

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 201860573

氏 名

山本直樹

(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: テキサス州ダラス市 (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違わないように記載すること。

過去の出来事と現在の状況を統合し意思決定に導く神経回路基盤の解明

3. 派遣期間: 令和 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

テキサス大学サウスウエスタン医学センター 精神医学部門

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)

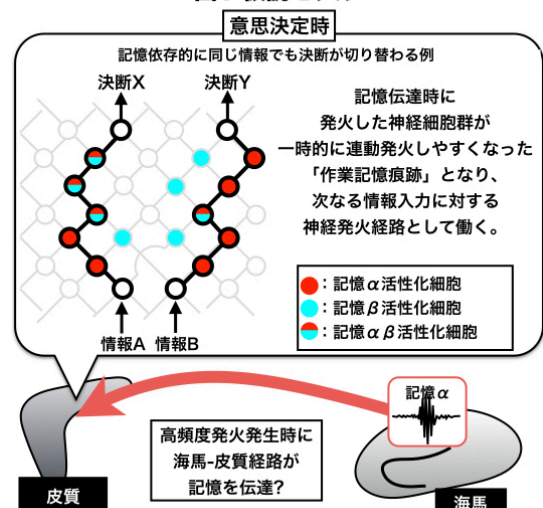
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(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。

<研究計画の概要>

本研究は脳内における過去と現在の情報統合基盤となる神経回路・神経活動を、海馬と皮質の情報伝達に着目して明らかにすることを目的としている。脳部位の物理的破壊や神経活動阻害実験より、海馬-皮質経路は過去の出来事である記憶情報と新たな入力情報の統合の場として古くから研究が行われている。しかしその情報伝達経路や、それぞれの領域で記憶と新規情報を統合される神経回路基盤については殆ど明らかになっていない。申請者は、HPC で高頻度発火が生じた瞬間にマウスが記憶を「思い出す」ことや(Yamamoto et al., Cell, 2014)、HPC で生じる高頻度発火は過去の出来事情報を含むことから(Foster et al., Nature, 2006)、HPC での高頻度発火が起点となり記憶情報が皮質に伝達されているのではないかと考えた。さらに、HPC の記憶情報を伝達された皮質領域の細胞群にシナプス可塑性の変化が生じた結果、一時的に連動発火しやすくなり、次なる情報入力に対する神経発火経路の一部になることが脳の情報統合を支える神経基盤となり得るのではないかと考えた(図1 仮説モデル)。本研究の目的を達成するため、記憶依存的な意思決定課題である T 字迷路課題中のマウスの海馬と大脳皮質から同時に神経活動を検出記録する。さらに、遺伝子工学的手法により特定の細胞種/神経回路に光感受性イオンチャネルタンパクを発現させ、特定の神経活動や神経回路と行動の因果関係を検証する。

図1 仮説モデル



<要約>

申請者のこれまでの主たる研究背景は分子生物学であるため、研究計画の実現に不可欠な基礎的な神経科学的手法の習熟、神経生理学的なデータの解析技術の習得と解剖学的知識の蓄積が必須となる。そのため、初年度はこれらの実験/解析技術の習熟と知識の蓄積を行うとともに、予想されうる研究遂行上の課題について予備検討を行った、本年度は、テトロードとシリコンプローブを併用した自由行動下での複数脳領域からの神経活動の同時検出と、高頻度発火時のリプレイ解析を試みた。海馬からはテトロードによる高頻度発火時のリプレイ解析に成功した。一方で、皮質に挿入したシリコンプローブを挿入して、高頻度発火のリプレイ解析を行う予定であったが、皮質の細胞数密度が想定より低く、リプレイ解析に十分な細胞数を得ることが困難であることが予備実験によって明らかになった。申請者は皮質から十分な細胞数が検出できなかった場合を想定して、初年度より検討していたカルシウムイメージング解析を代替案として採用した。自由行動化での空間探索中のプリズムレンズによる嗅内野のカルシウムイメージングとそのデータ解析パイプラインを樹立した。今後はカルシウムイメージングとテトロードを用いた同時的神経活動の検出を行い、海馬の高頻度発火発生時に皮質領域で活性化した神経細胞群の同定をすすめるとともに、十分な細胞数を確保するために超高密度プローブである Neuropixel の導入を予定している。

