

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06917

研究課題名（和文）記憶の固定化を支える海馬出力路 嗅内皮質V層の回路構造を最新技術で探る

研究課題名（英文）Neural basis of memory consolidation: Organization of hippocampal-output circuit mediated by entorhinal LV neurons

研究代表者

大原 慎也 (Ohara, Shinya)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10570038

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）：本研究では、記憶の固定化を担う回路として、内側嗅内皮質（MEC）と外側嗅内皮質（LEC）を介した海馬から大脳新皮質への海馬出力路に着目し、その回路構成の解明を目指した。神経回路トレーシング法と光遺伝学を用いた神経回路マッピング法により、嗅内皮質層を中心とする海馬からの入力路、局所回路、及び皮質への出力路の構造を調べた。一連の研究により、これまでMECとLECで類似するとされてきた回路構成が2領域間で大きく異なり、海馬から大脳新皮質への情報伝達を中継する回路がMECよりLECにおいて発達していることが明らかになった。この結果は、LECが記憶固定化に重要な役割を果たすことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MECよりLECが海馬出力路を効率的に中継することを示した本研究成果は、MECが記憶固定化に深く関わるとしたこれまでの考えに反する興味深い発見である。この解剖学データを基に、LECにおける記憶固定化のメカニズム解明を目指す様々な行動学的、計算論的研究が展開されることが期待される。また、LECがアルツハイマー病患者において最初に病変が見られる領域であることから、アルツハイマー病の病態メカニズムの解明にも繋がると考えられる。さらに、LECとMECの回路構成の違いは、「LECとMECニューロンの情報表現の違いを生む神経機構」、及び「MECグリッド細胞を生む神経機構」の理解にも貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：The entorhinal cortex (EC) constitutes the major gateway between the hippocampus and the neocortex, and the hippocampal output circuit via EC is considered to play an important role in transferring hippocampal information to the neocortex for long-term memory formation. The aim of this study is to identify the organization of this hippocampal output circuit via the lateral and medial EC (LEC and MEC, respectively). By using neural tracing techniques and channelrhodopsin-assisted circuit mapping method, we examined the organization of the (1) hippocampal-entorhinal circuit, (2) entorhinal local circuit, and (3) entorhinal output circuit. Contrary to previous anatomical reports, our results showed that the hippocampal-cortical output circuits differ between MEC and LEC, and the circuit is more prominent in LEC than in MEC. Our findings imply a potential difference in how LEC and MEC mediate episodic systems consolidation.

研究分野：システム神経科学

キーワード：内側嗅内皮質 外側嗅内皮質 海馬出力路 V層局所回路 齧歯類

1. 研究開始当初の背景

エピソード記憶の形成には、海馬と共に嗅内皮質が重要な役割を果たす。嗅内皮質は海馬と大脳皮質を繋ぐ中継領域であり、内側嗅内皮質 (MEC) と外側嗅内皮質 (LEC) から構成される (図 1A)。この MEC と LEC を介して空間情報と非空間情報がそれぞれ大脳皮質から海馬へ伝達される。海馬で統合・処理された情報が再び MEC と LEC を介して大脳皮質へと送り出されることで、記憶が固定化されると考えられている。この海馬から大脳皮質への情報伝達を担う海馬出力路を構成するのが嗅内皮質層である。層は結合関係の異なる 2 つの層、a 層と b 層から成り、b 層は海馬からの入力を受け一方、a 層は皮質・皮質下領域に投射する (Sürmeli et al., 2015)。また、研究代表者らの研究から、b 層ニューロンが局所回路を形成し、a 層、及び / 層ニューロンに inputs することで「海馬-皮質出力路」、及び「海馬-嗅内皮質ループ回路」を形成することが示されている (Ohara et al., 2018、図 1B)。

これまでの解剖学的研究から、層が形成する海馬出力路の回路構成は、MEC と LEC で類似しているとされてきた。しかし、電気生理学的手法を用いた研究は、海馬からの出力が LEC ではなく MEC に送られることを示唆している (Biella and de Curtis, 2000)。また、記憶の固定化に重要と考えられているリップル波も海馬から MEC へ伝達され (Chrobak and Buzsáki, 1996)、さらに MEC から内側前頭皮質への投射が記憶の固定化に関与することも報告されている (Kitamura et al., 2017)。

