

研究報告書

「脳内情報を担う動的回路としての『細胞集成体』の計測と制御」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者： 佐藤 正晃

1. 研究のねらい

脳における情報表現を担う動的回路として、カナダの心理学者 Donald Hebb (1904-85) は「細胞集成体 (cell assembly)」と呼ばれる、協調的に働く神経細胞の集団が随時形成する機能的回路の概念を提唱した。本研究は、Hebb の提唱した「細胞集成体」様回路の時空間的活動パターンを、生きた動物の脳内の多数の神経細胞の位置と活動を高解像度で記録できる in vivo イメージング実験と、バーチャルリアリティ (VR) 技術により顕微鏡下に頭部固定したマウスの環境を自在に操作できる空間学習パラダイムを用いて可視化・制御することで、その動作原理の理解と検証を行うことをねらいとする。

脳で記憶の形成に中心的な役割をもつ海馬の錐体細胞は、動物が空間内のある場所に存在するときのみ発火する「場所細胞 (place cell)」としての活動を示すことが知られている。さらに過去の電気生理学的研究では、動物にある空間を探索させると、覚醒時にみられた海馬の神経活動の時間的パターンが、その後の睡眠時に再現される「リプレイ (replay)」と呼ばれる現象が起こることが報告されている。このことは、動物の覚醒時の経験が、海馬において、複数の細胞からなる「細胞集成体」様回路の活動パターンとして記録されることを示している。このような過去の知見から、本課題では場所情報に関連した海馬の「細胞集成体」活動を研究の対象とする。顕微鏡下に作り出された VR 環境を探索するマウスから、海馬の回路活動の時系列イメージングデータを取得した後、このデータから動物が実際に歩行した軌跡の再構成を行うことで、「神経回路活動」と「個体行動」という異なる階層の知見を統合的に理解する。さらにイメージング中の動物の置かれた環境を VR 技術により操作することで、特定の外界の情報に対応した「細胞集成体」活動を制御し、その形成に関する原理を実験的に検証する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、空間行動中のマウスの海馬 CA1 野における細胞集成体様の機能回路をイメージングするために、蛍光カルシウムセンサータンパク質 G-CaMP7 発現トランスジェニックマウス、ウインドウ埋込による海馬 in vivo イメージング手技、マウス用 VR システム、および大規模イメージングデータの自動解析プログラムなどの技術を総合的に用いて、マウスが VR 環境内に設定された仮想直線路を探索するとき海馬の錐体細胞が示す場所特異的な活動に注目して研究を行った。一つ目の具体目標である細胞集成体活動の計測に関する研究では、脳内で場所情報を表現する細胞集成体様回路の活動ダイナミクスが、短期的には動物の行動が歩行時から安静時へ切り替わる際に、互いに近い場所受容野をもつ細胞同士の活動の相関が高いモードから、離れた場所受容野をもつ細胞同士が同期的活動を示すモードへと切り替わることを明らかにした。また長期的には、行動訓練の初期には変化しやすい場所細胞

地図が、訓練の繰り返しにより次第に安定化されることを見いだした。二つ目の具体目標である細胞集成体活動からの動物の行動状態の再構成に関する研究では、画像データのクラスター解析や線形判別分析を行うことで、CA1野の神経回路の活動状態から動物の行動状態を高い精度で推定できることを明らかにした。三つ目の具体目標である細胞集成体活動の制御に関する研究では、報酬または視覚の手がかりが存在する場所のそれぞれに反応する場所細胞の数が他の場所に比べて増加すること、さらにこのような行動上重要な場所の過剰表現(overrepresentation)が、これらの場所に対して反応する細胞の活動が他の場所に対して反応する細胞よりも選択的に安定化されることで起こることを明らかにした。この結果は、行動に重要な外界の情報が、より持続的に海馬の神経回路に貯蔵されていることを示すものである。

(2) 詳細

具体目標 1: VR環境で空間学習する動物の「細胞集成体」活動の計測

VR空間を探索するマウスの海馬CA1神経回路活動をイメージングすることにより、場所情報を担う細胞集成体活動を可視化してその時空間的なパターンを解析することをねらいとした。ステンレス製のヘッドプレートと皮質下の海馬をイメージングするためのウインドウを頭部に埋め込んだ蛍光カルシウムセンサータンパク質G-CaMP7 発現トランスジェニックマウスを、二光子レーザー顕微鏡下のフレームに固定し、動物の前におかれたモニターに映し出される仮想直線路を探索するときの海馬CA1野錐体細胞層の蛍光画像を10分間程度取得して神経回路活動のイメージングを行った。画像解析は、非負行列因子分解に基づいた解析プログラムを用いて、個々の細胞の輪郭と蛍光強度変化を自動的に抽出した。

