

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350992

研究課題名(和文) 霊長類海馬における情報の符号化と読み出しの神経基盤の解明

研究課題名(英文) Neural mechanism of information encoding and retrieval in the primate hippocampus.

研究代表者

田村 了以 (Tamura, Ryoji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：60227296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類の中隔-海馬系による情報の符号化と読み出し機構を明かにするため、サルを用い直線走路を往復移動中または睡眠中の海馬CA1領域や内側中隔核のニューロン活動を調べた。往復移動中に記録した107個のCA1ニューロン中17個が場所応答したが、徐波帯域で周期性発火するものはなかった。睡眠中に記録した6個のCA1ニューロンは、REM睡眠中に抑制、non-REM睡眠中に促進されたが、周期性発火は示さなかった。内側中隔核から記録した7個のニューロンも周期性発火を示さなかった。以上より、霊長類の中隔-海馬系ではげっ歯類とは異なる、周期性徐波非依存的な空間情報の符号化・読み出し機構のあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify neural mechanism of information encoding and retrieval in the primate septo-hippocampal system, neuronal activity was recorded from the hippocampal CA1 area and medial septal nucleus in monkeys while the animal performed shuttling behavior on a linear track or while the animal was asleep. Of the 107 neurons recorded in the CA1, 17 showed location specific activity, but none of these CA1 neurons exhibited significant slow rhythmic firing. Six CA1 neurons recorded in the sleeping monkey were suppressed during REM sleep and facilitated during non-REM sleep, but none of these neurons exhibited significant slow rhythmic firing. Seven neurons were recorded in the medial septal nucleus, but again, none of these neurons exhibited significant slow rhythmic firing. These results indicate that the primate hippocampus has a different encoding and retrieval protocol of spatial information than rodents, which is independent of slow rhythmic activity.

研究分野：神経生理学

キーワード：学習・記憶 霊長類 サル 海馬 ニューロン活動 符号化・検索 脳波 周期性徐波

### 1. 研究開始当初の背景

1971年にO'KeefeとDostrovskiが海馬の場所細胞(動物が環境内の特定の場所にいるときに放電頻度が増加するニューロン)を報告して以来、場所細胞に関する研究が進み、ヒトを含む霊長類の海馬にも場所細胞様のニューロンが存在することも明らかにされつつある(TamuraとOno 2001, Ekstromら2003)。こうした場所細胞の集団により、自分のいる環境の認知地図が形成されると考えられている(認知地図仮説)。また、げっ歯類動物の海馬から脳波を記録すると、歩行時やREM睡眠中に比較的高振幅で5-10 Hzの規則的な周期性徐波(シータ波)が出現するが、O'KeefeとReece(1993)は、シータ波の特定の位相で場所細胞の発火が始まり、動物の歩行移動に伴って発火位相が進む現象(位相前進現象)を発見した。その後、発火頻度による符号化(レートコーディング)と周期性徐波の位相に対するニューロン発火タイミングという時間符号化(テンポラルコーディング)を組み合わせることにより場所細胞の情報処理精度が高まることや、空間的に近い場所を符号化している場所細胞同士とのシナプス結合強度が高まるとの仮説が提唱されてきた。またシータ波の出現時には、電気刺激をシータ波のどの位相で与えるかに依存してシナプス可塑性の発現に影響が出ることも報告されている(陽性ピークでは長期増強、陰性ピークでは脱増強; Hölscherら1997)。こうしたげっ歯類動物の研究知見より、現在シータ波は、海馬の広範な領域で同調し組織立った情報処理を行なうための時間フレームを提供するメカニズムであると考えられている(O'Keefe 2007)。しかし、ヒトを含む霊長類の海馬では、持続的かつ明瞭な周期性徐波は観察されないとの報告もあり、霊長類では空間情報の符号化に周期性徐波が関与するかどうかは不明である。一方、げっ歯類動物がnon-REM睡眠中や覚醒下でじっとしている時などには海馬脳波に鋭波・リップルが高頻度出現するが、それに伴って場所細胞集団の活動パターンが覚醒体験時と同じ順番(順再生; non-REM睡眠時; JiとWilson 2007)または逆の順番(逆再生; 動物が場所移動行動直後じっとしているとき; DibaとBuzsáki 2007)で再現する。non-REM睡眠は海馬依存的な陳述記憶の固定を促進するとされているが(RaschとBorn 2007)、鋭波・リップルに伴う場所細胞集団の活動パターン再現は、海馬から記憶情報を読み出し新皮質へ書き込む、すなわち記憶固定促進の神経基盤であることが想定されている(Isomuraら2006)。

