

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21700429

研究課題名 (和文) 食べ物の匂い入力に対する嗅皮質ニューロン発火活動の再活性化の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the reactivation of food-odor evoked activity in the olfactory cortex

研究代表者

眞部 寛之 (MANABE HIROYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：80511386

研究成果の概要 (和文)：

深い睡眠中、外界の嗅覚情報は嗅皮質まで到達せず脳の高次へと運ばれない。このとき、嗅皮質でどのような情報処理をしているのか不明であった。本研究によって、徐波睡眠中のラットの嗅皮質では、ニューロンの同期的な発火を伴う鋭波が出現することが明らかとなった。この鋭波に伴う情報は下位中枢である嗅球へも運ばれることが分かった。鋭波は、起きているときに経験した情報の再活性化の場であると考えられ、再活性によって嗅覚記憶の固定化が進行すると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

The olfactory cortex is functionally isolated from the external odor world during slow-wave sleep. However, the neuronal activity pattern in the olfactory cortex and its functional role during slow-wave sleep were not well understood. Here, I demonstrated in freely behaving rats that the anterior piriform cortex repeatedly generated sharp waves accompanied by synchronized discharges of numerous cortical neurons during slow-wave sleep. The olfactory cortex sharp waves drove synchronized top-down inputs to the olfactory bulb. The olfactory cortex sharp waves may represent the reactivation of the neuronal activation pattern during preceding waking period and contribute to the memory consolidation process in the olfactory cortex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：神経科学、嗅覚、電気生理、睡眠、嗅皮質、鋭波

1. 研究開始当初の背景

徐波睡眠中、または深麻酔下において、感覚入力は視床によりゲーティングされ感覚

皮質に感覚入力が到達しにくくなることが知られている。このとき、感覚入力が遮断されている感覚皮質では、まったく別の情報処理モードになっていると考えられる。ところ

が、嗅覚入力とは他の感覚入力とは異なり視床を通過せず直接感覚皮質である嗅皮質に到達し、視床での感覚入力ゲーティングを受けないため、嗅覚系に感覚入力ゲーティング機構が存在するのか不明であった。近年、麻酔下ではあるが、嗅覚入力は動物の覚醒状態依存的（麻酔の深さ依存的）に嗅皮質でゲーティングを受けることが明らかとなった（Murakami et al. 2005）。嗅覚入力ゲーティングが起きているときに嗅皮質でどのような情報処理が行われているのか不明であるが、他の感覚皮質では、徐波睡眠中、覚醒時に感覚入力により活動したニューロン群が自発的に再活性化する現象が報告されている。この現象は海馬で起こる再活性化と同期して起こることから、記憶の固定化の重要な過程であると考えられている（Ji and Wilson 2007）。嗅皮質は他の感覚系と異なり大脳旧皮質に属しており、大脳新皮質とは層の数など構造的な差異はあるが、他の感覚皮質と同様に興奮性反回側枝が発達しており、機能的にも徐波睡眠中に徐波を示すという類似性を示す。よって、徐波睡眠時、嗅皮質で覚醒時に嗅覚入力によって発火したニューロン群の再活性化が起こり、この現象が嗅覚記憶の固定化に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

また、最近の研究から、海馬において、過去のニューロンの活動の再活性は徐波睡眠時ばかりでなく、経験直後の覚醒休息時にも起こることが示された（Foster and Wilson 2006）。この現象も記憶形成の重要な一過程であると考えられるが、他の脳領域でも同様の現象が起こるのかどうかは不明である。

2. 研究の目的

徐波睡眠時や覚醒休息時、その直前の感覚入力による嗅皮質ニューロン群発火活動の再活性化の有無とその様式を検証することで、嗅覚記憶形成機構に迫ることを大きな目的とした。具体的には以下の2点を明らかにすることを目的とした。

(1) 徐波睡眠時、直前の覚醒時に食べた食餌の匂いによって発火した嗅皮質ニューロン群が再活性化するかどうか。起こるとしたら海馬で再活性化が行われるイベントである海馬 ripple 波と同期するか。

(2) 食餌後の覚醒休息時に再活性化が起こるかかどうか。起こるとしたら海馬 ripple 波と同期するか。

本研究の第一の目的は、「徐波睡眠時、感覚入力ゲーティングによって嗅覚入力から切り離された嗅皮質では、睡眠直前に経験した嗅覚入力による嗅皮質ニューロン群の発火活動が再活性化される」という仮説を検証

