

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14939

研究課題名(和文) 前障 - 嗅内野の神経経路における情報伝達の実態解明

研究課題名(英文) Information transmission from the claustrum to the entorhinal cortex

研究代表者

北西 卓磨 (Kitanishi, Takuma)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90722116

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)：前障は、機能未知の脳の深部領域である。近年、研究代表者らは、前障が空間記憶に重要な内側嗅内野に強く投射し、記憶を調節することを発見した。そこで本研究は、前障 - 嗅内野の神経経路における情報伝達の実態を明らかにすることを目的とした。この目的のため、前障から嗅内野へと投射する神経細胞を光遺伝学的に操作しつつ、さらに、自由行動中に嗅内野の神経活動を計測する実験系を確立した。そして、嗅内野表層の格子細胞・頭方向細胞は、前障の光操作によらず安定した発火パターンを保つことを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで前障の機能解明が進んでいない理由として、前障は細長い形状をした脳領域であり、選択的な操作が難しかった点が挙げられる。本研究は、前障から特定の領域(嗅内野)へと投射する神経細胞を選択的に標識・光操作しつつ、さらに自由行動中の神経活動を計測する実験系を確立した。これは、前障の機能解明のために重要なステップであり、当該分野において意義深いと考える。前障が嗅内野の活動にどのように影響を与えるのか、その全容解明のために更なる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：The claustrum is a deep brain region whose function remains unknown. Recently, we found that the claustrum densely projects to the medial entorhinal cortex (MEC) and regulates contextual memory. In this study, we aimed to clarify the information transmission from the claustrum to the MEC. We established an optogenetic-electrophysiological system to monitor MEC activity in freely behaving animals while manipulating MEC-projecting claustral neurons with optogenetics. The data suggested that, irrespective of the optogenetic activation, grid cells and head direction cells in the superficial layer of MEC maintain a stable firing pattern.

研究分野：神経生理学

キーワード：前障 嗅内野 空間記憶 細胞外計測 光遺伝学 格子細胞 頭方向細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

前障は、ヒトをふくむすべての哺乳類に存在する脳領域であり、大脳皮質の全域と双方向の線維連絡を持つ。この特異な解剖学的特徴のため、前障は、さまざまな情報を統合する必要のある高次脳機能をになうと推察されてきた。しかし、これまで前障の具体的な機能は不明であった。機能の解明が遅れたひとつの理由はその構造にある。前障は、脳の深部に横たわる細長い紐状の形をもつ脳領域のため、周囲の脳領域を傷つけることなく前障を破壊・操作することが難しかったのである。この問題を解決するため、研究代表者らは、ウイルスベクターや光遺伝学を応用した領域選択的・経路選択的な手法により、前障の機能解明に取り組んだ (Kitanishi et al., J Neurosci, 2017)。そして、前障は、空間記憶に重要な内側嗅内野という脳領域にとりわけ密に投射することを発見した。さらに、内側嗅内野に投射する前障の神経細胞は、動物が新奇な空間を探索するさいに活性化し、文脈依存性の記憶に寄与することを見いだした。上記の研究代表者らの研究から、前障は、新奇空間に関連した何らかの情報を内側嗅内野へと伝達し、内側嗅内野の空間記憶における役割を制御すると考えられた。しかし、前障が具体的にどのような情報を発し、内側嗅内野の情報処理がどのように制御されるかという情報伝達の実態はいまだ不明だった。

## 2. 研究の目的

本研究は、前障 - 内側嗅内野の経路において光遺伝学を援用した神経活動計測をおこない、この経路が内側嗅内野の神経活動に与える影響を明らかにすることを目的とした (図 1)。具体的には、まず、自由行動中の動物における細胞外電気生理計測 (Kitanishi et al., Neuron, 2015) と経路選択的な光操作 (Kitanishi et al., J Neurosci, 2017) とを組み合わせた実験系を構築し、続いて、この実験系を用いて、前障 - 内側嗅内野経路の光操作による内側嗅内野の格子細胞や頭方向細胞の神経活動パターンへの影響を明らかにすることを目的とした。格子細胞と頭方向細胞は、環境のなかでの動物のいる場所と向いている方向に対してそれぞれ選択的に活動する神経細胞であり、空間認識や空間記憶に重要であると考えられている。

