能に与える影響の解明 第 92 回日本薬理学会年会、2019 年
2. Ishikawa, T., Unekawa, M., Tomita, Y., Nakamura, R., Mitsukura, Y., Nakahara, J., Yasui, M. Water intoxication induces systemic reactions, including closure of paravascular space, in vivo 6th International Conference on Glial Biology in Medicine, 2018
3. Ishikawa, T., Unekawa, M., Tomita, Y., Yasui, M. Real-time in vivo observation of the volume changes in astrocytes and perivascular spaces during water intoxication. 11th FENS Forum of Neuroscience, 2018
4. 石川智愛、畝川美悠紀、富田裕、中原仁、安井正人 水中毒が全身の生理パラメータおよび paravascular space に与える影響 先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会 2018、2018 年
5. Nomura, H., Mizuta, H., Norimoto, H., Masuda, F., Miura, Y., Kojima, H., Ashizuka, A., Matsukawa, N., Baraki, Z., Hitora-Imamura, N., Nakayama, D., Ishikawa, T., Saito, R., Sano, Y., Kusuhara, H., Minami, M., Takahashi, H., Ikegaya, Y. Central histamine reactivates weak memory engrams and restores apparently forgotten object memories in mice and humans. Society for Neuroscience 2017, 2017
6. Ishikawa, T., Ikegaya, Y. CA1 pyramidal neurons receive spatially clustered synaptic inputs during sharp waves/ripples EX vivo. Society for Neuroscience 2017, 2017
7. 野村洋、水田弘人、乗本裕明、増田文貴、三浦友樹、小島寛人、芦塚あおい、松河理子、Zohal Baraki、人羅(今村)菜津子、中山大輔、石川智愛、齋藤瞭毅、佐野大和、楠原洋之、南雅文、高橋英彦、池谷裕二、ヒスタミン H3 受容体逆アゴニストは、思い出せなくなった物体記憶を回復させる、第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2017 年
8. 石川智愛、池谷裕二、Sharp Wave 発生時における空間的に局在したシナプス入力、第

40回日本神経科学大会、2017年

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※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。