『何故 LEC ではなく MEC を介する海馬出力路が記憶の固定化に重要なのか』、現在の解剖学的知見からは説明できない。LEC と MEC が形成する海馬出力路の回路構成の違いを明らかにすることで、『どのような神経基盤が記憶の固定化に求められるのか』、その問いに答える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MEC と LEC が形成する海馬出力路の回路構成の違いを明らかにすることであり、これにより、記憶の固定化を支える MEC 特有の神経基盤を同定する。図 1B に示すように、海馬出力回路は 3 つの要素、すなわち海馬から嗅内皮質 b 層への投射、b 層細胞の局所回路、及び a 層細胞から大脳皮質への投射、から構成される。本研究では、各構成要素における MEC と LEC の回路構造の違いについて、最先端の手法を駆使して解析する。

3. 研究の方法

(1) b 層細胞が形成する局所回路の解析 (Ohara et al., eLife, 2021)

MEC と LEC の b 層細胞が形成する局所回路の構造を調べるため、チャンネルロドプシン支援回路マッピング法 (CRACM) を用いる。まず b 層特異的なトランスジェニックマウス (MEC-13-53G) に改変チャンネルロドプシンを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (AAV-TRE-oChIEF) を接種して b 層細胞選択的に oChIEF を発現させる。次に、脳スライス標本において b 層細胞の軸索を光刺激し、そのときの他の層 (a,) の細胞の神経活動をパッチクランプ法により計測する。計測した応答の違いを各層、及び MEC と LEC 間で比較する。

(2) MEC/LEC から皮質・皮質下領域への投射解析 (Ohara et al., Front Syst Neurosc, 2019)

嗅内皮質から皮質・皮質下領域への投射を同定するため、逆行性トレーサー (Fluorogold) を様々な脳領域 (皮質領域: 内側前頭皮質、前頭眼窩皮質、島皮質、梨状皮質、嗅周囲皮質、脳梁膨大後部皮質、皮質下領域: 扁桃核、側坐核、外側中核野、視床結合核) に注入し、MEC と LEC における逆行性標識細胞の分布を調べた。

(3) 海馬から MEC/LEC への入力解析 (Ohara et al., bioRxiv, 2022)

海馬から嗅内皮質の入力を調べるため、順行性トレーサー (PHA-L, BDA) を海馬 CA1 領域、または海馬台に注入し、標識軸索の分布を MEC と LEC の層で調べた。

(4) サルにおける嗅内皮質層の構造解析 (Ohara et al., Front Neural Circ, 2021)

b 層細胞に特異的な分子マーカー (PCP4) と a 層細胞を標識する逆行性トレーシング法を用いて、サル嗅内皮質層の構造を調べた。

4. 研究成果

(1) b 層細胞が形成する局所回路の解析 (Ohara et al., eLife, 2021)

b 層特異的なトランスジェニックマウスを用いて MEC/LEC の b 層ニューロンを選択的に標識した結果、2 領域間で嗅内皮質内の軸索分布の違いが見られた (図 2A)。LEC では a 層に標識軸索が分布する一方、MEC の a 層では標識軸索がほとんど確認されなかったことから、b-a 間の機能的結合が LEC にのみ存在すると予想された。次に、この予想が正しいのか、脳スライ