解析では、得られた活動時系列データからVR環境における場所特異的活動を計算し、これらの場所細胞が形成する細胞集成体様回路の行動状態依存的な短期ダイナミクスと、経験依存的な長期ダイナミクスの両者を明らかにすることを目指した。その結果、脳内で場所情報を表現する細胞集成体様回路の短期ダイナミクスは、動物の行動が歩行時から安静時へ切り替わる際に、互いに近い場所受容野をもつ細胞同士の活動の相関が高いモードから、離れた場所受容野をもつ細胞同士が同期的活動を示す別のモードへと切り替わることを見出した。また、異なるセッション間の画像から同一の細胞を検出して、その反応性の変化を追跡する解析手法を用いることで、場所細胞地図が長期的には繰り返し訓練により次第に安定化されることを見いだした。

具体目標 2: 「細胞集成体」活動からの動物の行動状態の再構成

具体目標1のイメージング実験で得られた場所細胞活動の時系列データを用いて、動物の行動の状態を計算論的に再構成することをねらいとした。計算に用いる細胞数を変化させて実測の軌跡との誤差を評価し、精度の良い再現に必要とされる細胞数と、それらの細胞群のCA1野内での相互の位置関係などを解析した。イメージング画像の2次元相関に基づくクラスター解析では、動物が歩行しているか、または静止しているかという行動状態を、神経回路活動の状態から最大90%程度の正確さで予測することができた。またフィッシャーの線形判別法を用いて解析すると、ある特定の面積の神経回路に含まれる細胞の活動を考慮した場合

に 2 つの行動状態が最も良く分離できるという結果が得られた。今後はベイズ推定を用いた細胞レベルでの神経情報解読を行っていく予定である。

具体目標 3: VRによる「細胞集成体」活動の制御

海馬には「場所」に関する空間情報と、そこに存在する手がかりなどの非空間情報が共に貯蔵されることが考えられる。そこで、VR環境内に設定した直線路に、報酬として水が得られる地点と、視覚的な目印として緑色の大きなゲートをくぐる地点を設定し、これらの特徴が海馬の場所表現に与える効果を調べた。このような直線路を探索するマウスの海馬の場所細胞地図をイメージングすると、報酬または視覚手がかりが存在する場所のそれぞれに反応する場所細胞の数が他の場所と比べて増加することが明らかになった。このような海馬における行動上重要な場所の過剰表現 (overrepresentation) には、(1) 非場所細胞が場所細胞に変化するときにより多くの場所細胞が形成される(2) もともと別の場所に対して反応していた細胞が、訓練によって重要な場所に対して反応するようになる(3) 重要な場所に対して反応する細胞は、他の場所に対して反応する細胞よりも安定して同じ場所に対して反応するために、訓練によりその数が蓄積する、という3つの可能性がある。そこで同一の細胞の場所表現が連続するセッションでどのように変化するかを解析したところ、(1) または(2) のメカニズムではなく、(3) の選択的安定化により上記の過剰表現が起こっていることが示された。この結果は、行動上重要な外界の情報が、より持続的に海馬の神経回路に貯蔵されていることを示すものである。

3. 今後の展開

内嗅皮質第3層 (EC3) または海馬 CA3 野から海馬 CA1 野への神経入力を操作することで、本研究が明らかにした行動状態依存的な CA1 神経回路の動作モードの切り替えメカニズムを明らかにすると同時に、CA1 回路活動の短期的かつ行動依存的なダイナミクスが、より長期的かつ経験依存的な場所表現の安定化に果たす役割を明らかにする。例えば、EC3 あるいは海馬 CA3 野特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと G-CaMP7 トランスジェニックマウスのダブルトランスジェニックマウスに、Cre 依存的に光感受性イオンポンプを発現するアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入し、この動物が仮想直線路を探索するときの海馬 CA1 野の活動を、それぞれの領野からの神経入力を光抑制した条件下でイメージングする。この行動下のイメージングを繰り返し行い、CA3 野または EC3 からの神経入力の抑制によって安静時の同期活動が消失するか、また訓練による場所細胞の数の増加と場所地図の安定化に変化がみられるかを検討する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

