

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22583

研究課題名（和文）海馬新CA2領域における興奮性神経細胞の多様性解明と集団性探索

研究課題名（英文）Elucidating diversity of excitatory neurons and neural ensembles in new hippocampal CA2 region

研究代表者

小原 圭吾（KOHARA, Keigo）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60740917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：海馬新CA2は、海馬において最も近年になり出現した領域である（Kohara et al. Nat. Neurosci. 2014）。反発分離性遺伝子導入技術「BATTLE」、新CA2領域特異的Creノックインマウス、Cre依存性AAV等を用いて、新CA2領域における多様性、集団性の兆候の探索的な解析が行われた。CA2からCA2への神経回路の特徴的で非均一的な投射パターン（未発表）の解析を行い、新CA2領域における多様性・集団性に関する新規の予備的な実験データが得られた。CA2の新定義やCA2とCA3の投射パターンの違いを総合的に解説したレビュー論文の出版を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬新CA2領域は、社会性記憶形成に重要な役割を持つことが、近年の研究から明らかになってきているが、そのメカニズムの全貌は未だ明らかになってはいない。本研究課題で得られた予備的な研究結果によって、海馬新CA2領域の多様性と集団性の一端の解明が進んだ。社会性記憶形成のメカニズム解明進展に基盤的に貢献する予備的な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：The new CA2 region is the most recently emerged region in the hippocampus (Kohara et al. Nat. Neurosci. 2014). Using the repulsive segregation gene transfer technology "BATTLE" and new CA2 region-specific Cre knock-in mice, Cre-dependent AAV, etc., we conducted an exploratory analysis of diversity and subpopulation in the new CA2 region. We found the characteristic and non-uniform projection patterns of neural circuits from CA2 to CA2 (unpublished) and obtained new preliminary experimental data on diversity and collectivity in the neo-CA2 region. We published a review article (Shinohara, Y and Kohara, K, Hippocampus 2023) that comprehensively explains the new definition of CA2 and the differences in the projection patterns between CA2 and CA3.

研究分野：神経科学

キーワード：海馬 CA2 多様性 集団性 神経回路 神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

海馬新 CA2 は、海馬において最も近年になり出現した領域である (Kohara et al. Nat. Neurosci 2014)。最近の研究によって、海馬新 CA2 領域に多様な形態を持つが役割が不明な興奮性細胞が存在することが報告されている (Helton TD et al, Hippocampus 2018)。また別の電気生理学的研究から集団的に発火する何らかの細胞群の神経活動があることも報告されているが (Oliva A, et al., Neuron 2016)、新 CA2 領域において、多様な形態を持つ興奮性細胞がどういった機能役割を持つのか、どのようなタイプの細胞が集団的に発火するのか、またどのような位置配列でこれらの細胞が存在するのかなど、その細胞集団の全貌はほとんど明らかにされていなかった。一方で、大脳皮質においては、「カラム」や「マイクロカラム」といった細胞集団が報告されており、それらが「ユニット」として働き、様々な脳機能において重要な役割を担っていることが現在有力視されている。しかしながら新 CA2 領域において「カラム」のような集団性が報告されたことはほとんどなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、海馬新 CA2 領域において、GCaMP7f を用いた in vivo 神経活動イメージングにより興奮性神経細胞の発火特性における多様性解析を行い、その後、機能実験データと解剖学実験データ、形態実験データを総合的にあわせて、「新 CA2 領域内の新たな細胞」を同定、定義することである。

第二の目的は、海馬新 CA2 領域において、機能面と解剖学的面から集団性を探索して、これまでに明らかにされていなかった「CA2 領域内の新たな細胞集団」を見出すことである。

## 3. 研究の方法

逆行性AAVを用いた新CA2領域興奮性神経細胞への出力先特異的遺伝子導入実験

- a. 高効率で逆行性に感染する性質を持つセロタイプを用いて、神経活動インディケーター GCaMP7f (カルシウム依存的に蛍光強度を変化させる蛍光タンパク質) と mCherry の両方を同時に発現する AAV ベクターを作製し、関西医科大学でパッケージングし AAV を作製する。(AAVretro-synapsin promoter-flex-GCaMP7f-2A-mCherry-WPRE)
- b. 申請者により作製された新 CA2 領域特異的 Cre ノックインマウス (MAP3K15-2A-Cre:雄) を麻酔下で脳定位装置により固定し、新 CA2 領域神経細胞の出力先である外側中隔へ、上記の Cre 依存的に GCaMP7f と mCherry を発現する逆行性 AAV を注入し軸索終末から逆行的に感染させ、外側中隔へ出力する新 CA2 領域興奮性神経細胞に選択的に GCaMP7f と mCherry を発現させる。手術時に微小内視蛍光顕微鏡を新 CA2 領域の真上に装着する。

微小内視蛍光顕微鏡を用いた自由行動化での神経活動イメージング実験

- a. 手術7日、9日、11日、13日、15日後、微小内視蛍光顕微鏡を装着した雄マウスを上部に場所位置記録用 CCD カメラを設置した 1m 四方の実験ボックス A の中に 30 分間入れ、自由行動下において、外側中隔出力性新 CA2 神経細胞の GCaMP7f による神経活動イメージングを行い、場所受容野および神経活動パターンを計測する。
- b. 17日、19日、21日、23日、25日後に、別の雄マウスが入っている直径 10cm カップケージの中に置かれ、上部に場所位置記録用 CCD カメラを設置した三角形 (一辺 1m) の実験ボックス B に、微小内視蛍光顕微鏡を装着した雄マウスを 15 分間入れ、社会性行動時の外側中隔出力性の新 CA2 神経細胞の神経活動イメージングを行う。