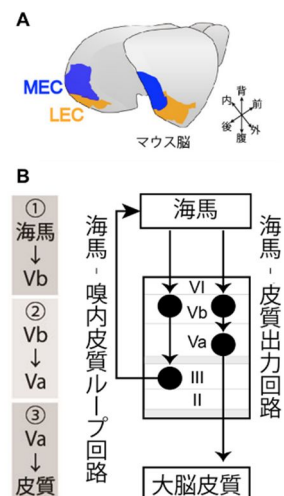


図 1. マウスの嗅内皮質 (A)、嗅内皮質 V 層を中心とした海馬出力回路 (B)。

ス標本における CRACM 法を用いて確かめた (図 2B)。 b 層ニューロンを光刺激した結果、LEC のほぼ全ての a 層ニューロンにおいて応答が確認された一方、MEC の a 層では一部のニューロンでしか応答は観察されなかった (図 2C,D)。また、応答した MEC a 層ニューロンの EPSP の大きさも LEC a 層ニューロンの EPSP より有意に小さかった (図 2C,E)。これら結果は、嗅内皮質の局所回路が MEC と LEC で異なり、 b- a 路が MEC より LEC において発達していることを示している。つまり、背側海馬で処理された情報は MEC でなく、LEC を介して効率的に皮質領域に送られると考えられる。この結果は、MEC を介する海馬出力路が記憶の固定化に関わるとしていたこれまでの考えに反する興味深い解剖学的発見である。

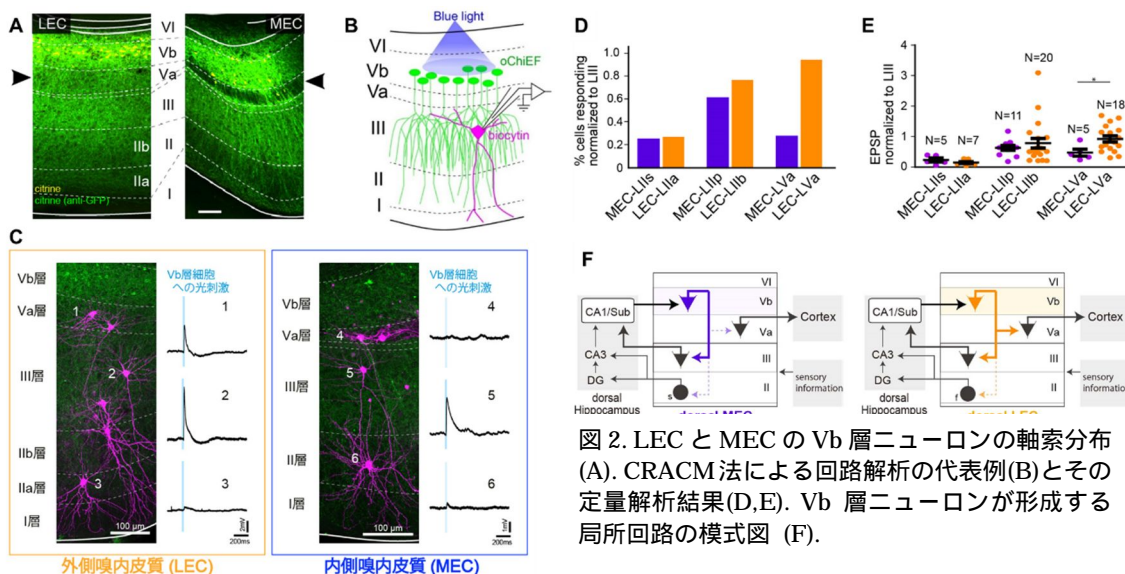


図 2. LEC と MEC の Vb 層ニューロンの軸索分布 (A)。CRACM 法による回路解析の代表例 (B) とその定量解析結果 (D, E)。Vb 層ニューロンが形成する局所回路の模式図 (F)。

(2) MEC/LEC から皮質・皮質下領域への投射解析 (Ohara et al., Front Syst Neurosc, 2019)
 逆行性トレーサーを皮質・皮質下領域に注入した結果、過去の解剖学的知見と同様、多数の逆行性細胞が LEC と MEC の a 層で確認された。また、梨状皮質、腹内側前頭皮質、扁桃体、嗅周囲皮質へのトレーサー注入では、LEC b 層のカルビンジン陽性ニューロンにおいて逆行性標識が確認された。一方、MEC b 層では逆行性標識細胞がほとんど確認されなかった。上記実験 (1) の局所回路解析の実験から、LEC b 層ニューロンが b 層からの入力を受けることが示された (図 2D, E)。これらの結果は、LEC b 層のカルビンジン陽性ニューロンが海馬出力回路の一部を構成することを示唆している。

