

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01010

研究課題名(和文)空間文脈情報処理の神経回路機構

研究課題名(英文)Circuit mechanism of spatial context information processing

研究代表者

林 康紀 (Hayashi, Yasunori)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90466037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、空間への曝露を繰り返すと前帯状皮質に、ある空間内どこでも反応する空間文脈細胞を見出した。空間文脈細胞はまず場所細胞として出現した後、受容野が広がり、空間文脈細胞になった。海馬神経活動をDREADDを用いて抑制したところ、形成されなくなった。しかし一旦形成された空間文脈細胞は抑制されなかった。睡眠中の海馬活動を抑制したところ、同様に空間文脈細胞の形成が阻害された。これは長期記憶と性質を共にする。そこで、記憶痕跡細胞に発現するとされるc-fosプロモーターを用いてG-CaMPを発現させたところ、多くの細胞が記憶痕跡細胞となった。これらから空間文脈細胞は記憶痕跡を担っていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで記憶エンGRAM細胞という概念が知られていましたが、そういった細胞が一体どのような記憶情報をコードしているのかは明らかではありませんでした。わたしたちは記憶エンGRAM細胞が抽象概念化された場所情報を担っていることに気づきました。これは物事を記憶するとき内容を抽象化することとも一致しています。今後の研究では、アルツハイマー病モデル動物などでこの細胞がどうなっているかを観察していきたいと思っています。

研究成果の概要(英文)：We found spatial context cells in the anterior cingulate cortex that respond anywhere in a given space after repeated exposure to the space. Spatial context cells first appeared as place cells, then their receptive fields expanded to become spatial context cells. When hippocampal neural activity was suppressed using DREADD, they stopped forming. However, once established, hippocampal inactivation cannot eliminate spatial context cells. When hippocampal activity was suppressed during sleep, the formation of spatial context cells was similarly inhibited. This shares property with long-term memory. When G-CaMP was expressed using the c-fos promoter, which is known to be expressed in memory engram cells, larger proportion of cells became spatial context cells. These results suggest that spatial context cells are responsible for memory engram.

研究分野：神経科学

キーワード：記憶固定化 記憶痕跡 空間記憶 前帯状皮質 海馬

1. 研究開始当初の背景

情報の抽象化は脳での情報処理の重要な過程の一つである。網膜への光入力、一次視覚野の単純細胞、複雑細胞を経て、高次視覚野での物体や人の顔の認識に至る過程はよく研究されている。これは、多数の脳領野の階層並びに並列処理によるものである。

場所情報も同様に抽象化の過程を経ると考えられる。我々はある一定の範囲、例えば一つの部屋を(文脈)まとめたものとして認識する事ができる。動物でも恐怖刺激条件づけを特定空間、例えば箱で行うと次に同じ箱に入ると恐怖反応を示すが、ショックが与えられた同じ位置に限らず、その箱全体で恐怖反応を示す。つまり箱の空間を1つの文脈として抽象化していると考えられる。これまで位置情報の処理に関し、距離と方角と情報を担う嗅内野格子細胞と空間の中での絶対的な位置情報を担う海馬場所細胞が知られてきた。しかし、これらの細胞は箱の特定の位置で発火するため、それだけでは文脈情報は説明がつかない。格子細胞や場所細胞から情報を得て、抽象化する細胞があると予想される。しかしそれに対応する神経活動はいかなるものか、またそれを形成する神経回路機構が何かは明らかではなかった。そこで我々は、嗅内皮質や海馬の下流の領野に部屋や箱といった抽象化した空間に対して反応する神経細胞があるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

