

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成30年度

受付番号 201860198

氏名 長内 尚之

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ダラス（国名：アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
脳深部標的部位における高時間分解能計測操作システムの開発と嗅内皮質回路への応用
3. 派遣期間：平成 30年 6月 1日 ~ 令和 2年 5月 31日
4. 受入機関名及び部局名
University of Texas Southwestern Medical Center, Psychiatry department
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

1. 研究の目的

本研究は、エピソード記憶学習過程における嗅内皮質回路の動態解明を目的としている。脳深部に位置する大脳嗅内皮質は、記憶形成に重要な役割をもつ海馬と直接結合し、他の皮質と同様に6つの層を持つ。これまで、嗅内皮質の各層は均一な構造をしていると信じられてきたが、最近の研究によりII層には遺伝子レベルで異なる2種類の興奮性神経細胞が存在することが発見され、新たに見出された細胞集団「アイランドセル（島細胞）」は、クラスター状の特徴的な構造を形成していた。さらに、島細胞は嗅内皮質III層の神経細胞（III層細胞）の活動を抑え、テンポラルアソシエーション学習（TAL）と呼ばれる、時間差のある2つの出来事を1つのエピソードとして記憶する機能を抑制することが明らかになった[Kitamura, et al., 2014]。しかし、記憶形成過程で嗅内皮質回路がどのような動態を示すかは不明である。申請者は、TAL学習過程において島細胞の各クラスターは機能単位として働き、他クラスターや他層神経細胞と競合しながら海馬に情報を送信するという独自の仮説を立てた。このことを検証するためには、個別の島細胞クラスターの神経活動を正確に記録しつつ操作することが重要である。しかしながら、一般にイメージング技術単体では電気生理学的手法と比べて時間分解能が劣るため、神経活動の同期性といった精密な神経回路動態計測が困難である。本研究では、脳深部標的的部位における計測操作システムを開発（実験1）し、嗅内皮質回路の動態解明に応用（実験2）する。

2. 研究実施状況

実験1 脳深部における計測操作システムの開発

嗅内皮質-海馬 CA1 神経回路に注目し、嗅内皮質-海馬 CA1 の二つの脳領域を同時に計測する方法を確立した。具体的には、2領域の同時計測および光刺激が可能なマイクロドライブを設計・作成し、マウス嗅内皮質および海馬 CA1 に応用した。

一般に、*in vivo* の電気生理学計測ではテトロードやシリコンプローブが用いられることが多く、これらの電極はそれぞれ異なるメリット・デメリットがある。テトロードは多くのシングルユニットを取得することが可能である一方、神経活動(スパイク、局所電場電位(LFP))の空間的な分布を正確に取得することが困難である。一方、シリコンプローブは神経活動の正確な空間分布を取得できるが、テトロードよりもスパイクソーティングの精度は悪い。加えてシリコンプローブは高価で壊れやすいというデメリットがある。そのため実験の目的によって使用する電極を選択することが望ましいが、従来の電極埋め込みに使用されるマイクロドライブは、シリコンプローブかテトロードのどちらか一方しか用いることができない。テトロードとシリコンプローブを併用可能なマイクロドライブを作成できれば、実験の目的にあわせて電極を選択することが可能になる。また、光刺激を可能にするにはマイクロドライブに光ファイバーを保持する機構を持たせなければならない。本実験では、テトロードとシリコンプローブを併用可能で、光刺激が可能なマイクロドライブを新たに設計した。設計したマイクロドライブは、実験後にシリコンプローブを再利用することが可能であり、実験当たりのコストを下げることができる。本実験の結果は *Journal of Visualized Experiments* に投稿され、2019年にアクセプトされた(Hisayuki Osanai, Takashi Kitamura, Jun Yamamoto, *Journal of Visualized Experiments*, e60028, 2019)。

結果：

テトロードとシリコンプローブを併用可能なマイクロドライブを設計・作成した(図 1A, B)。作成したマイクロドライブの重量は 5.9 g と十分軽く、埋め込み手術後のマウスの walking, grooming, feeding などの行動に大きな影響は見られなかった(図 1Ca)。加えて、埋め込んだ電極は実験後に回収することが可能であることを示した(図 1Cb)。次に、海馬 CA1 にテトロード(9 channel)、嗅内皮質にシリコンプローブを刺入し、linear track 上で行動中のマウスから LFP を取得した。マウスは 30 分の間に 7 回 linear track を往復しており、走行中も目立ったノイズなく LFP が取得された(図 2)。よって、作成したマイクロドライブを用いて自由行動下のマウスの電気生理計測が可能であることが示された。さらに、光刺激を行うために嗅内皮質III層細胞特異的に Cre を発現するマウス(pOxr1-Cre)を用い、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて青色光照射で神経活動を誘発する ChR2-YFP をIII層細胞に発現させた(図 3A)。このマウスの海馬 CA1 にテトロード、嗅内皮質に光ファイバーを接着したシリコンプローブを刺入し、スパイク活動(図 3B, C)および LFP (図 3D)を記録した。光ファイバーから青色光を照射したところ、ま