することである。

これまで嗅覚記憶の研究は、行動実験や嗅球回路の可塑的変化を対象としたものがほとんどで、嗅覚記憶における嗅皮質の役割についてはほとんど不明であった。近年の研究により、嗅皮質における嗅覚入力ゲーティング機構が発見されたことを足がかりに、「徐波睡眠時に、嗅皮質では外界からの入力を遮断し、記憶の固定化に重要と考えられるニューロン発火活動の再活性化が起こる」という仮説を打ち立てることができ、この研究によって初めて、嗅覚記憶における嗅皮質の機能的役割を議論できるようになると考えられる。

また、本研究では再活性化が海馬 ripple 波の出現と同期するかどうかを検証する。視覚野における再活性化は、海馬で起こる約100ミリ秒継続する特徴的な高振幅脳波である ripple 波に同調して起こり、時間軸が覚醒時の活動よりも圧縮されて表現されることが知られている（Ji and Wilson 2007）。海馬 ripple 波内には海馬内でのニューロン群再活性化活動が時間軸を圧縮した形で含まれていることが知られており、ニューロン群の再活性化には「情報の圧縮」と「各脳領域間での同期した出現」が重要であると考えられる。本研究においても、嗅皮質ニューロン群の再活性化が時間軸を圧縮した形で表現されるか、また、海馬 ripple 波と嗅皮質再活性化が同期するかどうか調べる。

海馬において、ニューロン群の再活性化は徐波睡眠時ばかりでなく、経験直後の覚醒休息時にも起こることが知られており、記憶の形成に関連していると考えられている。本研究の第二の目的は、嗅皮質で匂い応答するニューロン群の再活性化が食餌直後の覚醒休息時にも起こるかどうかを検証することである。また、この再活性化が、海馬の ripple 波と同期して起こるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 無麻酔・無拘束下ラットの電気生理
自由行動下ラットの嗅皮質から複数のテトロード微小電極で多数のニューロンを同時記録しつつ、ラットに睡眠→食餌→睡眠の行動を取らせた。食餌時に食べ物の匂いで発火した嗅皮質ニューロン群がその後の睡眠時、または覚醒休息時に再活性化するかどうか、また再活性化のタイミングが海馬 ripple 波と同期するかを検証した。

①多数の嗅皮質ニューロン発火活動の同時記録

本研究では、直径12.5 μ mのタングステン電極4本をより合わせて作成したテトロード

電極を用い、この電極を5~10本独立に動かすことの出来る自作マイクロドライブをラット頭蓋骨に固定し、電極を嗅皮質まで挿入することで嗅皮質から多数のニューロン発火活動を記録した。ニューロンの活動の記録は当研究室の設備であるNeuralynx社製の多チャンネル記録装置 (cheetah) を用いて行った。嗅皮質は広い領域であり、いくつかの亜領域に分けられるが、機能差は不明である。本研究では、前梨上皮質を第一のターゲットとして記録を行った。

②海馬の局所脳波の同時記録

海馬局所脳波を嗅皮質ニューロン活動と同時記録するために、ステンレス電極を海馬のstratum radiatumに埋め込んだ。

③覚醒・睡眠を定義するための大脳新皮質脳波、首の筋肉の筋電図の測定

ラットの覚醒・睡眠状態をモニターするために、上記①、②の記録に加え、大脳新皮質脳波をビス電極を用いて記録し、首の筋肉から筋電図を記録するために、ステンレス電極を首の筋肉に埋め込んだ。

④行動、記録

上記手術後、1週間ほど回復させながら、電極を嗅皮質に下ろした。この間に、ラットを記録場に連れて行き、2時間睡眠、1時間摂食、その後2時間睡眠と決まった行動をとらせるように訓練した。睡眠はよく慣れさせたケージ (345×403×177mm) で行い、摂食はオープンフィールド (600×440mm) で行った。テスト日は、食餌前睡眠、摂食行動、食餌後睡眠の一連の行動を取らせその間継続的に嗅皮質のニューロンの活動と局所脳波、海馬の局所脳波、大脳新皮質脳波、首の筋電図を記録した。1日の記録後、嗅皮質の電極を少し動かし、新たなニューロン群を翌日に記録した。記録後は深麻酔下、電極に電流を流しマーキングし、ラットを還流固定、脳切片を作り電極挿入位置を確認した。