### 2. 研究の目的

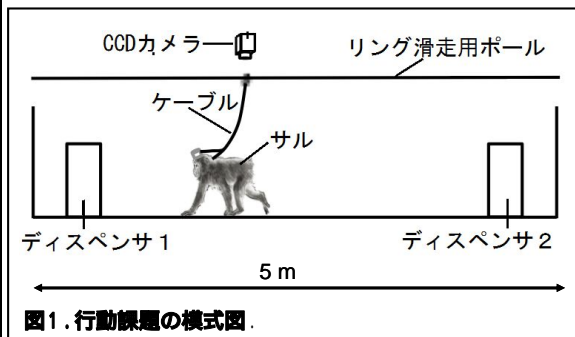
本研究の目的は、霊長類の海馬による空間情報の符号化や読み出し機構を解明することである。具体的には、サルが場所移動課題遂行中または睡眠中に海馬CA1や内側中隔核

からニューロン活動を記録し、場所応答や周期性活動(情報の符号化メカニズム)、および、non-REM睡眠中の活動特性(情報の読み出しメカニズム)を検討することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 被検動物と、馴化および場所移動課題の訓練

本研究では2頭のニホンザルを用いた。これらサルをまず、神経活動記録実験室に馴れさせ夜間も睡眠状態を維持できるようにするため、記録実験室に設置したケージ内で夜間(午後8時~翌朝6時)に睡眠することを訓練した。次にサルを、軽度食事制限下で実験室内に設置した直線走路(約5m)に入れ(図1: 走路直上の天井には、サルの居場所モニター用のCCDカメラ、また走路の両端にはペレットディスペンサを設置)、ディスペンサから交互に出される報酬(ビスケット片)を獲得するために直線走路を往復移動すること(場所移動課題)を訓練した。



#### (2) ヘッドホルダーと睡眠モニタ電極の取付け

上記の訓練を終了後、サルをペントバルビタール(35 mg/kg, 筋肉内注射)で麻酔し、脳定位固定的操作を繰り返して行なうためのヘッドホルダーを頭蓋骨に外科手術的に取付けた。この際、睡眠モニタのため、左右の外眼角皮下(眼電図記録用)および頸部の筋肉内(筋電図記録用)にはテフロン被覆ステンレス線を埋込み、また、前頭骨と頭頂骨にはリード線つきのステンレスビス(皮質脳波記録用)を埋込んだ。

#### (3) 海馬の誘発電位マッピングとテトロードの埋め込み

上記のヘッドホルダー取付け手術からの回復期間(約2週間)をおき、ドミトール・ドルミカム麻酔下で海馬の誘発電位マッピングを行なった。具体的には、刺激電極は貫通路に、記録電極は歯状回に向けて刺入し、記録電極を200 μmステップで深部方向へ移動させながら誘発電位を記録した。この操作を冠状面内で数トラック繰り返すことにより、海馬の亜領域の脳定位座標を正確に求めた(図2; 誘発電位マッピング)。この誘発電位マッピングで得られた脳定位座標データに基づき、可動式テトロード(直径25 μm)