ず嗅内皮質で、遅れて海馬 CA1 で誘発活動が観察され、作成したマイクロドライブが光刺激実験にも応用可能であることを示した。以上より、嗅内皮質・海馬 CA1 の二つの脳領域を同時に計測しつつ操作する方法を確立した。

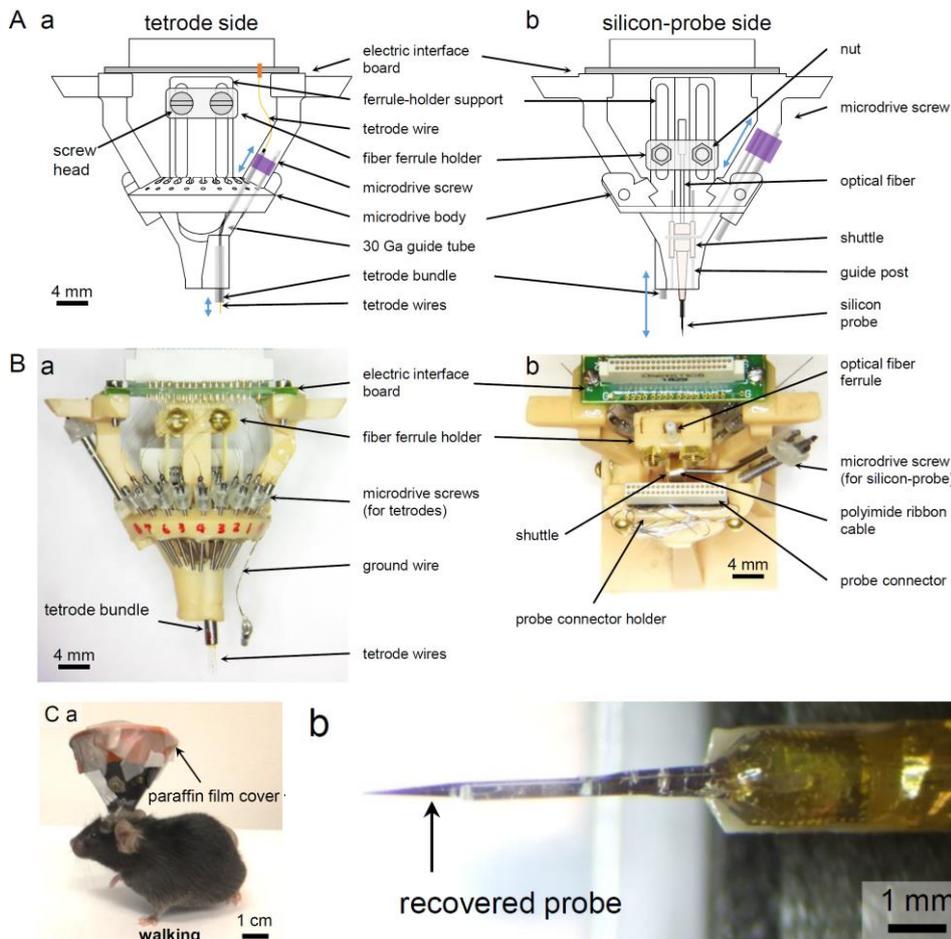


図 1 設計したマイクロドライブおよび実験終了後に回収したシリコンプローブ

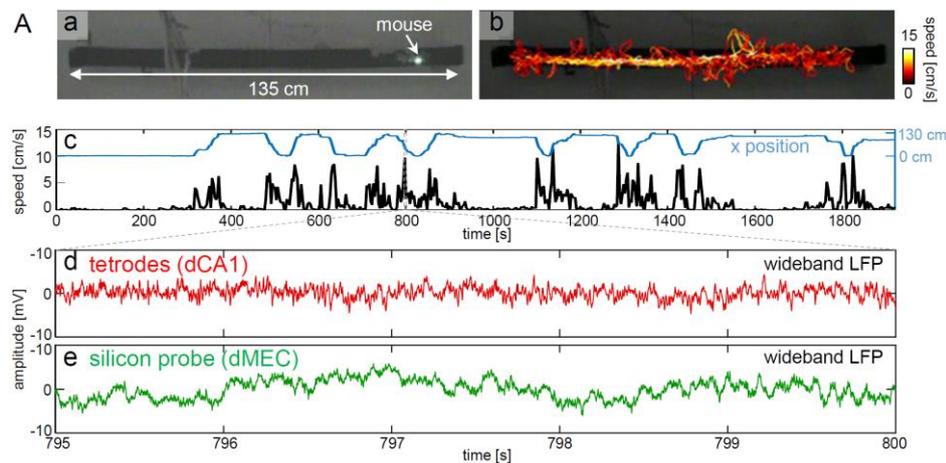


図 1 自由行動下(linear track)のマウスの神経活動記録

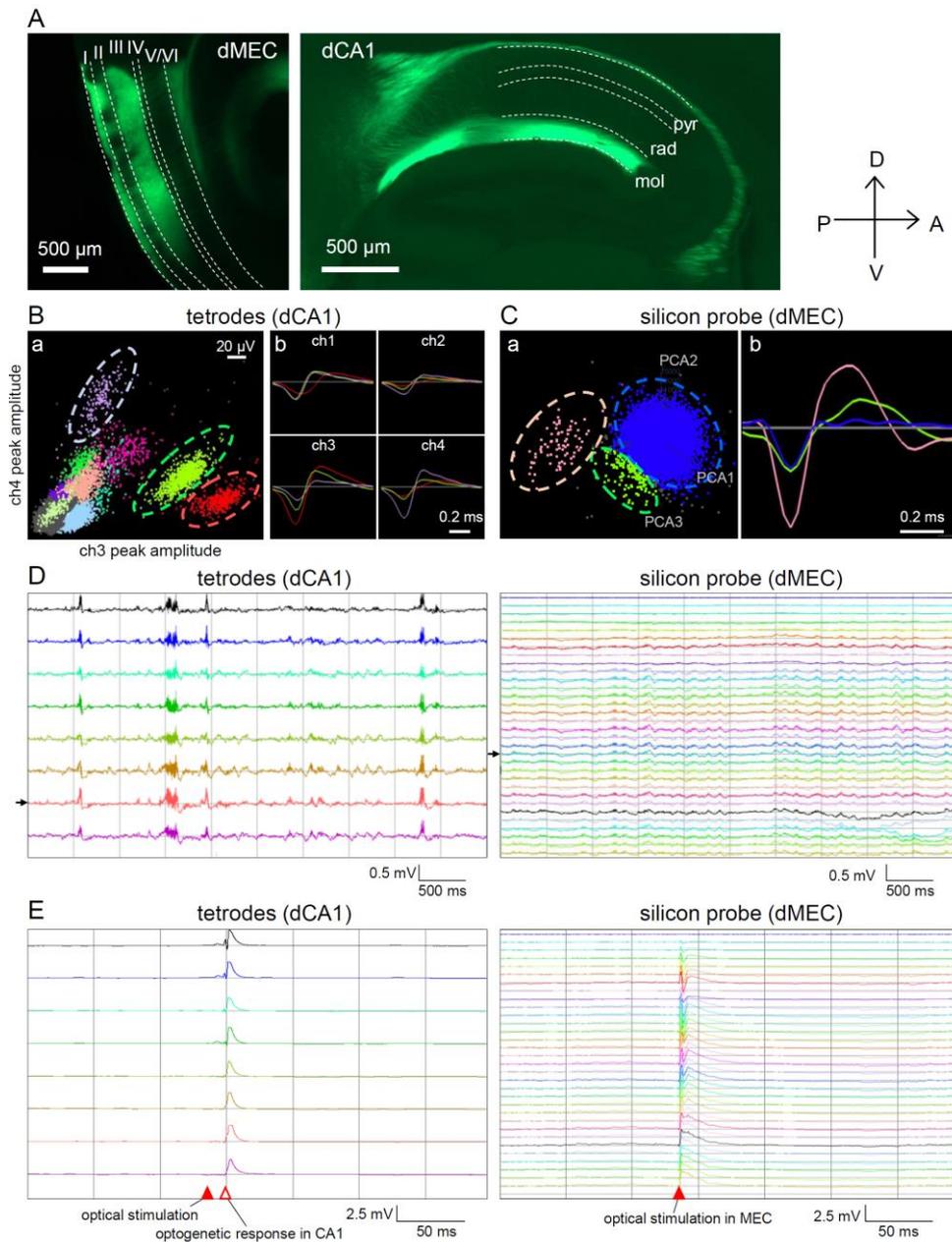


図2 Spike, LFP 計測および光刺激応答の計測

実験2 嗅内皮質-海馬 CA1 神経回路の動態解明

海馬 CA1 は、CA3、嗅内皮質III層細胞、島細胞などの複数の脳領域からの軸索投射を受けている。これまで、局所脳領域における神経活動計測から、LFP のオシレーション活動はスパイク活動の発生タイミングを制御し、記憶・学習に密接に関わっていることが示されてきた。しかし、複数の脳領域からの入力があるがどのように下流の脳領域活動に寄与するのかが明らかではない。現在、記憶・学習の過程で嗅内皮質III層細胞、島細胞がどのように下流の脳領域の活動に影響を与えるのかを調べるために、実験1で開発したデバイスを用いて Temporal Association 学習中のマウス海馬 CA1 での LFP を測定し、島細胞・嗅内皮質 III 層細胞を抑制したときに LFP に表れる影響を調査している。