前帯状皮質は、大脳内側面に位置し帯状皮質を介して海馬を含む大脳辺縁系からの入力を受ける一方、広範な脳領域に出力する。特に遠隔記憶の想起に伴い再活性化が起こる領域として知られ、当初海馬で形成された記憶が移行する部位として考えられてきた。そのため、前帯状皮質でいかなる神経活動が記録されるかは興味深い。そこで我々は、マイクロプリズムに頭部装着型小型蛍光顕微鏡を組み合わせ、脳の半球間にあり背側からアクセスが困難である前帯状皮質の神経活動の観察に成功した(図1)。その結果、前帯状皮質神経細胞に、特定の位置ではなく、その空間であればどこに動物がいても反応する細胞があることを示唆する結果を得て「空間文脈細胞」と名付けた(図2中。図2左の海馬場所細胞と比較のこと)。当日は観察されず、空間曝露を数日繰り返していく事で初めて検出された。発火には特異性があり、他の空間では発火しない(図2右)。空間文脈細胞は抽象化された場所概念の記憶を担う細胞とも考えられ、その性質と形成過程には大いなる興味を持たれた。本研究では、空間文脈細胞の性質を明らかにし、海馬と前帯状皮質間の情報交換によりどのように空間文脈細胞が形成されていくのかを検討した。このためマイクロプリズムに頭部装着型小型蛍光顕微鏡等の光学的手法と G-CaMP を用いた Ca<sup>2+</sup>イメージングを組み合わせ、以下の specific aim に取り組んだ。

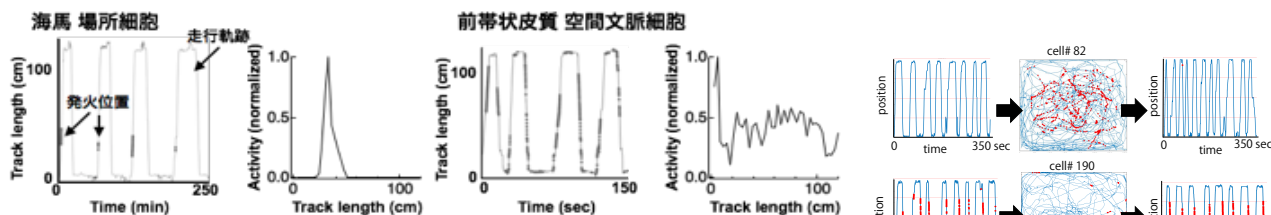
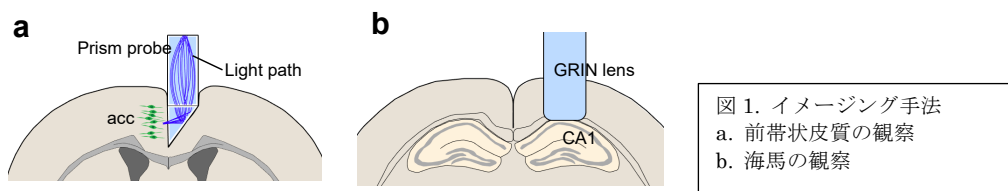


図2. 海馬場所細胞からの入力による大脳皮質での空間文脈細胞の形成  
左・中：場所細胞(左)は走行路の特定の位置で発火するのに対し、前帯状皮質の空間文脈細胞(中)は空間全体で発火する。  
右：空間文脈細胞の発火は場所特異的であり、他の場所では発火しない。

S.A.1 空間文脈細胞は存在するか

空間への初回暴露から数週間に亘り経時的に前帯状皮質で神経活動を観察し、場所特異性、形成過程、神経活動の詳細と安定性を明らかにし、空間文脈細胞としての性質を持っているかを確認する。また、記憶痕跡細胞との関連も明らかにする。

#### S.A.2 海馬リプレーによる前帯状皮質空間文脈細胞の形成過程の解明

海馬場所細胞は動物が静止しているとき、ある一定の空間に対応する神経細胞が数 100 msec 以内にほぼ同時に発火する。これはリプレーとして知られており、記憶形成への関与が考えられている。これにより複数の場所細胞が同時に発火することが空間文脈細胞形成に必要なかどうかを検討する。