(2) 嗅皮質、嗅球の鋭波の解析

本研究遂行中に初めて発見された、嗅皮質、嗅球における鋭波を詳細に解析するために、ウレタン麻酔下ラットの嗅皮質もしくは嗅球に16chの電極が縦に並んだ (電極間距離100 μ m) シリコンプローブを挿入し、鋭波のcurrent source density analysisを行い、鋭波の由来を解析した。

(3) 嗅皮質電気刺激による嗅皮質から嗅球顆粒細胞へのシナプスでの長期増強の解析

嗅皮質鋭波の具体的な機能を解析するために、嗅皮質深部を鋭波を模した電気刺激を行い、嗅皮質ニューロンと嗅球顆粒細胞との

シナプスにおける長期増強現象が起こるかどうかを調べた。電気刺激は20msのインターバルで5発の刺激を1秒間隔で10回行った。

4. 研究成果

(1) 嗅皮質における鋭波の発見

嗅皮質で起こる再活性化現象を解析するためには、嗅皮質再活性がどのようなタイミングで起こるのか、どのようなイベントとして表現されるのかを見つけなければならなかった。そこで、まず、徐波睡眠中の嗅皮質局所脳波とユニット活動を詳細に観察した。嗅皮質の深層であるIII層で、大きなnegativeを示す鋭波が観察された。この鋭波に合わせて、嗅皮質の多くのニューロンが同期して発火していた。この鋭波は探索行動時やREM睡眠中には観察されなかった。また、大脳皮質の徐波のタイミングとは独立していた。よって、この鋭波は大脳皮質の徐波とは独立して作られていることが分かった。

海馬の再活性化の場合であるripple波は海馬鋭波と同時に出現することが知られている。そこで、嗅皮質鋭波にripple波が同期して出現しているかどうかを調べた。嗅皮質の細胞体層であるII層から記録をすると、嗅皮質で見られる鋭波と同期してripple様の局所脳波が観察された。そこで、今回発見された鋭波を「嗅皮質鋭波」と名づけた。

各テトロードから得られた嗅皮質のマルチユニットのデータをシングルユニットに分離して、各々のニューロンが嗅皮質鋭波にどのように参加するかを調べたところ、細胞によって嗅皮質鋭波によく参加するものとほとんど参加しないものがあることが分かった。これは、嗅皮質鋭波に伴ってすべてのニューロンが同時に参加するわけではなく、特定のニューロンの組み合わせで嗅皮質鋭波に参加していることを示唆している。

以上の結果は、嗅皮質鋭波が嗅皮質における活動の再活性化の場合であることを強く示唆するものである。

(2) 嗅皮質鋭波は海馬鋭波と独立して発生していた

嗅覚情報の再活性化の場合であると考えられる嗅皮質鋭波が海馬鋭波と同期して発生しているかどうかを調べるために、徐波睡眠時の嗅皮質鋭波と海馬鋭波の出現タイミングを調べたところ、今回の条件では、ほぼ独立して発生していることが分かった。

(3) 嗅皮質鋭波はニューロンの反回側枝の同期的入力によって作られる

海馬鋭波はCA3に豊富に存在する反回側枝の同期的な入力により発生すると考えられ

ている。嗅皮質もまた反回側枝の豊富に存在する領域である。よって嗅皮質鋭波は、嗅皮質ニューロンの反回側枝の同期的な入力によって嗅皮質の中で独自に作られると考えられる。そこで、ウレタン麻酔下ラットで、16ch の電極が縦に並んだシリコンプローブを用い、嗅皮質の各層から同時に鋭波を記録し、current source density analysis を行うことで嗅皮質鋭波がどのように作られるかを解析した。その結果、嗅皮質鋭波は反回側枝の入力があるⅡ層やⅢ層への入力で作られることがわかった。

(1)、(2)、(3)の結果から、嗅皮質鋭波は嗅皮質内の回路で独自に作られるイベントであることが示唆された。

(4) 嗅皮質鋭波に伴って起こるニューロンの同期発火によって、嗅球の顆粒細胞へと同期的な入力をもたらす

嗅皮質のニューロンは嗅球の顆粒細胞へと入力している。このトップダウンの入力の存在は解剖学的にはよく知られていたが、具体的な機能に関しては不明である。徐波睡眠時、嗅球と嗅皮質の局所脳波を同時記録すると、嗅皮質鋭波と同期した鋭波が嗅球顆粒細胞層で観察された。ウレタン麻酔下で、嗅球に 16ch シリコンプローブを挿入して鋭波の current source density analysis を行ったところ、嗅球で観察された鋭波は嗅皮質鋭波からのトップダウン入力によって作られることがわかった。