<研究実施状況>

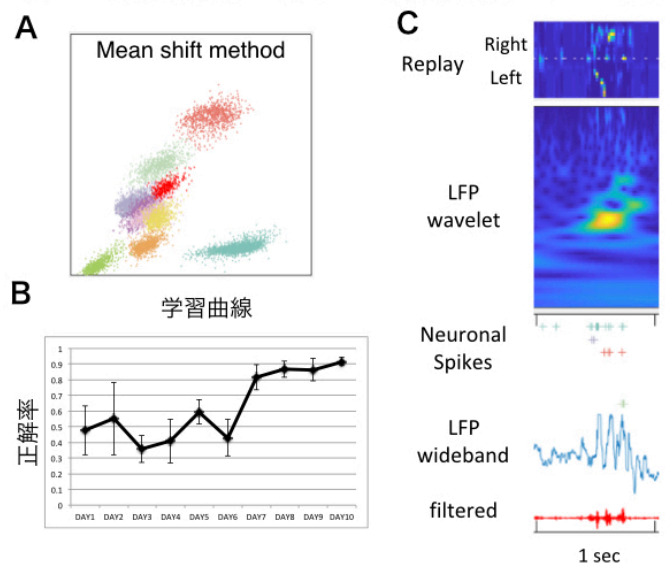
研究項目 1：テトロードを用いた海馬 CA1 高頻度発火のリプレイ解析

目的：T 字迷路課題中の海馬 CA1 高頻度発火のリプレイ解析技術の習得

実験：マウス腹側 CA1 にテトロードを刺入するためのマイクロドライブを 3D プリンターによって作成し、その後作成したマイクロドライブを成体マウスに設置手術を行う。マウスの回復を待って、CA1 からの細胞シグナルの検出を行い、海馬腹側 CA1 の錐体細胞層からの単一神経シグナルが検出できたマウスに対し、記憶迷路課題である T 字迷路を学習させた後、不動中の高頻度発火のリプレイ解析により、そこに含まれる場所記憶情報を可視化した。初年度同様マイクロドライブの作成/施術に関しては北村研に在籍する山本純準教授の協力の元行い、マイクロドライブの設計データは同じく北村研に在籍する長内尚之研究員が既に設計したものを用いた。また、テトロードのデータ解析は山本純準教授と大村佳之研究員の協力の元行った。

結果：マイクロドライブの設置施術後、異常行動が見られないまでにマウスが回復させることができた。回復を待つ間、テトロードをゆっくりと下降させ、腹側 CA1 の錐体細胞層から神経活動を検出できた。さらに、Mean shift 法を用いたスパイクソーティング解析によりそれぞれの神経細胞活動を単離することができた (図 2A)。約一週間のトレーニングの後、マウス腹側 CA1 にテトロードを刺入したマウスは T 字迷路課題を 80%の成功率で行えるように学習した(図 2B))。錐体細胞層からの高頻度発火を検出し、ベイズ推定を用いたリプレイ解析により、高頻度発火発生時の海馬 CA1 錐体細胞が場所情報をコードしていることを確認できた (図 2C)。

図2. T字迷路課題中の海馬CA1高頻度発火のリプレイ解析



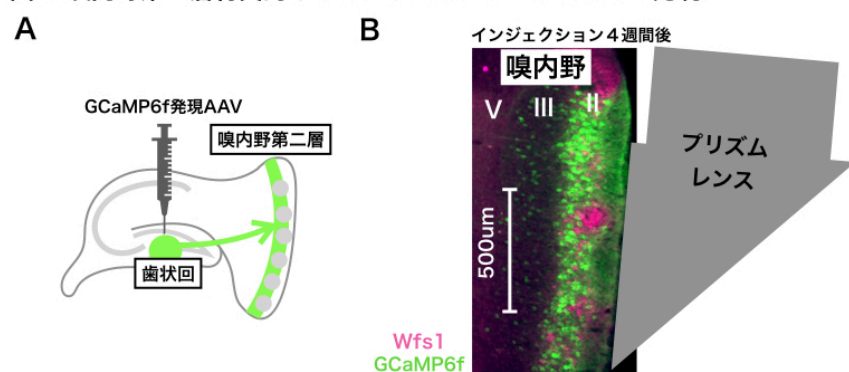
研究項目 2：嗅内野第二層への特異的 GCaMP6 の発現

目的：予備実験から、予定していたシリコンプローブではの高頻度発火のリプレイ解析に十分な細胞数を皮質から得ることが困難であることが明らかになった。そのため、代替案として長期間安定して神経細胞の活動を得られる Miniature Microscope を用いたカルシウムイメージングを推し進めた。

実験：シリコンプローブの挿入を予定していた海馬との相互に投射しあう嗅内野をカルシウムイメージングの対象脳領域として選んだ。また、カルシウムイメージングで用いるレンズのサイズは 1mm 程度もある巨大なものであり、記憶に関わる神経回路に与える影響を最小限にしたイメージングのために、小脳側から大脳にダメージを与えずにプリズムレンズを差し込み、嗅内野の表面からレコーディングを行うこととした。自由行動下でのカルシウムイメージングに用いるカメラの焦点深度の関係から、表層から浅く細胞密度も高い嗅内野第二層をイメージングの対象と決定した。嗅内野の表面からのカルシウムイメージングの際、嗅内野第三層からのバックグラウンドノイズを現象させるため嗅内野第二層選択的にカルシウムセンサーGCaMP6 を発現させる必要があった。そのため、human synapsyn1 プロモーター下でGCaMP6f 遺伝子を発現する AAV5 が軸索からの逆光的に感染することを利用し、AAV を海馬歯状回にインジェクションを行い、カルシウムセンサーGCaMP6 を海馬歯状回に投射する嗅内野第二層の細胞特異的に発現させることを試みた。