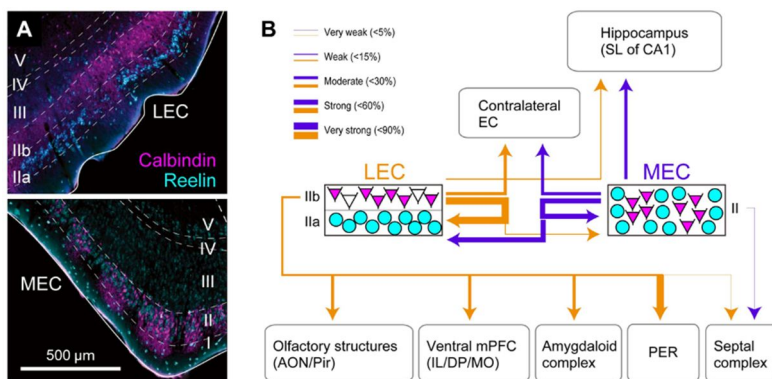


図 3. LEC と MEC の II 層カルビンジン陽性ニューロンの分布 (A) とその投射回路の模式図 (B)。

(3) 海馬から MEC/LEC への入力解析 (Ohara et al., bioRxiv, 2022)

過去の解剖学的研究と同様、海馬から嗅内皮質への投射様式は海馬の横断軸に沿って異なり、海馬 CA1 近位部/海馬台遠位部への順行性トレーサーの注入では MEC に標識軸索が分布する一方 (図 4A-C)、CA1 遠位部/海馬台近位部への注入では標識軸索は主に LEC に分布していた (図 4D-F)。また、海馬軸索の層分布は MEC と LEC で異なり、MEC では a 層ではなく b 層において特異的に確認されたのに対し、LEC では b 層に加えて a 層でも密に観察された。a 層が嗅内皮質の出力層であることから、この結果は、LEC が海馬からの情報を効率的に大脳新皮質へと送ることを示唆している。

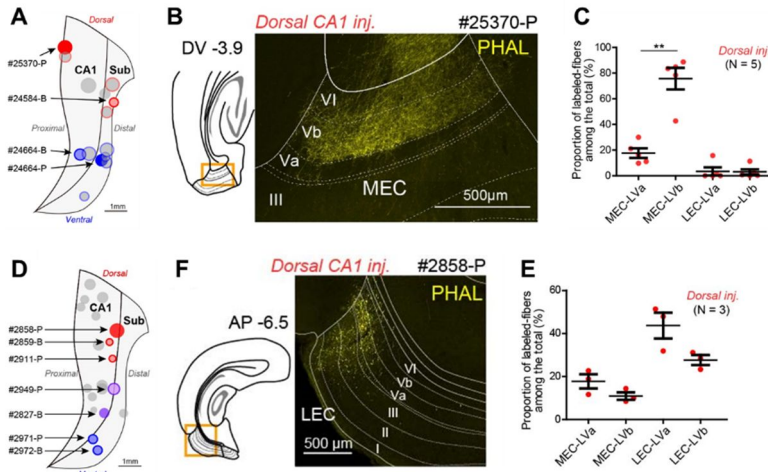
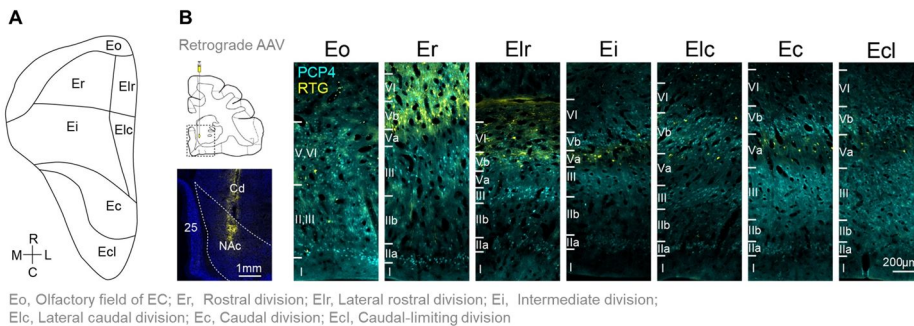


