

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03545

研究課題名(和文) 海馬同期スパイク列のリアルタイム操作による生理機能の検証

研究課題名(英文) Realtime manipulation of hippocampal spike sequences in rats

研究代表者

佐々木 拓哉 (Sasaki, Takuya)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：70741031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動中の記憶獲得時における場所細胞の表象パターンと、報酬を得ている間の同期的な神経細胞集団の発火活動という2つの神経スパイクパターンが、新しい経験後の同期的な再活性化パターンにどのように組み込まれるかを解析した。新たに開発したクローズドループ系を用いた電気的刺激により、神経同期活動を選択的に妨害した。この実験系を用いて、解析を行ったところ、新しい経験における空間的選択性に加えて、報酬時に生じるような同期的な神経活動が、その後の休憩時における同期的な再活性化パターンの形成に重要な役割を担うことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳においては、新しい経験を学習することで、神経細胞集団の協調的な活動パターンが多様な形で再構成され、個々の細胞自体の興奮性や細胞間の機能的結合に変化が生じる。本研究では、特に記憶に重要であると考えられる海馬において、環境を経験した後の休息や睡眠時などに、神経細胞集団の同期的な再活性化のパターンが重要な役割を担うことを見出した。社会生活に身近な記憶や学習の新たな神経メカニズムを解明したという点で、重要な意義をもつ研究成果であり、また睡眠や休憩時の脳の活動の重要性にもあらためて焦点を当てる契機となる。

研究成果の概要(英文)：This study investigated how awake synchronous events during a new experience contribute to the formation of reactivation patterns in the hippocampal neuronal circuits. The researchers found that the disruption of awake sharp-wave ripples prevented the experience-induced changes in neuronal contributions during post-experience synchronous events. Additionally, the hippocampal place cells that participated more in reward-related synchronous events exhibited stronger reactivation during post-experience synchronous events. The combined effects of awake synchronous neuronal patterns and place-selective firing patterns determined the ensembles of cells that showed significant increases or decreases in their correlated spikes. Overall, awake synchronous events play a crucial role in identifying the hippocampal neuronal ensembles that will be involved in synchronous reactivation during subsequent offline states, thus promoting memory consolidation.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬 記憶 学習 神経同期活動 場所細胞

1. 研究開始当初の背景

海馬は、特徴的な層構造をもち、電気生理計測において、最も多くの神経細胞サンプルを同時に捉えられる利点がある。また、成体脳の中で、おそらく最も規模が大きい神経同期スパイク列が次々に生じる。機能的にも、場所細胞をはじめ高次元の抽象化された神経表象が明瞭に生じており、動物の行動と照合をつけやすい。海馬は記憶の脳領域として有名だが、近年は、将来の行動予測や内部表象、意思決定など、複雑な情報処理の役割も注目されている。特に多くの神経細胞記録を基にした相関解析から、海馬の神経同期スパイクが複雑な情報処理に関与することが示唆されているが、更に直接的な因果関係の実証までは到達していない現状がある。神経生理学においては、神経スパイクの時空間活動と機能発現の因果関係が重要である。これを直接証明するには、神経スパイク情報をリアルタイムで取り出し、その情報を制御する必要がある。この方法論は、将来の神経生理学においても一層重要性が増すと予想される。

2. 研究の目的

海馬神経細胞は、多様な同期スパイク列を生じ、将来の行動予測や空間表象、意思決定など複雑な脳機能を司る。しかし、従来の研究は、神経活動の「計測」を基にした行動との相関解析にとどまり、真の意義は推測の域を出ていない。本研究では因果的な実証に向けて、ラット海馬の神経同期スパイクを測定中にリアルタイムで検出する。同時に海馬にフィードバック刺激を加えることで、その同期スパイク列のみを時間選択的に攪乱させる。このオンライン操作技術は、神経活動の計測と操作の両面において、世界最高水準の生理実験技術となる。本法をラットに適用し、複数の選択肢と解が用意されているような迷路課題を解かせる。この課題中に、将来の行動と対応した海馬神経細胞の同期スパイク列を選択的に消失させ、予測や意思決定、学習・記憶などの脳機能の変化を検証する。

3. 研究の方法

神経スパイク計測用の電極群を海馬に埋め込み、海馬 CA1 野から海馬神経細胞のスパイク列をマルチユニット計測する。マルチユニット計測では、電気信号波形から各ニューロンのスパイク信号を抽出する(ソーティング)。オンライン操作の過程では、報酬中の海馬リップル波および神経同期活動が検出されたら、その瞬間(5 ミリ秒以内を目標)に海馬にフィードバック刺激(投射線維の fimbria 領域への電気刺激、または海馬錐体細胞への光刺激)を与える。電気刺激により、標的の同期スパイク列が生じ切る前に、それを打ち消すことができることを確認している。