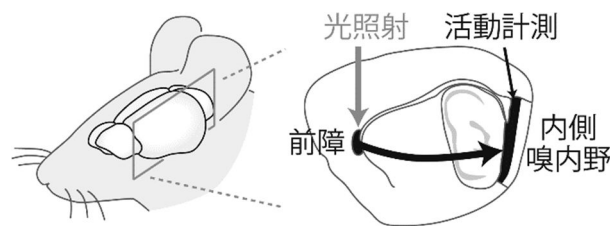


図 1 実験系の概略

## 3. 研究の方法

### (1) 光遺伝学と細胞外電気生理計測を組み合わせた実験系の確立

前障は、領域全体としてはほぼ全ての大脳皮質領域へと投射するが、個々の神経細胞レベルで見ると各皮質領域に投射する細胞集団は大まかに分かれている。そこで、内側嗅内野に投射する前障の神経細胞を選択的に標識・光操作するため、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの二重感染法 (Kitanishi et al., J Neurosci, 2017) を用いた。内側嗅内野に、軸索から逆行性に感染して Cre 組置酵素を発現する AAV6-Cre を注入し、前障には Cre 依存的に光感受性カチオンチャネルであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現する AAV-DIO-ChR2 を注入するとともに、光ファイバーを刺入した。さらに、内側嗅内野から多くの神経細胞の発火活動を高い時間解像度で計測するため、多点電極を内側嗅内野に慢性的に留置し、細胞外電気生理計測 (Kitanishi et al.,

Neuron, 2015) を行った。

#### (2) 前障 - 内側嗅内野経路が内側嗅内野の発火活動パターンに与える影響の解明

動物にオープンフィールドの中で探索行動をおこなわせ、埋め込んだ光ファイバーを介して内側嗅内野に投射する前障細胞を光刺激しつつ、内側嗅内野から神経活動を計測した。また、動物の頭部に LED を装着し、その位置と方向を頭上に配置したビデオカメラで取得して、神経活動と同期した状態で PC に取り込んだ。実験後のオフラインの解析では、まず、多点電極から得た信号を単一細胞の発火活動タイミングへと分離するスパイクソーティングをおこなった。続いて、動物の位置と頭方向に対する個々の神経細胞の発火率のマップを算出した。また、格子細胞や頭方向細胞としての発火パターンを定量的に評価するため、grid score や resultant vector length などの各種の指標を計算した。

### 4 . 研究成果

#### (1) 光遺伝学と細胞外電気生理計測を組み合わせた実験系の確立

まず、実験系の確立に必要な各種設備を整えた。具体的には、脳にウイルスベクターの注入や多点電極・光ファイバーの埋め込みをおこなう手術設備 (脳定位固定装置、手術用実体顕微鏡)、多点同時記録システム (多点記録電気生理装置、動物の行動を記録するビデオシステム、データ取込用ワークステーション、電極保持ドライブ、各種の行動課題装置)、および光遺伝学システム (ウイルス注入装置、レーザー光源) を構築した。これらの機器を用いて、多点電極を脳に慢性的に留置することで、動物が各種の行動課題をおこなうさいに 10 個程度の神経細胞の活動を同時に計測することができるようになった。続いて、AAV の 2 重感染法により、経路選択的な光操作を可能にした。具体的には、細胞体が前障に存在し、軸索を内側嗅内野に伸ばす投射細胞に ChR2 の導入をおこなった。前障の周囲の神経細胞には ChR2 の発現を認めず、導入は選択的であった。さらに、光ファイバーを介した前障への光刺激により、ChR2 発現細胞に最初期遺伝子 c-Fos が発現したことから、これらの細胞を光操作できることが分かった。これらの成果により、動物の行動と嗅内野の神経活動とを関連付けて調べるとともに、前障の光操作による嗅内野の神経活動への影響を評価するための実験系が整った。