フォームバー被覆ニクロムワイヤ4本とネジ式稼動架台からなる)を海馬 CA1 領域直上に埋込んだ。

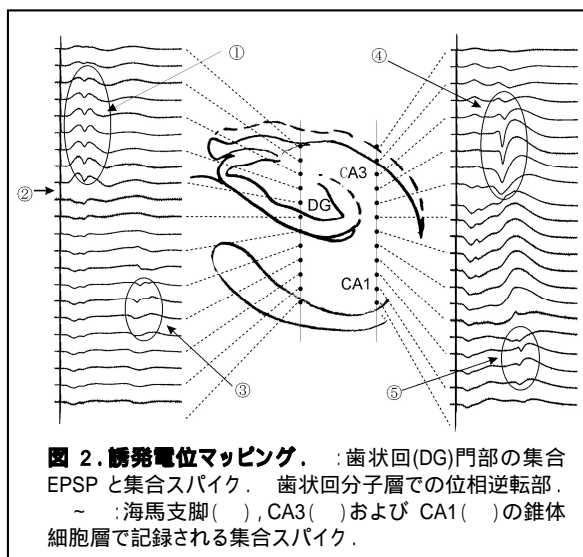


図 2. 誘発電位マッピング。①: 歯状回(DG)門部の集合 EPSP と集合スパイク。②: 歯状回分子層での位相逆転部。  
③: 海馬支脚( )、CA3( )および CA1( )の錐体細胞層で記録される集合スパイク。

#### (4) 海馬 CA1 領域からの神経活動記録とデータ解析

まずサルを軽麻酔し電気生理学実験室に入れ、テトロードを1日に50~100 $\mu$ mずつ深部方向へと移動させながら記録波形をオシロスコープ上で観察した。ニューロン活動がはっきりと認められたらテトロードをその位置に留め、ニューロン活動の安定化とサルの覚醒を待たせた(2~3時間)。その後、サルの頭部に豆電球(位置情報取得用)とニューロン活動信号伝送ワイヤを取付けた。豆電球を点灯させた状態で上記の場所移動課題を遂行させ、ニューロン活動と画像データを同時記録した。

ニューロン活動信号は、前置増幅器を介して主増幅器に送り(Lynx-8;倍率, 9,000倍;バンドパスフィルタリング, 300 - 10,000 Hz), その出力をマルチファンクションボード(National Instruments)でAD変換し、同時記録したサル画像(位置)データとともにハードディスクに記録した。ニューロン活動の電位データはソーティングプログラム(MClust-3.5)によりクラスタ分類後、まず、ニューロンの種類(錐体細胞と介在細胞)を判定するため、各クラスタの電位波形よりスパイク幅(活動電位波形のピーク-トラフ時間)とバーストインデックス(自己相関解析で3-5 msピン内のスパイク数と200-300 msピン内のスパイク数との比)を算出し、それらの分布様式からニューロンタイプを決定した(図3参照)。次に、クラスタごとにタイムスタンプを作製した。直線走路上の位置を長軸方向に沿って320分割、また短軸方向に沿って50分割し(1ピクセルは一辺が約13 mmの正方形)、サルがそれぞれのピクセル内に滞在しているとき(頭部の高輝度領域(点灯豆電球)の重心位置として算出)の各クラスタでの平均放電頻度(総放電数/総滞

在時間)を求め、放電頻度マップを作製し場所応答の有無を判定した(図4参照)。さらに、ニューロン活動の周期性の有無は、各クラスタの全記録時間中の活動を用い、自己相関解析(ピン幅, 2 ms;時間窓, 0.5 s)により決定した(図5参照)。また、眠っているサルの海馬 CA1 領域からニューロン活動を記録し、REM睡眠中と non-REM睡眠中の活動特性についても検討した。

#### (5) 内側中隔核の位置同定とテトロードの埋め込み

海馬 CA1 領域での活動記録終了後、まず留置していた電極をすべて抜去した。次に、誘発電位マッピングデータに基づき歯状回門部に刺激電極を埋め込んだ。ガラス被覆タングステン電極を垂直から内外側方向に10度の角度をつけ、中隔核にむけて刺入し、歯状回を電気刺激しながら記録電極を200 $\mu$ mステップで深部方向へ移動し誘発電位(電場電位とユニット活動)を記録した。その際、短潜時のユニット活動が記録されたら、ユニットの自発放電に同期して歯状回を刺激した