ラットを U 字型の直線トラック上を行き来しながら走るように訓練し、トラックの両端にはチョコレートミルクの報酬を置いた。記録日には、まず 20 分間、馴染みのある箱で休憩し、同じ U トラック走行を 20 分間行い、同じ箱で休憩(事前休息)を 60 分間行い、そして新しい部屋で同じ形状のトラック上で新しい U トラック走行(新しい走行)を 20 分間行った。新しい走行後、ラットは 60 分間同じ箱で休憩させた。報酬期間中に少なくとも 4 つのニューロンが 100 ミリ秒以内に同期してスパイクを発する同期イベント(報酬関連の同期イベントと呼ばれる)を検出した。

4. 研究成果

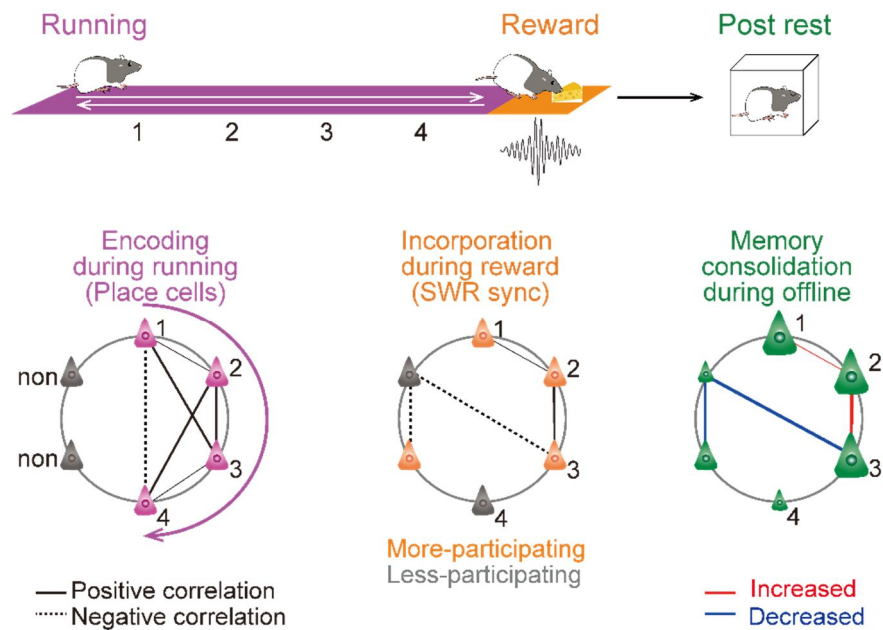
(1) 覚醒時の海馬同期イベントは、オフラインのニューロン再活性化に組み込まれる

同期活動に含まれる神経細胞の発火の参加率を算出したところ、フィードバック刺激を受けたラットでは、参加率に有意な増加と減少が見られる場所細胞の割合がそれぞれ 22.2%と 16.7%であり、電気刺激を加えなかったラットと比較して有意に小さかった(増加: $\chi^2 = 6.48$, $P = 0.022$; 減少: $\chi^2 = 5.22$, $P = 0.045$, Bonferroni 補正を行ったカイ二乗検定)。これらの結果は、新しい経験時、特に報酬中の同期活動が海馬ネットワークの再構築とオフライン再活性化パターンの形成に不可欠であることを示唆している。

こうした結果は、経験による神経回路の再構築のために、同期活動内のニューロンアンサンブルが個々のニューロンの貢献に変化をもたらしていることを示唆している。そこで新しい走行の報酬関連の同期活動への参加率を統計的に検証して(各ニューロンに対してカイ二乗検定、 $P < 0.05$)、新しい走行で参加率が有意に高いまたは低いとされるニューロンを定義した。非場所細胞はほとんどが分類されなかったため、以下の統計的比較は場所細胞に制限した。より同期活動に参加するようになった場所細胞の割合は 47.7%であり、有意な減少を示す割合よりも有意に大きかった($\chi^2 = 4.91$, $P = 0.027$, カイ二乗検定)。

以上のような結果から、海馬回路において経験依存的に再構築が行われるメカニズムについて以下のように考察した(図)。覚醒時の同期イベントに関与する場所細胞ネットワークは、経験後の同期再活性化イベントにおいて、特にその発火活動への参加とスパイク相関を増加させることにより、記憶の定着を促進する。一方で、覚醒時の同期イベントに関連しない非場所細胞アンサンブルは、経験後のスパイク相関を減少させる。細胞のペアの増加と減少した相関スパイ