結果： AAV5-Syn-GCaMP6 を海馬嗅内野にインジェクションすることにより、嗅内野第二層で海馬 DG に投射している Wfs1 を発現しない Reelin+星状細胞に特異的に GCaMP6 を発現させることができた (図 3A, B)。

図3. 嗅内野第二層特異的なカルシウムセンサーGCaMP6の発現



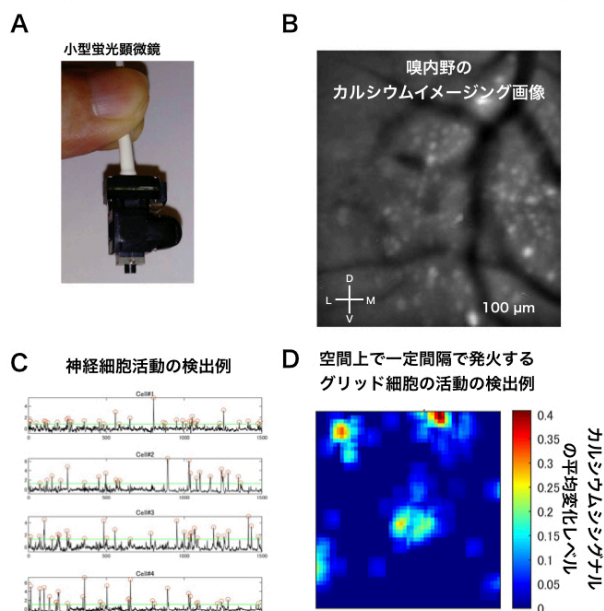
研究項目 3：プリズムレンズによる自由行動下のマウスからのカルシウムイメージング

目的： GCaMP6 を嗅内野第二層に発現させたマウスからのカルシウムイメージング。

実験：神経回路に与える影響を最小限にするために、小脳を少しだけ吸引した後、プリズムレンズを用いて嗅内野表面からインプラントを行った。その後、カルシウムイメージングが正常に行われていることを確認するために、インプラントしたマウスにオープンフィールドを探索させ、嗅内野第二層に多く存在するマウスが空間を等間隔の格子状に区切った場所を通過する際に発火するグリッド細胞が検出されるか検証した。

結果：初年度はレンズインプラント後にマウスが死亡してしまうことが多かったが、本年度は技術的に安定し、術後にマウスが死亡することはないようになった。また、インプラントしたマウスに小型蛍光顕微鏡を用いて広い視野から神経細胞が確認できた (図 4A, B)。また、データ解析の結果、神経活動がみられた神経細胞を百細胞以上同定することに成功した (図 4C)。さらに、マウスが空間探索中の神経活動のデータを解析し、空間上での神経活動の自己相関係数が高いグリッド細胞を多く検出することができ、嗅内野から信頼ある神経活動が検出できていることを確認できた (図 4D)。

図4. 嗅内野のカルシウムイメージングとグリッド細胞の検出



＜派遣期間中の研究成果の発表、学会への参加状況＞

本年度は、初年度に設計したマイクロドライブを使用し、計画通り T 迷路課題中のマウスに対するテトロードによる単神経細胞活動の検出や、高頻度発火解析を行った。一方で、嗅内野に挿入したシリコンプローブからでは高頻度発火解析に十分な細胞数を検出することができないことが、研究室内の予備実験から明らかになったため、ため、初年度に解析に十分な細胞数を得られない場合のバックアッププランとして準備していた Miniature Microscope を用いたカルシウムイメージングの実現を推し進め、百以上の信頼できる細胞活動シグナルを検出することに成功した。さらに、最新の超高密度プローブである Neuropixel の導入による問題点の直接的打開も検討しており、若干の遅れはあるものの、所期計画は着実に遂行されている。二年間の間に本研究テーマでの研究成果を学会で発表は行っていないが、テキサス大学の Mark Henkemeyer 教授と共同研究から嗅内野構造の形成に関わる遺伝子の同定に成功し、その成果発表を 2019 年北米神経科学会にて申請者がポスター発表を行った。また、本研究テーマの問題点に関しても申請者が計画している Neuropixel の導入準備について複数の研究者より助言をいただくことができ、次年度の研究計画の遂行にとって有益であった。