(collision test)。この操作を、電極の刺入点を内側から外側に移動しながら数トラック繰り返した。内側中隔核は歯状回門部(特に顆粒細胞層に近い多形細胞層)に強い線維投射を送るので、理論上、collision test 陽性(自発放電による順方向スパイクと歯状回刺激による逆方向スパイクが軸索の途中で衝突すると、活動電位の伝導がそれ以降なくなるので逆行性スパイクが記録されなくなる)ニューロンの位置から内側中隔核の脳定位置座標を決めた。ガラス被覆タングステン電極を抜去後、可動式テトロードを内側中隔核直上の脳定座標に埋め込んだ。

上記の CA1 領域での記録と同様、まず軽麻酔下で明瞭かつ安定したニューロン活動が内側中隔核で記録されることを確認し、次にそのままサルが覚醒するまで麻酔下での活動記録を継続した。記録したニューロン活動をクラスタ分類後、クラスタごとに自己相関解析により周期性発火の有無を調べた。

#### (6) 組織学的検索

各動物は、予定したすべての記録実験を終了後、記録部位とその周辺に通電により微小破壊巣を作製した。脳を灌流・固定後、脳組織標本作製し記録部位を同定した。

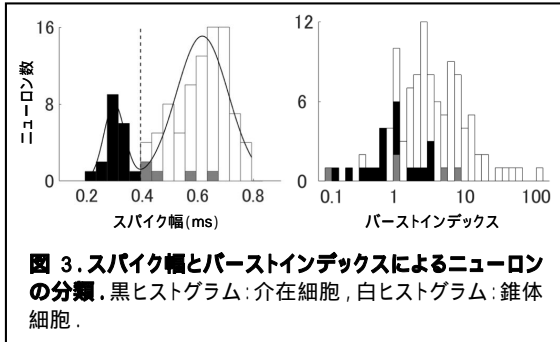
### 4. 研究成果

#### (1) 海馬 CA1 領域ニューロンのタイプわけ

本研究では総数107個のニューロンを海馬 CA1 領域およびその近傍から記録した。

これまでのげっ歯類動物を用いた海馬 CA1 領域のニューロンタイプに関する研究より、錐体細胞は比較的スパイク幅が広くバースト発火を示す傾向があり、一方、介在細胞はスパイク幅が狭くバースト発火しない(比較的規則正しい時間間隔で発火する)ことが報

告されていた。本研究でも、げっ歯類動物で行なわれていたのと同じ解析を試みたところ、図 3 に示すようにスパイク幅が広く (0.4 ms 以上) バースト発火傾向の強いニューロン集団 (錐体細胞と推定される細胞 83 個) とスパイク幅が狭く (0.4 ms 未満) バースト発火傾向の弱いニューロン集団 (介在細胞と推定される細胞 24 個) に分けることができた。



## (2) 海馬 CA1 ニューロンの場所応答

本研究で記録した 83 個の錐体細胞中 17 個が場所応答を示した (場所細胞). 図 4 には 2 個の場所細胞の活動例を示してある. 図 4A

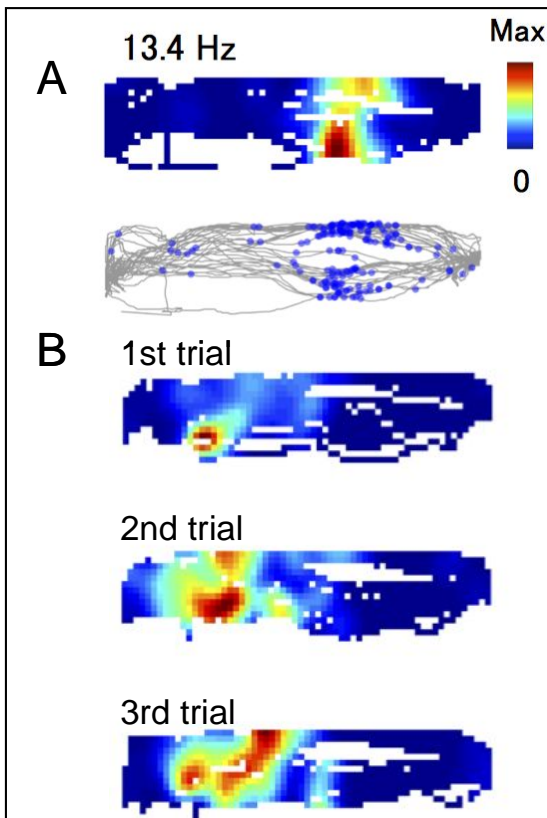


図 4. サルの場所細胞.