#### S.A.3 空間文脈細胞の形成のシナプス過程

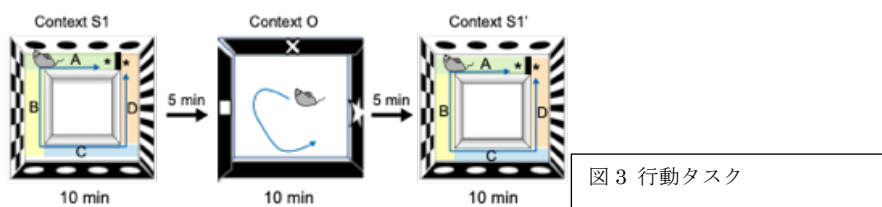
電気生理学的に、空間を学習した個体では前帯状皮質や海馬シナプスで長期増強現象 LTP が起こっているかを検出する。また独自開発した光遺伝学的手法により、一旦成立したシナプス可塑性を解除することにより、いつまでその可塑的変化が必要かを検出する。

#### S.A.4 空間文脈細胞の出力過程

前帯状皮質からの様々な投射先に逆行性ウイルスで G-CaMP を発現させ、前帯状皮質の空間文脈細胞が検出することで空間文脈情報がどの領域に投射していくかを検出する。

### 3. 研究の方法

行動：50 cm x 50 cm の正方形の走行路の 1 隅に壁を設けたもの (context S) と同じ大きさの open arena (context O) を用いた。Context S の場合は、マウスは起点、終点 (図 3 で \* にて示す) にくると報酬 (餌) をもらえる。Open arena の場合はランダムに餌を投げ入れた。試行は S→O→S の順で、それぞれ 10 分間走行させ、間に 5 分間の時間を置いた。



イメージング：興奮性細胞特異的な CaMKII  $\alpha$  プロモーターの下流で Cre を発現するマウスに AAV-flox-G-CaMP6F を感染させることで GCaMP を発現させた。また記憶痕跡細胞に G-CaMP を発現する目的には、c-fos プロモーターの下流で tTA を発現するマウスに AAV-TRE-G-CaMP を感染させた。前帯状皮質は正中線上、2つの半球が接した部位にあるため、背側からの直接の観察は難しい。そのため、本実験では、GRIN レンズの先端に直角プリズムを付けて横方向を観察した (図 1)。

LTP の検出：空間暴露後、切片を作成し、ピクロトキシン (GABA<sub>A</sub> 受容体阻害剤) 存在下で全細胞記録を行った。

逆行性トレーシング：軸索で感染し、逆行性に細胞体で発現する retrograde AAV を用いた。まず、前帯状皮質からの投射先を先行文献や Allen Brain Atlas 確認し、その上で主な投射先として dorsomedial striatum, retrosplenial cortex granular region, retrosplenial cortex disgranular region を選定し、その領域に retrograde AAV を注入した。本研究では予備実験として、tdTomato あるいは GFP をコードするウイルスを注入し組織切片を作成し、共焦点顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

#### S.A.1 空間文脈細胞は存在するか

本研究では、まず空間文脈細胞の特性と形成機構に関する研究を行った。海馬と同様に前帯状皮質にも場所細胞が存在するが、海馬の場合ほとんど (~90%) が 1つの場所受容野を持つが、前帯状皮質では 50%程度が複数の場所受容野を有していた (図 4)。空間文脈細胞の形成過程を追ったところ、多くがまず場所細胞として出現した後、受容野が広がり、その結果空間文脈細胞になった (図 5)。そのため、空間文脈細胞は場所細胞の特殊形とも考えられる。また空間文脈細胞は空間暴露を繰り返すと増加する。しかしそれは空間特異的で、新規空間では増加していな