クの割合は基本的に相殺され、海馬ネットワークの協調再活性化の強度は大きく変化しない。



既によく知られている知見として、空間的な経験を符号化する海馬の細胞アンサンブルは、その後のオフラインの同期イベント中により頻繁に再活性化されることがわかっている。重要なことは、経験後の再活性化パターンが単に学習された経験から構成されているのではなく、むしろ再活性化パターンは事前に構成されたデフォルトのネットワークによって支配されており、それは経験前の期間中に表現されるという点である。この仮説に従えば、新しい場所細胞のサブセットが新しい経験中に既存のネットワークに組み込まれる。本研究の結果は、事前休息期間と事後休息期間の同期イベントにおける個々のニューロンの参加率や細胞対の共起パターンの類似性を確認した。これらの観察に基づいて、経験前のイベント中に観察されたものを基準として、経験後の同期イベント中のスパイクパターンの変化を定量化した。その結果、経験のみを符号化する細胞アンサンブル（例：場所細胞）ではなく、覚醒時の同期イベントに関連するニューロンアンサンブルに関連した同期再活性化パターンの変化をより正確に特定することができた。

本研究は、報酬行動中の覚醒時の同期イベント（覚醒時再生を含む）が、経験を符号化するニューロンアンサンブルが再活性化され、相関を持って新たな再活性化パターンが形成される際の記憶定着において重要であることを示唆するものである。経験を符号化するスパイク（例：場所選択的発火）と覚醒時の同期イベントという 2 つの異なるタイプの行動に関連したスパイクパターンが、効率的に新たな記憶を獲得・維持するために、海馬回路の機能的な接続の双方向調節のために重要であることを示唆するものである。

（ 2 ） 嫌悪刺激および報酬に対する背側-腹側海馬の活動

嫌悪刺激及び報酬に対する海馬神経細胞の活動を記録するために、動物がこれらを繰り返し経験する行動試験系を構築した。本課題では、ラットがスタート地点から中央上部の delay ゾーンを通過し、スタート地点と反対側の経路を選択することで報酬を得ることができる。また、delay ゾーン直後の左右いずれかの位置に嫌悪刺激として強い空気を吹きかける刺激であるエアパフ刺激を提示した。本課題では、エアパフ刺激通過後に報酬を獲得できるという状況を作成することで、ラットがエアパフ刺激を繰り返し通過する状況を作成した。本課題遂行時に、ラットが各トライアルで正解の経路を選択した割合を比較したところ、エアパフの有無による正解率に有意な差は見られず、正解率は 8 割程度に保たれた。これにより、嫌悪刺激及び報酬を繰り返し経験する行動試験系を構築できた。記録は背側海馬と腹側海馬の両方から行った。

行動試験遂行時の神経活動の解析を行ったところ、背側海馬では腹側海馬に比べてより多くの反応性細胞を保持していることが示された。記憶の固定時の海馬神経活動についてより詳細に調べるため、リップル時の各細胞の活動について解析を行った。腹側海馬の神経細胞の多くでは、腹側海馬リップル発生時には発火率の上昇が見られた一方で、背側海馬リップル発生時にはこの上昇は観察されなかった。このことから、背側及び腹側海馬におけるリップル発生時には異なる細胞集団が活動し、異なる内容の記憶が固定されていると考えられる。以上の結果から、嫌悪刺激を伴う空間課題においては背側海馬が強く情報をコードしており、独立に記憶として固定されることが推察された。過去の知見から、情動に関わるとされる腹側海馬が、本行動課題においてもより強く活動すると予想していたが、そのような結果は観察されなかった。この理由として、本課題では、環境（空間）の一部として情動にかかわる情報が保持される必要があるため、空間情報を強く保持する背側海馬による応答が優勢であったと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kayama Tasuku, Ikegaya Yuji, Sasaki Takuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Phasic firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area triggers peripheral immune responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05306-8	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 Okonogi Toya, Sasaki Takuya	4. 巻 15
2. 論文標題 Theta-Range Oscillations in Stress-Induced Mental Disorders as an Oscillotherapeutic Target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 698753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2021.698753	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木拓哉
2. 発表標題 迷走神経による精神機能調節メカニズムの解明
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Sasaki
2. 発表標題 Deciphering multidimensional physiological signals to unveil brain-body interactions
3. 学会等名 International Graduate Student Conference in Pharmaceutical Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院薬学研究科薬理学分野ホームページ
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~yakuri/publication.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
---------	---------