#### (2) 前障 - 内側嗅内野経路が内側嗅内野の発火活動パターンに与える影響の解明

前障が、内側嗅内野における格子細胞・頭方向細胞などの発火パターンにあたる影響を明らかにするため、これらの細胞が多く分布する内側嗅内野の表層から細胞外計測をおこない、さらに、前障→嗅内野経路を光活性化した。動物がオープンフィールドにおいて空間探索行動をおこなう際の神経活動を解析したところ、光照射の有無によらず、格子細胞・頭方向細胞は安定した空間発火パターンを保ち、光操作による顕著な影響を受けなかった。こうした結果となった理由にはいくつかの可能性が考えられる。第一に、前障は細長い形状をした脳領域であり、光操作が前障の全域に至らなかった可能性が考えられる。この点は、複数本の光ファイバーを挿入したり、より光感受性の高いチャンネルロドプシン改変体を用いたりする方法により改善できる可能性がある。第二に、前障は内側嗅内野の深層にとりわけ強く投射することから、(表層ではなく) 深層の神経細胞のみに影響を与える可能性も考えられる。この点については、前障のシナプス入力を受ける嗅内野の神経細胞の種類を同定する必要があるとともに、表層 深層の神経活動を同時に計測するアプローチが有効だと考えられる。そこで、嗅内野の全層からの神経活動の計測が可能な 64-256 点のシリコンプローブ電極を用いた計測系を構築した。今後、上記の点を改善しつつ、前障が嗅内野の活動にどのような影響を与えるのか、その全容解明のために更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumoto Nobuyoshi, Kitanishi Takuma, Mizuseki Kenji	4. 巻 143
2. 論文標題 The subiculum: Unique hippocampal hub and more	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.08.002	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 Yamazaki Shuhei J., Ohara Kazuya, Ito Kentaro, Kokubun Nobuo, Kitanishi Takuma, Takaichi Daisuke, Yamada Yasufumi, Ikejiri Yosuke, Hiramatsu Fumie, Fujita Kosuke et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 STEFTR: A Hybrid Versatile Method for State Estimation and Feature Extraction From the Trajectory of Animal Behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	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） 10.3389/fnins.2019.00626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohara Shinya, Gianatti Michele, Ito Kazuki, Berndtsson Christin H., Doan Thanh P., Kitanishi Takuma, Mizuseki Kenji, Iijima Toshio, Tsutsui Ken-Ichiro, Witter Menno P.	4. 巻 13
2. 論文標題 Entorhinal Layer II Calbindin-Expressing Neurons Originate Widespread Telencephalic and Intrinsic Projections	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Systems Neuroscience	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） 10.3389/fnsys.2019.00054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwase Motosada, Kitanishi Takuma, Mizuseki Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell type, sub-region, and layer-specific speed representation in the hippocampal?entorhinal circuit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-020-58194-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岩瀬元貞、北西卓磨、水関健司
2. 発表標題 Speed representation in the hippocampus and entorhinal cortex
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 & 第96回日本生理学会合同大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 海馬の空間情報を生成・伝達する神経回路メカニズム
3. 学会等名 関西学院大学応用心理科学研究センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 Optogenetic identification of projection targets during large-scale recording
3. 学会等名 Japan-UK Neuroscience Symposium 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 Information outflow from the Subiculum: large-scale opto-electrophysiology
3. 学会等名 Memory trace/engram meeting（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬元貞、北西卓磨、水関健司
2. 発表標題 海馬、嗅内皮質における速度表現
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuma Kitanishi
2. 発表標題 Organization of the Claustrum-to-Entorhinal Cortical Connection in Mice
3. 学会等名 Society for Claustrum Research 4th Annual Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 海馬台からの情報出力：大規模細胞外記録と解剖学的解析
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト2017年度冬のシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北西卓磨、馬場良子、水関健司
2. 発表標題 Hippocampal information outflow via subiculum: in vivo recording and anatomical tracing
3. 学会等名 新学術領域「行動適応を担う脳神経回路の機能ソフト機構」領域会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 Inter-regional spatial information transfer during novel experiences
3. 学会等名 生理学研究所研究会「行動を制御する神経ネットワーク機能の解明に向けて」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 Organization of the claustrum-to-entorhinal cortical connection in mice
3. 学会等名 遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 前障の機能解明を目指して
3. 学会等名 生理学研究所研究会「認知神経科学の先端 意識の脳内メカニズム」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 前障 嗅内野経路の機能解明
3. 学会等名 第2回脳と心の研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 海馬から海馬外への情報出力経路の行動適応
3. 学会等名 新学術領域「行動適応を担う脳神経回路の機能シフト機構」領域会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北西卓磨
2. 発表標題 海馬の場所細胞を生成する神経演算原理の解明
3. 学会等名 新学術領域「生物ナビゲーションのシステム科学」領域会議
4. 発表年 2017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