図 4. 海馬 CA1 近位部/海馬台遠位部(A-C)、または CA1 遠位部/海馬台近位部(D-E)に順行性トレーサーを注入したサンプルの嗅内皮質における標識軸索の分布。

(4) サルにおける嗅内皮質 層の構造解析 (Ohara et al., Front Neural Circ, 2021)

細胞種特異的な分子マーカーと逆行性トレーシング法を用いてサルの嗅内皮質の層構造を調べた(図5)。齧歯類の MEC に相当するサル嗅内皮質後部 (Eic, Ec, Ecl) では、PCP4 陽性ニューロンが Vb 層に分布する一方、側坐核投射ニューロンが Va 層に局在していた。一方、LEC に相当するサル嗅内皮質前部 (Eo, Er, Elr) では、これらのニューロンが層で混在しており、齧歯類とは構造が異なることが明らかとなった。この結果は、LEC が進化と共に複雑性を増しており、霊長類のエピソード記憶において重要な役割を担う可能性を示唆している。



Eo, Olfactory field of EC; Er, Rostral division; Elr, Lateral rostral division; Ei, Intermediate division; Eic, Lateral caudal division; Ec, Caudal division; Ecl, Caudal-limiting division

図 5. サル嗅内皮質の展開図(A), PCP4 陽性細胞 (シアン) と側坐核投射細胞 (黄) の分布(B)。

これまで LEC と MEC の回路構成は似ていると考えられていたが、本研究の細胞種レベルでの回路解析により、2 領域間の海馬出力回路に以下 3 つの違いがあることが明らかになった。

b- a 回路が MEC より LEC において顕著である。

LEC の b 層カルビンジン陽性ニューロンが皮質・皮質下領域に投射する。

背側海馬は MEC では b 層に入力する一方、LEC では a と b 層に入力する。

これらの結果は、海馬出力路が MEC より LEC に発達していること、つまり、LEC が記憶の固定化において重要であることを示唆している。記憶固定化については、これまで MEC を中心に研究が進められており、LEC における研究は大きく遅れている。本研究で明らかにした解剖学データを基に、LEC における記憶固定化のメカニズム解明を目指す様々な行動学的、計算論的研究が展開されると期待される。また、LEC がアルツハイマー型認知症の患者において最初に病変が見られる領域であることから、本研究成果はアルツハイマー型認知症の病態メカニズムの解明にも繋がることと考えられる。さらに、LEC と MEC の回路構成の違いは、「LEC と MEC ニューロンの情報表現の違いを生む神経機構」、及び「MEC 特有のグリッド細胞を生む神経機構」の理解にも貢献することが期待される。

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 7件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ohara Shinya, Rannap Mart, Tsutsui Ken-ichiro, Draguhn Andreas, Egorov Alexei V., Witter Menno P.	4. 巻 -
2. 論文標題 Hippocampal-medial entorhinal circuit is differently organized along the dorsoventral axis in rodents	5. 発行年 2022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） 10.1101/2022.05.30.493979	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 Ohara Shinya, Yoshino Rintaro, Kimura Kei, Kawamura Taichi, Tanabe Soshi, Zheng Andi, Nakamura Shinya, Inoue Ken-ichi, Takada Masahiko, Tsutsui Ken-ichiro, Witter Menno P.	4. 巻 15
2. 論文標題 Laminar Organization of the Entorhinal Cortex in Macaque Monkeys Based on Cell-Type-Specific Markers and Connectivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	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/fncir.2021.790116	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 Soma Shogo, Ohara Shinya, Nonomura Satoshi, Yoshida Junichi, Suematsu Naofumi, Pastalkova Eva, Sakai Yutaka, Tsutsui Ken-ichiro, Isomura Yoshikazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Hippocampal CA1 represents action and reward events instantly compared to the superficial and deep layers of the lateral entorhinal cortex	5. 発行年 2022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） 10.1101/2022.03.31.485431	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 Ohara Shinya, Blankvoort Stefan, Nair Rajeevkumar Raveendran, Nigro Maximiliano J, Nilssen Eirik S, Kentros Cliff, Witter Menno P	4. 巻 10
2. 論文標題 Local projections of layer Vb-to-Va are more prominent in lateral than in medial entorhinal cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	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） 10.7554/eLife.67262	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 Ohara Shinya, Gianatti Michele, Itou 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 54
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 Nilssen Eirik S., Doan Thanh P., Nigro Maximiliano J., Ohara Shinya, Witter Menno P.	4. 巻 29
2. 論文標題 Neurons and networks in the entorhinal cortex: A reappraisal of the lateral and medial entorhinal subdivisions mediating parallel cortical pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hippocampus	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hipo.23145	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 該当する