A 上: 放電頻度マップ; A 下: サルの移動軌跡 (灰色の線) 上にプロットしたニューロン発火 (青ドット). 放電頻度マップ直上の数字: 最大発火頻度. および , それぞれペレットディスベンサ1およびペレットディスベンサ2  
B: 場所応答の試行間安定性.

の下のパネルにはサルの移動軌跡 (灰色の線) とニューロン発火 (小さな青丸) を示してあるが、サルは往復移動時にディスベンサ

の 1 から 2 への移動時と 2 から 1 への移動時でわずかに違う経路をとった (上の灰色線集団と下の灰色線集団の間に空白部分があることに注意). しかし、このニューロンはいずれの方向の経路でもサルが中央から右方向 4 分の 1 を通過しているときに活動した. 従ってこのニューロンは、サルの移動経路には依存せずにサルの居場所を符号化している細胞であると考えられる.

各ディスベンサは最大 17 個のペレット (報酬) を充填できるので、17 往復を 1 試行とみなすことができる. 図 4B には、海馬 CA1 場所細胞応答の試行間安定性を示してある (これは図 4A とは異なる場所細胞の例). このニューロンでは、場所応答強度は 3 試行間で多少違いはあるが (試行が進むと強くなる傾向がある), 一貫して左下方の場所で強く活動していた.

## (3) 場所細胞の周期性活動

研究の背景でも述べた通り、げっ歯類動物を用いた研究より、場所細胞は動物が歩行移動しているときにシータ帯域で顕著な周期的活動を示すことが知られている. そこでわれわれは、げっ歯類動物の研究と同様の解析を海馬 CA1 の場所細胞にも適用してみた. 図 5 にはその結果を示してある. 図 5A は今回記録した多くの場所細胞で見られた自己相関グラム (自己相関) の典型例であるが、多峰性ピークの出現がなく、周期性がないことがわかる. また周期性の検出された少数の場所細胞でも (図 5B), 周期性の程度は弱く、また周波数帯もシータ帯域 (4-8 Hz) より低かった (2-3 Hz のデルタ帯域に相当).

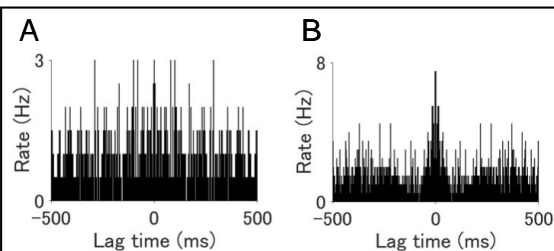


図 5. サル海馬ニューロン発火の自己相関解析.

A: 場所細胞の典型的な自己相関グラム.

B: 記録した中で最も強い周期性を示した場所細胞の自己相関グラム.

## (4) 内側中隔核ニューロンの周期性活動

今回、collision test により内側中隔核と同定した領域から 7 個のニューロンの活動を、サルが麻酔をかけられた状態および覚醒状態で記録したが、シータ帯域で明瞭な周期性活動を示す細胞はなかった.