い。また2つの空間での曝露を交互に繰り返していくと、一つの空間で空間場所細胞になると、他の細胞では場所情報を持たない傾向がある（図6）。

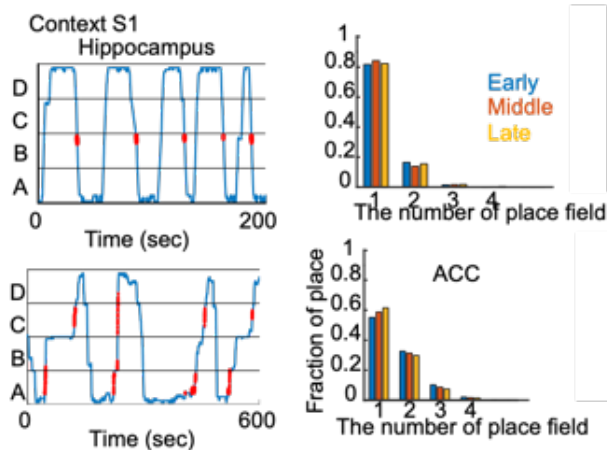


図4. 海馬と前帯状皮質の場所細胞の受容野の数  
左: 走行パターン。赤い点が1個の細胞の発火場所を示す。上が海馬、下が前帯状皮質  
右: 場所受容野の数。多くの海馬場所細胞は単一の場所受容野を持つが、前帯状皮質の場合は複数持つものが稀ではない。

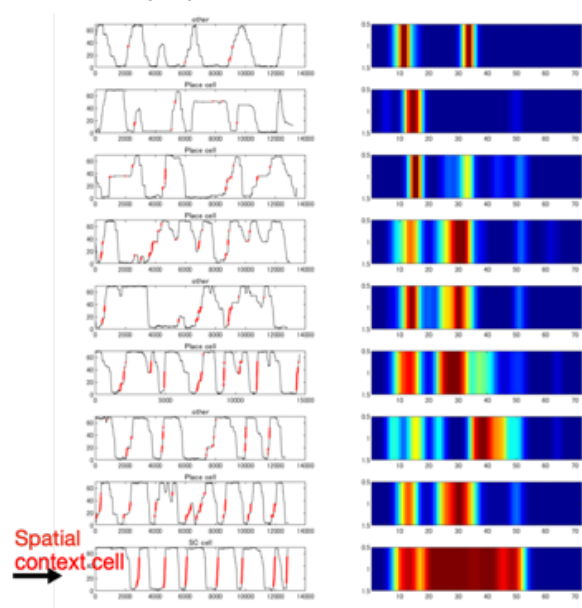


図5. 場所受容野の拡大と融合による空間文脈細胞の形成  
前帯状皮質の一つの細胞の場所受容野を9日間観察した結果。  
左: 走行パターン。起点0、終点72を往復する。  
右: 同じ細胞の発火ヒートマップ。  
この細胞は9日目に空間文脈細胞と判定された。元々2つ場所受容野を持ち、それが拡大融合して一つの大きな場所受容野を持つようになった。

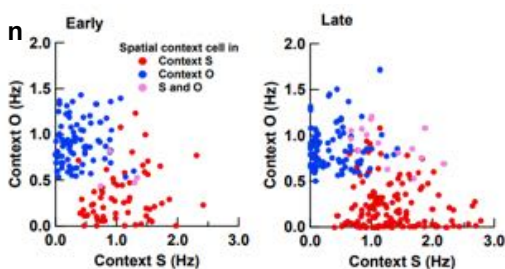


図6. 前帯状皮質空間文脈細胞の発火特異性  
いずれかの空間で空間文脈細胞と判定された細胞が、もう一つの空間でどの程度発火するかを示す。初期には(左) 大多数の細胞がもう一つの空間でも発火するが、後期にはもう一つの空間での発火は抑制され、発火特異性が向上している。