海馬における細胞集成体様神経回路活動の計測と制御を目指した本研究では、特に計測に関する部分については、その短期的なダイナミクスと長期的なダイナミクスの両方を明らかにするなどの成果を上げることができた。しかし、計測実験で得られたデータの解析に予想外

に多くの時間がかかってしまったために、制御に関する部分で研究を十分に進めることができなかった。従って、今後は VR の特徴をより生かした行動パラダイムを用いた実験や光遺伝学などの神経活動操作技術と組み合わせた実験を行うなど、特に制御ということを念頭においた研究へと発展させることを課題としたい。また将来的にはこのような研究の延長線上として、脳疾患の病態解明と治療につながる成果や、ブレインマシンインターフェースの開発などに応用される成果を得ることを目指したい。

(2) 研究総括評価

バーチャルリアリティ下で空間行動するマウスの海馬 CA1 野における細胞集成体様回路の活動をイメージングし、その行動状態依存的な短期的ダイナミクスと、経験依存的な長期的ダイナミクスを解明したことを評価します。また、細胞集成体活動からの動物の行動状態の再構成に関しては、イメージング画像の 2 次元相関に基づくクラスター解析で、神経回路活動の状態から動物の行動状態を、ある程度予測することができるようになったことは、大きな進歩と言えます。

その功績による招待講演も多く、その研究の今後は、注目されています。

今後は、「神経細胞の回路形成を細胞集成体として理解する」の当初からの課題に、どう向き合い、成果を出していくのか、を念頭に研究を進めて頂きたいと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Sato, M., et al., Generation and imaging of transgenic mice that express G-CaMP7 under a tetracycline response element. PLoS One. 2015, 10 (5), e015354 |
| 2. Manita, S. et al., A top-down cortical circuit for accurate sensory perception Neuron 86(5), 1304-1316, 2015 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Masaaki Sato, Kotaro Mizuta, Masako Kawano, Takashi Takekawa, Tanvir Islam, Hiroshi Yamakawa, Yoko Yamaguchi, Tomoki Fukai, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi. "Hippocampal CA1 network dynamics during locomotion in virtual reality" Society for Neuroscience 43rd annual meeting, 2013 年 11 月、米国サンディエゴ

招待講演

1. 佐藤正晃 「生きた脳のはたらきを細胞レベルで見る-海馬セルアセンブリ動態の in vivo イメージング」 第 60 回脳の医学・生物学研究会、2016 年 1 月、名古屋

2. Masaaki Sato "Hippocampal neural circuit dynamics imaged during spatial behavior in mice" 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会・合同大会シンポジウム「各種モデル動物における記憶過程の可視化」、2015 年 3 月、神戸
3. 佐藤正晃 「バーチャル環境下のマウス脳活動イメージング: 記憶回路の動作原理の解明と疾患研究への応用可能性」 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム「新学術領域研究「マイクロ精神病態」「記憶ダイナミズム」2 領域合同若手シンポジウム」、2014 年 12 月、東京
4. Masaaki Sato "Spatial behavior of mice in virtual reality" 第 37 回日本神経科学大会シンポジウム「脳の現実感を操作する - げっ歯類の神経科学におけるバーチャルリアリティの可能性」、2014 年 9 月、横浜
5. 佐藤正晃「二光子カルシウムイメージングを用いた行動中の海馬神経回路活動の可視化」第 87 回日本薬理学会年会シンポジウム『最先端技術による神経回路網の多次元解析と脳内微小環境構造の可視化; 脳疾患の原因解明を目指して』、2014 年 3 月、仙台
6. Masaaki Sato "Visualizing the dynamics of hippocampal circuit activity in vivo" Neuro2013(第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会 合同大会) 企画シンポジウム「海馬-嗅内皮質系における認知記憶情報のダイナミクス」、2013 年 6 月、京都
7. 佐藤正晃 「バーチャルリアリティ環境下におけるマウス深部脳神経回路活動のイメージング」計測自動制御学会 システム・情報部門 学術講演会 2012、2012 年 11 月、名古屋

著作物

1. 佐藤正晃 「深部脳イメージング」医学書院 生体の科学 65(5), 418-419, 2014 年 10 月号