## (5) 睡眠下のサルでのニューロン活動記録

げっ歯類動物、ウサギ、ネコ、イヌ等の哺乳類動物では、REM 睡眠中に海馬とその周辺領域に比較的明瞭なシータ波が出現することが知られている. またげっ歯類動物を用いた研究より、REM 睡眠中に海馬や内側中隔核

ニューロンがシータ帯域で周期性活動を示すことも明かにされている。本研究では眠っているサルの海馬 CA1 領域から 6 個のニューロン活動を記録したが、REM 睡眠中にはいずれも覚醒時よりも活動が抑制され、周期性活動を示すものはなかった。一方これらニューロンはすべて、non-REM 睡眠中には活動が覚醒時よりも高まったが、シータ帯域で周期性活動は示さなかった。

しかし、この CA1 ニューロン数 (6 個) はサンプルサイズとしては不十分であり、また睡眠下での内側中隔核ニューロン活動に関するデータも得られていない。現在新たに 1 頭のサルの馴化および行動訓練を終了し、睡眠下でのニューロン活動記録実験の準備を進めているところである。

#### (6) 研究成果の総括

本研究ではまず、サルが直線走路上を往復移動しているときに海馬 CA1 領域から 107 個のニューロンの活動を記録した。これらニューロンは、スパイク幅とバースト発火特性より錐体細胞と介在細胞に分類された。錐体細胞の約 2 割が場所応答性を示したが (場所細胞) これらニューロンは徐波帯域での明瞭な周期性発火を示さなかった。次に麻酔状態または覚醒状態のサルの内側中隔核から 7 個のニューロンの活動を記録したが、やはり徐波帯域で周期性活動を示すニューロンはなかった。さらに、サルが眠っているときに、海馬 CA1 領域から 6 個のニューロンを記録したが、いずれも周期性活動を示さなかった。

本研究で、サルの海馬にも場所細胞が存在したことから、霊長類でもこれらニューロンの集団活動が空間認知地図を形成していると思われる。一方、げっ歯類動物では最も明瞭に周期性徐波が観察される条件である歩行移動時や REM 睡眠中にも、サルの海馬や内側中隔核のニューロンは周期性活動を示さなかったことから、霊長類中隔 - 海馬系ではげっ歯類とは異なる、動物種特異的な空間情報の符号化メカニズムがあることが示唆された。

#### 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 2 件)

Sugimori M, Hayakawa H, Boman BM, Fields JZ, Awaji M, Kozano H, Tamura R, Yamamoto S, Ogata T, Yamada M, Endo S, Kurimoto M, Kuroda S: Discovery of power-law growth in the self-renewal of heterogeneous glioma stem cell populations. PLoS ONE 10, e0135760, 2015. doi.org/10.1371/journal.pone.0135760. 査読あり

Nakata R, Eifuku S, Tamura R: Effects of tilted orientations and face-like

configurations on visual search asymmetry in macaques. Anim Cogn 17: 67-76, 2014. doi: 10.1007/s10071-013-0638-7. 査読あり

##### [学会発表](計 6 件)

間祐 太郎, 田村 了以: 自由行動下におけるサル海馬ニューロンの場所応答性. 第 94 回 日本生理学会大会, 2017 年 3 月 28-30 日, 浜松.

間祐 太郎, 田村 了以: サル海馬の神経活動-場所相関. 第 62 回 中部日本生理学会, 2016 年 11 月 4-5 日, 岡崎.

間祐 太郎, 田村 了以: サル海馬ニューロンの場所応答性. 第 25 回 海馬と高次脳機能学会, 2016 年 10 月 1-2 日, 京都.

田村 了以: 記憶形成保持の神経機構. 埼玉県川越市学術講演会, 2015 年 12 月 3 日 川越. 招待講演

田村 了以: サル海馬 CA1 領域の神経活動と睡眠ステージとの相関. 第 63 回 中部日本生理学会, 2015 年 11 月 13-14 日, 富山.

田村 了以, 西田 悠, 永福 智志: サル海馬脳波の睡眠による変化. 第 61 回 中部日本生理学会, 2014 年 11 月 7-8 日, 名古屋.

田村 了以, 西田 悠, 永福 智志: サル海馬の電場電位と睡眠ステージ. 第 23 回 海馬と高次脳機能学会, 2014 年 10 月 11-12 日, 金沢.

##### [その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/ins/index-j.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田村 了以 (TAMURA, Ryoji)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号: 60227296