### S.A.2 海馬リプレーによる前帯状皮質空間文脈細胞の形成過程の解明

海馬ではリプレーが起り、それが前帯状皮質に収斂し、その細胞が空間文脈細胞になった可能性を考えた。そこで、まず海馬神経活動を DREADD を用いて抑制したところ、空間文脈細胞は形成されなくなった。ところが興味深いことに、空間曝露を繰り返すことにより空間文脈細胞を一旦形成させると、DREADD により海馬活動を抑制しても空間文脈細胞は抑制されなかった。そこで睡眠中の海馬活動を抑制したところ、同様に空間文脈細胞の形成が阻害された。これは長期記憶と性質を共にする。そこで、記憶痕跡細胞に発現するとされる c-fos プロモーターを用いて G-CaMP を発現させたところ、多くの細胞が記憶痕跡細胞となった。このことは空間文脈細胞は記憶痕跡を担っていると考えられる。これは記憶するのに概念が抽象化される事実ともよく一致している。

### S.A.3 空間文脈細胞の形成のシナプス過程

AMPA 受容体反応/NMDA 受容体反応の比を取ることで、LTP を起こしたシナプスを検出する

ことができる。これはこれまで感覚皮質や海馬で行われてきた。そこで前帯状皮質で学習成立後 AMPA/NMDA 比を計測することで、LTP を起こしているシナプスが検出できると考えた。まず記憶成績が定量しやすい inhibitory avoidance test を用いたが、有意な変化は観察されなかった。実際に memory engram に関与する細胞が少ないのではないかと考え、神経活動依存性遺伝子産物 Arc のプロモーターの下流に蛍光タンパク質 dVenus を発現するマウスを用いることを計画している。

#### S.A.4 空間文脈細胞の出力過程

空間文脈細胞の出力先を調べるため、文献ならびに Allen Brain Atlas のデータベースから入出力をまとめた (図 7)。ACC は多様な脳領域と双方向性の結合があるが、一つの細胞が複数の領域に投射しているのか、それとも別な細胞なのかは判っていなかった。そこで本実験では retrosplenial cortex と dorsomedial striatum に二種類の retrograde AAV を注入した、前帯状皮質の切片を確認したところ、この両者の間にはほとんどオーバーラップはなかった (図 8)。つまり、retrosplenial cortex へや dorsomedial striatum 同じ細胞が collateral を伸ばしているのではなく、異なった細胞集団であることがわかった。今後その他の領域に対しても同様の解析を行う他、G-CaMP を発現し、空間文脈細胞となる細胞がどのような集団かを解明していく。