1. 著者名 Doan Thanh P., Lagartos-Donate Maria J., Nilssen Eirik S., Ohara Shinya, Witter Menno P.	4. 巻 29
2. 論文標題 Convergent Projections from Perirhinal and Postrhinal Cortices Suggest a Multisensory Nature of Lateral, but Not Medial, Entorhinal Cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 617 ~ 627.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.005	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 Inagaki Shigenori, Agetsuma Masakazu, Ohara Shinya, Iijima Toshio, Yokota Hideo, Wazawa Tetsuichi, Arai Yoshiyuki, Nagai Takeharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Imaging local brain activity of multiple freely moving mice sharing the same environment	5. 発行年 2019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/s41598-019-43897-x	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinya Ohara, Rintaro Yoshino, Kei Kimura, Taichi Kawamura, Soshi Tanabe, Andi Zheng, Shinya Nakamura, Ken-ichi Inoue, Masahiko Takada, Ken-Ichiro Tsutsui, Menno P. Witter
2. 発表標題 Organization of the entorhinal cortex layer V in macaque monkeys based on cell-type-specific marker and connectivity
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rintaro Yoshino, Kei Kimura, Soshi Tanabe, Andi Zheng, Shinya Nakamura, Shinya Ohara, Ken-Ichi Inoue, Masahiko Takada, Ken-Ichiro Tsutsui
2. 発表標題 Subregions of anterior cingulate cortex differentially project to basomedial and basolateral nuclei of amygdala in macaque monkeys
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shogo Soma, Shinya Ohara, Satoshi Nonomura, Junichi Yoshida, Naofumi Suematsu, Yutaka Sakai, Ken-Ichiro Tsutsui, Yoshikazu Isomura
2. 発表標題 Different timing of behavioral event representation in the hippocampus and entorhinal cortex
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Paola Aleman-Andrade, Christine L. Marchena, Shinya Ohara, Ken-Ichiro Tsutsui
2. 発表標題 Disentangling the parallel pathways from the ventromedial frontal cortex to the amygdala: An anterograde tracing study in rodents
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大原 慎也, Menno P. Witter, 筒井 健一郎
2. 発表標題 背腹側軸に沿った海馬-内側嗅内皮質路の解剖学的差異
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. OHARA, R. R. NAIR, S. BLANKVOORT, C. KENTROS, M. P. WITTER
2. 発表標題 外側嗅内皮質と内側嗅内皮質Vb層が形成する局所回路の構造的差異
3. 学会等名 第42回 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. OHARA, R. R. NAIR, S. BLANKVOORT, C. KENTROS, M. P. WITTER
2. 発表標題 Differences in intrinsic connectivity patterns of layer Vb neurons between the lateral and medial entorhinal cortex
3. 学会等名 Society of Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. OHARA
2. 発表標題 Local circuits of layer Vb neurons in the lateral and medial entorhinal cortex
3. 学会等名 SPRING HIPPOCAMPAL RESEARCH CONFERENCE (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

海馬と大脳新皮質を繋ぐ記憶ネットワークの解明～外側嗅内皮質が長期記憶の形成に重要であることを示唆～
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/03/press20210331-03-cortex.html>

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			
ノルウェー	Kavli Institute for Systems Neuroscience			
ドイツ	Heidelberg University			