機能面、解剖学的面、形態学的面からの多様性の総合的解析

- a. 還流固定と後固定を行い、in vivo蛍光イメージング測定を行ったCA2領域部分のスライズブロックを作製し透明化処理を行った後、コンフォーカル蛍光顕微鏡を用いてmCherryとGCaMP7fの3次元画像を撮影し、mCherryの蛍光によって外側中隔出力CA2神経細胞の形態および軸索投射先（複数の投射先がある場合）を解析する。行動時の神経活動パターンとmcherry蛍光画像による細胞形態の重ね合わせを行い、機能面、解剖学的面、形態面から、外側中隔へ出力する海馬新CA2神経細胞の特性を解析する。

別の出力先（対側海馬）からの逆行性感染後、同様のin vivo実験、多様性の総合的解析

- a. 上記1.2.3と同様の実験を、新CA2領域興奮性神経細胞の出力先である対側海馬CA1に対してもを行い、対側海馬CA1へ出力する新CA2領域興奮性神経細胞の神経活動イメージングを行う。（同側海馬CA1へ選択的注入も技術的に可能であれば同様の実験を行う。）
- b. 3aと4aの細胞特性の解析結果から、新CA2領域興奮性神経細胞の多様性を解析し、分類する。総合的に考慮し新たに分類できる場合、新CA2領域内新細胞として定義する。

機能面、解剖学的面、形態学的面からの総合的な「新たな細胞集団」の探索的解析

3a, 4a, 4b のデータ解析により同期的に神経活動を示す興奮性神経細胞を探索し、それらの細胞形態、細胞体位置等から「CA2領域内の新たな細胞集団ユニット」を見出す。

#### 4. 研究成果

コロナウイルスの蔓延等の影響により、第一の目的に用いる微小内視蛍光顕微鏡イメージングの実験担当者が研究実施することが困難になった事情があったことから、その状況に柔軟に対処し、第二の目的に焦点を絞って重点的に推進し発展させた。反発分離性遺伝子導入技術「BATTLE」を用いて、新CA2領域における多様性、集団性の兆候の探索的な解析を行なった。また、新CA2領域の神経細胞に強く発現するペリニューロナルネット（糖鎖とタンパク質の複合体からなる細胞外マトリックス）に関しても、多様性、集団性の兆候の探索的な解析を行なった。さらに、新CA2領域特異的Creノックインマウス、Cre依存性AAVを用いることによって、CA2からCA2への神経回路の特徴的で非均一的な投射パターン（未発表）の解析を行い、新CA2領域における多様性・集団性に関する新規の予備的な研究データが得られた。

さらに新CA2領域の多様性、集団性を解明するための新技術の開発を行い、「BATTLE」技術を発展させた遺伝子組換えマウスの開発を行った。この新技術が開発された後には、海馬新CA2領域の多様性の解明が大きく進展することが期待される。CA2の新定義やCA2とCA3の投射パターンの違いを総合的に解説したレビュー論文（Shinohara, Y and Kohara, K, Hippocampus 2023）の出版を行った。

## 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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shinohara Yoshiaki, Kohara Keigo	4. 巻 33
2. 論文標題 Projections of hippocampal CA2 pyramidal neurons: Distinct innervation patterns of CA2 compared to CA3 in rodents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hippocampus	6. 最初と最後の頁 691 ~ 699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hipo.23519	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 Kohara Keigo, Okada Masayoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-Cell Labeling Strategies to Dissect Neuronal Structures and Local Functions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology12020321	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 Kohara Keigo, Inoue Akitoshi, Nakano Yousuke, Hirai Hirokazu, Kobayashi Takuya, Maruyama Masato, Baba Ryosuke, Kawashima Chiho	4. 巻 23
2. 論文標題 BATTLE: Genetically Engineered Strategies for Split-Tunable Allocation of Multiple Transgenes in the Nervous System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101248 ~ 101248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101248	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 Inoue Akitoshi, Kobayashi Takuya, Hirai Hirokazu, Kanaya Noriko, Kohara Keigo	4. 巻 1
2. 論文標題 Protocol for BATTLE-1EX: A High-Resolution Imaging Method to Visualize Whole Synaptic Structures and their Components in the Nervous System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100166 ~ 100166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2020.100166	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小原圭吾、井上昭俊、中野洋輔、平井宏和、小林拓也、丸山正人、雲財知、馬場亮輔、川島千穂
2. 発表標題 「遺伝子組換え酵素の戦い」と反発分離調節的な遺伝子発現を実現する新規の実験戦略
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 「遺伝子の分離発現方法、ポリヌクレオチド、及び遺伝子組換え用キット」	発明者 小原圭吾	権利者 関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-238481	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

keigokohara.com 研究内容 <a href="http://keigokohara.com/research/">http://keigokohara.com/research/</a>
--

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