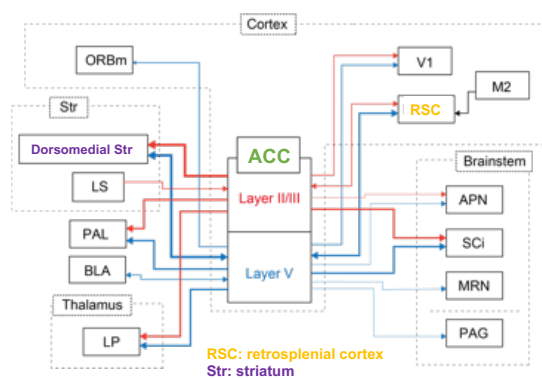


図 7. 前帯状皮質の入出力  
文献並びに Allen Brain Atlas による。

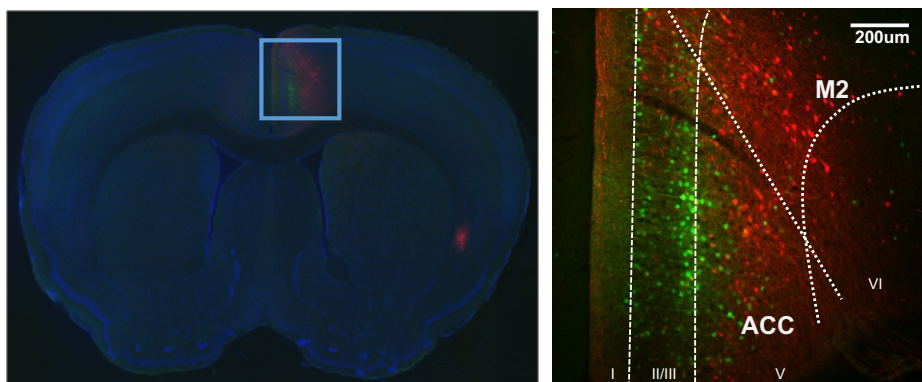


図 8. Dorsomedial striatum に GFP、retrosplenial cortex に tdTomato を発現する retrograde AAV を注入した例。左の青い box を拡大したのが右。Dorsomedial striatum からの入力は大抵が II/III 層にいく一方、retrosplenial cortex からの入力は V 層に多い。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Bota Ayaka, Goto Akihiro, Tsukamoto Suzune, Schmidt Alexander, Wolf Fred, Luchetti Alessandro, Nakai Junichi, Hirase Hajime, Hayashi Yasunori	4. 巻 -
2. 論文標題 Shared and unique properties of place cells in anterior cingulate cortex and hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2021.03.29.437441	査読の有無 無
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 Cid Elena, Marquez-Galera Angel, Valero Manuel, Gal Beatriz, Medeiros Daniel C., Navarr?n Carmen M., Ballesteros-Esteban Luis, Reig-Viader Rita, Morales Aixa V., Fernandez-Lamo Ivan, Gomez-Dominguez Daniel, Sato Masaaki, Hayashi Yasunori, Bay?s ?lex, Barco Angel, L?pez-Atalaya Jose P, de la Prida Liset M	4. 巻 -
2. 論文標題 Sublayer- and cell-type-specific neurodegenerative transcriptional trajectories in hippocampal sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2021.02.03.429560	査読の有無 無
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 Masaaki Sato, Kotaro Mizuta, Tanvir Islam, Masako Kawano, Yukiko Sekine, Takashi Takekawa, Daniel Gomez-Dominguez, Alexander Schmidt, Fred Wolf, Karam Kim, Hiroshi Yamakawa,, Masamichi Ohkura, Min Goo Lee, Tomoki Fukai, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Distinct mechanisms of over-representation of landmarks and rewards in the hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Report	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 Kojima Hiroto, Rosendale Morgane, Sugiyama Yui, Hayashi Mariko, Horiguchi Yoko, Yoshihara Toru, Ikegaya Yuji, Saneyoshi Takeo, Hayashi Yasunori	4. 巻 166
2. 論文標題 The role of CaMKII-Tiam1 complex on learning and memory	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Learning and Memory	6. 最初と最後の頁 107070 ~ 107070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nlm.2019.107070	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 Goto Akihiro, Bota Ayaka, Miya Ken, Wang Jingbo, Tsukamoto Suzune, Jiang Xinzhi, Hirai Daichi, Murayama Masanori, Matsuda Tomoki, McHugh Thomas J., Nagai Takeharu, Hayashi Yasunori	4. 巻 374
2. 論文標題 Stepwise synaptic plasticity events drive the early phase of memory consolidation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 857 ~ 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abj9195	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 Takamura Risa, Mizuta Kotaro, Sekine Yukiko, Islam Tanvir, Saito Takashi, Sato Masaaki, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi, Ohshima Toshio, Saido Takaomi C., Hayashi Yasunori	4. 巻 41
2. 論文標題 Modality-Specific Impairment of Hippocampal CA1 Neurons of Alzheimer 's Disease Model Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5315 ~ 5329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0208-21.2021	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 Mizuta Kotaro, Nakai Junichi, Hayashi Yasunori, Sato Masaaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Multiple coordinated cellular dynamics mediate CA1 map plasticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hippocampus	6. 最初と最後の頁 235 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hipo.23300	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 後藤明弘、林 康紀	4. 巻 62
2. 論文標題 光によるシナプス可塑性制御で明らかになった記憶固定化機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物物理	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp>

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

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