(5) 嗅皮質のバースト刺激によって、嗅皮質から嗅球顆粒細胞へのシナプスに長期増強を起こさせることが出来た

嗅皮質鋭波の嗅球へのトップダウン入力の具体的な機能を解明するために、ウレタン麻酔下ラットの嗅皮質を、嗅皮質鋭波を模したバースト刺激を行い、嗅皮質ニューロンと嗅球顆粒細胞とのシナプスに長期増強 (LTP) 現象が起こるかどうかが調べた。10 回のバースト刺激によって、嗅皮質ニューロンと顆粒細胞とのシナプスにおいて少なくとも 50 分は続く長期増強現象が起こった。よって、嗅皮質鋭波の 1 つの大きな働きは、同期した入力を嗅球へ送ることによって、嗅球内の回路の再編成を起こすことであると考えられる。

再活性の場合であると示唆される嗅皮質で独自に起こる嗅皮質鋭波を発見したことは、本研究のもっとも大きな成果であるといえる。現在、この嗅皮質鋭波中における嗅皮質ニューロンの再活性化現象の具体的様式を解明すべく研究を進めている。また、覚醒休息時にも海馬で見られるような再活性化現象が嗅皮質で起こるのかどうかについても

解析を進めている。

海馬鋭波/ripple 波に伴うニューロンの再活性化現象は、記憶の固定化に関与していると考えられているが、海馬は空間記憶やエピソード記憶を担当しており、すべての記憶の固定化に海馬が関与しているわけではないと考えられている。今回、嗅皮質で新たに見つかった嗅皮質鋭波は、空間記憶やエピソード記憶以外の記憶、例えば、匂いと報酬との連合学習のような学習の記憶の固定化に関与しているのかもしれない。嗅皮質鋭波の発見によって、記憶の形成、固定化メカニズムの新たな切り口が見つかったことは、記憶が脳でどのように形成し、維持されるかの研究に新たな発見をもたらすと期待される。

これまで、嗅皮質の具体的な機能に関してはほとんど不明であった。特に、徐波睡眠時、ゲーティングによって外界の情報が入力されない状況で、嗅皮質がどのような情報処理を行っているのかについてはまったく不明であった。今回の嗅皮質鋭波の発見によって、嗅覚情報が嗅皮質でどのように処理されるかについて更なる理解が進むと期待される。

本研究から、嗅皮質から嗅球へのトップダウン入力が徐波睡眠時に起こり、嗅球の回路の再編成に関与しているとの示唆が得られた。このことは、嗅皮質から嗅球へのトップダウンシグナルがどのような機能を持つかを解明する大きな足がかりになると共に、脳の上位領野から下位領野に送るシグナルの具体的な役割を解明するよいモデルになると考えられる。

本研究は、これまで知られていなかった嗅皮質における鋭波を初めて発見し、嗅皮質の機能を鋭波から解明するという新たな視点を確立したことは、国内外の関連する研究の先駆けとなるものであり、これからの嗅覚研究、特に嗅皮質と、それより上位の嗅覚中枢の機能解明に向けて、他の研究を牽引するものになると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1)

Hiroyuki Manabe, Ikue Kusumoto-Yoshida, Mizuho Ota, and Kensaku Mori, Olfactory Cortex Generates Synchronized Top-Down Inputs to the Olfactory Bulb during Slow-Wave Sleep, Journal of Neuroscience, 査読有、31(22):8123-8133 2011

〔学会発表〕（計3件）

（1）

Hiroyuki Manabe, Ikue Kusumoto-Yoshida, Mizuho Ota, and Kensaku Mori, Olfactory cortex generates sharp waves that drive synchronized inputs to the granule cells in the olfactory bulb during slow-wave sleep, Neuroscience2010, 2010年11月16日, サンディエゴコンベンションセンター（米国 サンディエゴ）

（2）

Hiroyuki Manabe, Ikue Kusumoto-Yoshida, Mizuho Ota, and Kensaku Mori, Olfactory cortex sharp waves during slow-wave sleep, 第8回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」, 2010年11月7日, 九州大学馬出キャンパス（福岡県 福岡市）

（3）

Hiroyuki Manabe, Ikue Kusumoto-Yoshida, Mizuho Ota, and Kensaku Mori, Neuronal circuits responsible for the generation of olfactory cortex and olfactory bulb sharp waves during slow-wave sleep, Neuro2010, 2010年9月3日, 神戸コンベンションセンター（兵庫県 神戸市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞部 寛之 (MANABE HIROYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：80511386

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし