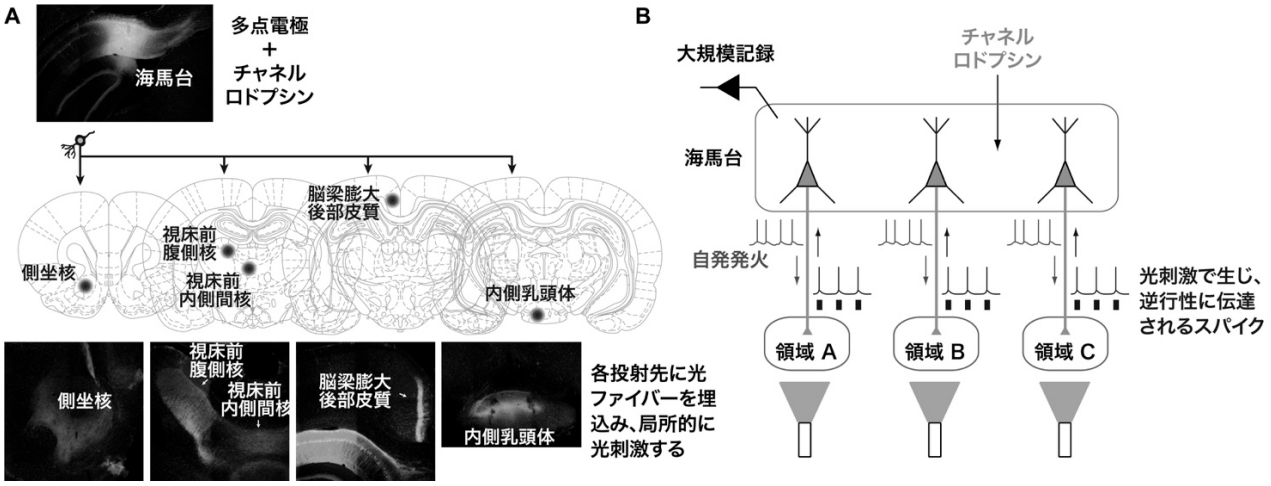
96　海馬における経路特異的な情報処理機構の解明	水関　健司

【目的】記憶に重要な海馬からの出力の大部分が海馬台と呼ばれる脳領域から出るが、海馬台からどのような情報がどの脳領域へ送られているのかは全く分かっていない。本研究ではまず、光遺伝学と大規模記録法を組み合わせることで、自由行動中のラットから同時に記録している 100 個程度の神経細胞を投射先によって分類する技術の開発を目指した。この技術を使って、海馬台からどのような情報がどの脳領域へ伝達されるのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】海馬台の神経細胞を投射先脳領域により分類する目的で、アデノ随伴ウイルスを使って海馬台の主細胞にチャネルロドプシンを発現させた。自由行動中のラットの海馬台で大規模記録を行いつつ、投射先脳領域で光刺激を行い、チャネルロドプシンを発現している軸索で生じて逆行性に伝達されるスパイクを海馬台で記録した。

【結果】投射先脳領域を光で局所的に刺激して、軸索で生じて逆行性に伝達するスパイクを海馬台で記録することで、自由行動中のラットから大規模記録法で記録している海馬台の個々の神経細胞を投射先により分類することができた。この方法を用いて、投射先を同定した海馬台神経細胞の活動を複数の行動課題中に記録し、どのような情報を表現している神経細胞がどの脳領域へ投射しているのかを調べるシステムを構築することができた。

多点電極を用いた大規模記録法と光遺伝学的手法の融合による海馬台神経細胞の投射先同定法



96. 海馬における経路特異的な情報処理機構の解明

水関　健司

大阪市立大学 大学院医学研究科 神経生理学教室

Key words : 海馬，海馬台，記憶，光遺伝学，脳情報処理

緒　言

脳の情報処理を真に理解するには、どの脳領域からどの脳領域へどのような情報が伝達されるのかを、個々の細胞レベルで詳しく知ることが重要である。海馬は記憶・学習に中枢的な役割を担っており、海馬が様々な脳領域と正しく情報をやり取りすることが記憶や学習に重要であるが、そのメカニズムはよく分かっていない。

2014 年のノーベル生理学賞の対象となった「場所細胞」に代表されるように、海馬は自分のいる場所の情報処理に重要である［1］。しかし、海馬は場所だけでなく、時間・快感・不安・恐怖・報酬・罰など様々な情報を計算していると考えられている［2］。解剖学的には、海馬からの出力の大部分が海馬台と呼ばれる脳領域から出る。そして海馬台の個々の主細胞は、数ある投射先のうちごく少数の脳領域にのみ投射する［3］。このことは海馬台の主細胞が投射先によって特有の情報を伝達している可能性を示唆しているが、海馬台からどのような情報がどの脳領域へ送られているのかは全く分かっていない。その理由としては、第一に、自由行動中の動物を使って脳深部にある海馬から神経細胞の活動を記録するには細胞外記録法が適しているが、従来の方法では記録している細胞の投射先は全く分からなかったからである。第二に、これまでの海馬台の先行研究では、海馬 CA1 領域の情報表現を調べるのに適した場所課題が主に使われており、海馬台での情報表現を調べるのに適した課題が使われていなかったからと考えられる。

そこで本研究ではまず、光遺伝学と大規模同時記録法を組み合わせることで、自由行動中の動物から同時に記録している 100 個程度の神経細胞を投射先によって分類する技術の開発を目指した。さらに、この技術を使って、海馬台の個々の主細胞の投射先と情報表現を比較することで、どの脳領域へどのような情報が伝達されるのかを明らかにすることを目標とした。

方法および結果

実験はすべて大阪市立大学動物実験委員会のガイドラインに従い、実験動物への苦痛を最小限に抑えるための最大限の努力のもとに行なった。

1. 実験動物

日本 SLC より購入した 10〜20 週齢のオスの Long Evans ラットを用いた。実験開始までに 3 日以上のハンドリングを行なった。

2. 行動課題中の電気生理学記録

ラットに行わせる様々な行動課題を立ち上げ、行動中に大規模電気生理学的記録を行うシステムを構築した。具体的にはラット用の迷路を自作し、リニアトラック課題、ジグザク迷路課題、オープンフィールド課題、T 字迷路を用いた左右交代課題を立ち上げた。電気生理学は、Amplipex ltd から購入した大規模記録装置（KJE-1001/512）システムを使用した。電極は NeuroNexus 社から購入したシリコンプローブを用いた。最大 256 チャネルの記録を行い（図 1）、複数の行動課題を同一の実験日に行わせることによって、同じ神経細胞の活動を複数の行動課題中に記録できる実験系を構築した。加えてビデオカメラでラットの行動を観察し、ラットの行動と神経活動の相関を調べることのできるシステムを構築した。

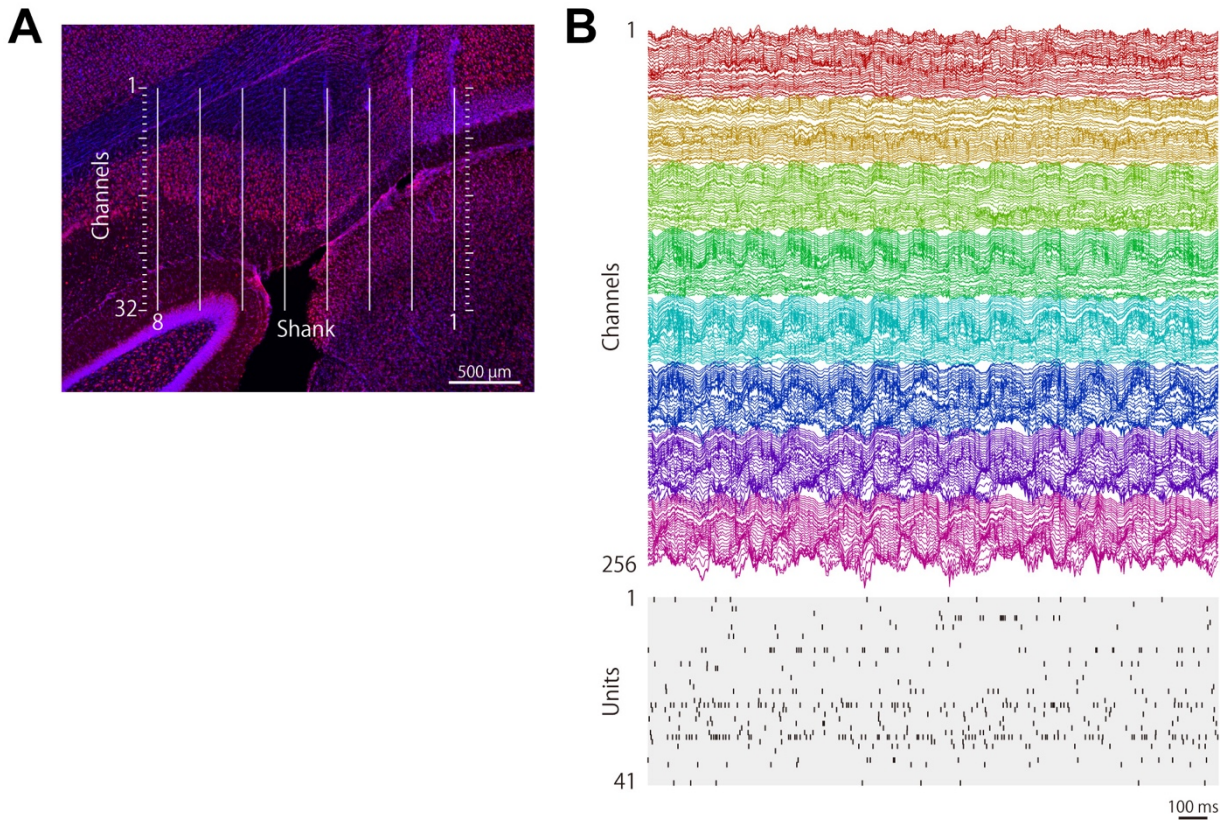


図 1. 256 チャネルシリコンプローブを用いた自由行動中のラット海馬台からの大規模電気生理学記録
（A）ラットの海馬台の切片の組織像。記録のために挿入した 256 チャネルシリコンプローブ（8 シャンクあり、各シャンクに 32 箇所の記録部位がある）の位置を白色で示している。（B）（上）256 チャネル同時記録の生データ。各シャンク 32 チャネルごとに色分けしてある。シータオシレーション（約 8 Hz のオシレーション）が観察される。（下）スパイクソーティングによって検出された 41 個の神経細胞の発火タイミングを示すラスタープロット。

3. 投射先同定実験

リアルタイムの光操作には Tucker-Davis Technologies 社から購入した RX8 マルチ I/O プロセッサを用いて Thorlabs 社の LDC202C 電流供給源をコントロールし、Thorlabs 社の PL450B レーザーダイオードから発せられた光を光ファイバーを用いて照射した。

まずは、シリコンプローブを用いた大規模電気生理学と光遺伝学的手法を組み合わせることで、自由行動中のラットから記録している海馬台の主細胞を投射先により分類する方法を確立することを試みた。具体的には、海馬台の主細胞に光で活性化されるカチオンチャネルであるチャネルロドプシンを発現させ、投射先に光ファイバーを留置して光で局所的に刺激して、チャネルロドプシン陽性の軸索で生じ逆行性に伝達するスパイクを細胞体で記録することを利用して、投射先により主細胞を分類する技術［3］を立ち上げた。そのためには、電極を留置する海馬台の部位と、その海馬台から投射する脳領域の部位を、脳定位的にサブミリメートルの空間精度で知っておく必要がある。そこでアデノ随伴ウイルスを用いて海馬台の主細胞を GFP で標識し、それらがどの脳領域へ投射しているかを詳細に調べた。さらに、それぞれの投射先へ逆行性にラベルする色素またはウイルスベクターを注入し、記録しようとしている海馬台の主細胞が逆行性に染まることを確認した。以上から、海馬台に電極を入れる位置と光ファイバーを入れる位置を頭位固定装置上で決定することができた。

次に、アデノ随伴ウイルスを用いてラットの海馬台の主細胞にチャネルロドプシンを発現させ、海馬台の主要な投射先である視床・側坐核・脳梁膨大後部皮質などに光ファイバーを挿入して、脳領域特異的に青色光で刺激した。これと同時に、海馬台の神経細胞の細胞体から最大 256 チャネルの多点電極シリコンプローブを用いて、動物が記憶課題・空間課題を行っている時に大規模同時記録を行い、100 個程度の海馬体の神経細胞の活動を一斉に計測することができた。チャネルロドプシンを発現している軸索は投射先脳領域で局所的に光刺激されると忠実・高頻度に軸索でスパイクを生じる。それらのスパイクが短い潜時（<15 ミリ秒）と小さなジッター（<1 ミリ秒）で逆行性に細胞体へ伝わることを指標にして、ある特定の領域へ投射している海馬台の神経細胞を同定できた（図 2)。さらに、細胞体と軸索の両方でほぼ同時（数ミリ秒以内）にスパイクが生じた時には、軸索で生じ逆行性に細胞体へ向かうスパイクと、細胞体で生じ順行性に軸索末端へ向かうスパイクが衝突して消滅することを利用した衝突試験［4］を行った。この試験により、投射先脳領域での局所的光刺激によって、シナプスを介してではなく、軸索で生じたスパイクが細胞体へ逆行性に直接到達していることを確かめることができる。衝突試験を行うには、細胞体で生じるスパイクと軸索での光刺激のタイミングがほぼ同時に起こるイベントが多数必要となる。そのようなイベント数を増やすため、神経細胞の発火のタイミングでトリガーして各投射先の脳領域に光刺激を与える系を立ち上げることができた。

この技術を使って、投射先を同定した海馬台神経細胞の活動を前述の複数の行動課題中に記録し、各々の行動課題中にどのような情報を表現している神経細胞がどの脳領域へ投射しているのかを調べるシステムを構築することができた。

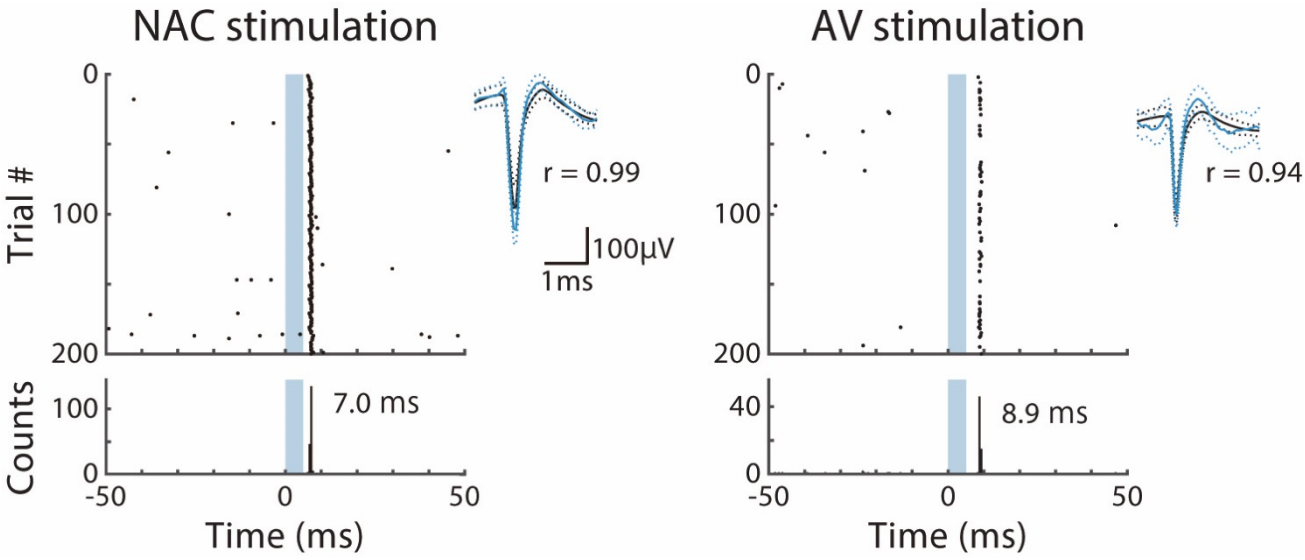


図 2. 光遺伝学的手法による海馬台神経細胞の投射先同定法

海馬台の神経細胞にチャネルロドプシンを発現させ、側坐核（NAC）と視床前腹側核（AV）に光ファイバーを用いて局所的に 5 ミリ秒間の光刺激を 200 回行なった。同時に海馬台で 256 チャネル大規模記録を行い、記録された複数の細胞のうちの 2 つの細胞について、トライアルごとの発火タイミングと、全トライアルの合計のカウントを示す。光刺激によって誘発されたスパイクの平均波形を青、それ以外の自発発火のスパイクの平均波形を黒で示し、両者のピアソン相関係数（r）を示す。左の細胞は側坐核の光刺激によって、右の細胞は視床前腹側核の光刺激によって、短い潜時（7.0 ミリ秒と 8.9 ミリ秒）と短いジッターでスパイクを生じていることから、それぞれ側坐核・視床前腹側核に投射していることが示唆される。

考　察

投射先を光で局所的に刺激して、チャネルロドプシンを発現している海馬台主細胞の軸索で生じて逆行性に伝達するスパイクを細胞体で記録することで、投射先により主細胞を分類する方法を立ち上げることができた。しかし、現在のところ記録している細胞のうち１割程度しか投射先が同定できない場合もあるため、投射先同定の効率を上げるための工夫が必要があると考えられる。具体的には、チャネルロドプシンの発現の効率化、照射する光の強度や照射方法の最適化、電気生理学的記録法のさらなる高密度化・大規模化などを今後行なっていく予定である。さらに、現在の方法では衝突試験を行うために時間がかかりすぎる。そこで、投射先からの光刺激後に短い潜時とジッターでスパイクが生じる神経細胞をオンラインで検出し、その神経細胞の自発発火でトリガーして光刺激を行い、短時間で効率よく衝突試験を行うシステムの構築を試みている。

本研究で開発した技術により、動物が各種課題をおこなう最中に、個々の海馬台ニューロンがどのような情報を表現し、この情報がどの脳領域へ伝搬するかという脳領域間の情報伝達をつぶさに捉えることが可能となった。今後は構築した複数の行動課題を用いて、海馬台の個々の神経細胞の情報表現と投射先を調べることによって、海馬台からどの脳領域へどのような情報が伝達されるのかを明らかにしたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪市立大学大学院医学研究科神経生理学研究室の北西卓磨と同・脳外科学教室の馬場良子である。本研究にご支援を賜った上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げる。

文　献

1) O'Keefe J, Nadel, L. The Hippocampus as a cognitive map. Oxford: Clarendon Press; 1978.
2) Ciocchi S, Passecker J, Malagon-Vina H, Mikus N, Klausberger T. Brain computation. Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons. Science. 2015;348(6234):560-3. Epub 2015/05/02. doi: 10.1126/science.aaa3245. PubMed PMID: 25931556.
3) Naber PA, Witter MP. Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. The Journal of comparative neurology. 1998;393(3):284-97. Epub 1998/04/21. PubMed PMID: 9548550.
4) Saiki A, Sakai Y, Fukabori R, Soma S, Yoshida J, Kawabata M, et al. In Vivo Spiking Dynamics of Intra- and Extratelencephalic Projection Neurons in Rat Motor Cortex. Cerebral cortex. 2018;28(3):1024-38. Epub 2017/02/01. doi: 10.1093/cercor/bhx012. PubMed PMID: 28137723.