

# 研 究 報 告 書

## 「記憶痕跡活動の可視化が開く記憶の新たな操作法」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月 ~ 2020 年 3 月

研 究 者: 大川 宜昭

### 1. 研究のねらい

ある出来事を経験すると、その経験に応じて脳の特定の神経細胞が活動し、記憶痕跡細胞に変化することで記憶は保持される。そして同じ記憶痕跡細胞が再び活動すると、その記憶が呼び起こされることが明らかとなっている。世界的に一部の研究室では、記憶痕跡細胞の遺伝子操作法と光遺伝学を融合させることで、マウスの記憶痕跡細胞を人為的に活動させて記憶を強制的に呼び起こしたり、逆に活動を抑えて記憶を思い出す想起を止めたりすることが可能となった。私もこれまでに、マウスの 2 つの異なる記憶痕跡細胞を同時に活動させることで、人為的に 2 つの記憶を結びつけることにも成功している。このように、記憶痕跡細胞を操作することで SF 映画のような世界をマウスでは実験できるようになってきた一方で、全神経細胞中の一部の細胞群だけがどのようなルールや学習中の活動パターンで記憶をコードするのか、また記憶がどのような機構で固定化され長期的に維持される状態になるのか、という根本的な疑問は残されたままである。

私は記憶痕跡細胞に特有の活動パターンを観察するという目的のため、遺伝子改変マウスと組み換えウイルスを利用した上述の記憶痕跡細胞の遺伝子操作法と、自由行動中のマウス脳内の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法の融合を試みた。神経細胞は活動すると  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内に流入するため、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化に応じて蛍光を発する蛍光タンパク質を指標に、個々の細胞の神経活動を観察できる ( $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法)。これによって、記憶痕跡細胞とそれ以外の細胞を区別して学習後の個々の細胞の神経活動を経時的に可視化できるシステムを確立することに成功した。経験した出来事の記憶は脳の海馬で形成される。本研究では、この独自システムを利用して、海馬に出現する記憶痕跡細胞の学習中の活動パターンを観察するとともに学習後のリプレイの存在を検討することによって、記憶の情報処理に重要なタイミングとそこでの記憶痕跡細胞に特有の活動パターンの抽出を目指した。さらに、得られた情報をもとに記憶痕跡細胞に対して、光遺伝学的操作技術を利用して活動パターンを人為的に導入、あるいは特異的なタイミングで活動を阻害して、対応する記憶がどのように影響を受けるのかを検討し、効率的かつ特異的に標的とする記憶へ介入する新しい方法を提案することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

新奇エピソード経験を符号化した記憶痕跡細胞とそれ以外の細胞を区別することにより、記憶痕跡細胞に特有の活動様式を検出・解析できるシステムを確立した。この解析の結果、記憶痕跡細胞集団からそれぞれ異なる同期活動で規定される複数の亜集団が新奇エピソード経験中に出現し、その約 40% は、経験直後の睡眠時から経験した文脈の再体験による記憶想起時にかけて、優先的に再活動していることが明らかになった。一方、記憶痕跡

細胞以外の亜集団では、経験後睡眠時や記憶想起時に再活動するものはほとんどなかった。このように 1 つのエピソードに対応する記憶痕跡細胞集団にもかかわらず、その中に存在する複数の亜集団がそれぞれ別個のタイミングで情報を表現・処理し、その集合として 1 つの記憶情報を構築しているという、脳内での記憶情報の表現様式に関する新たな概念を提案するに至った。また、記憶は休息中や睡眠中にその直前に経験した情報が『固定化』され、経験後数時間残る短期記憶から 1 日以上残る長期記憶に変換されると示唆されてきた。今回の結果は、亜集団活動によってエピソード記憶が、経験後の睡眠時に『固定化』している様子と、『想起』時に情報を再表示している様子を可視化したという意義もある(原著論文 3, 5)。

私はこれまでに、異なる脳領域に形成された 2 つのエピソードに対応する記憶痕跡細胞集団を同時に活性化することで、2 つの記憶が連合した人工記憶の誘導に成功した(大川ら, 2015)。この研究の一環として、海馬 CA3 内に出現した 2 つの記憶痕跡細胞集団を同時に活性化したところ、人工連合記憶を誘導できることが明らかとなった。この結果から、これまでの 2 領域を標的とした操作よりも簡便に 2 つのエピソードの記憶の融合を誘導できることを提唱することができた(原著論文 2)。さらに、生理的に既に連合している 2 つの記憶を切り離すことにも成功した(原著論文 1)ことで、特に記憶の連合機構の解明に寄与することができたものとする。

## (2) 詳細

### 研究テーマ 1 「記憶痕跡細胞に特有の活動パターンから真の記憶痕跡を同定する」

神経細胞は活動すると  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内に流入することから、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化に応じて蛍光を発する人工的な蛍光タンパク質 G-CaMP7 を発現し、神経細胞の活動を観察することがで

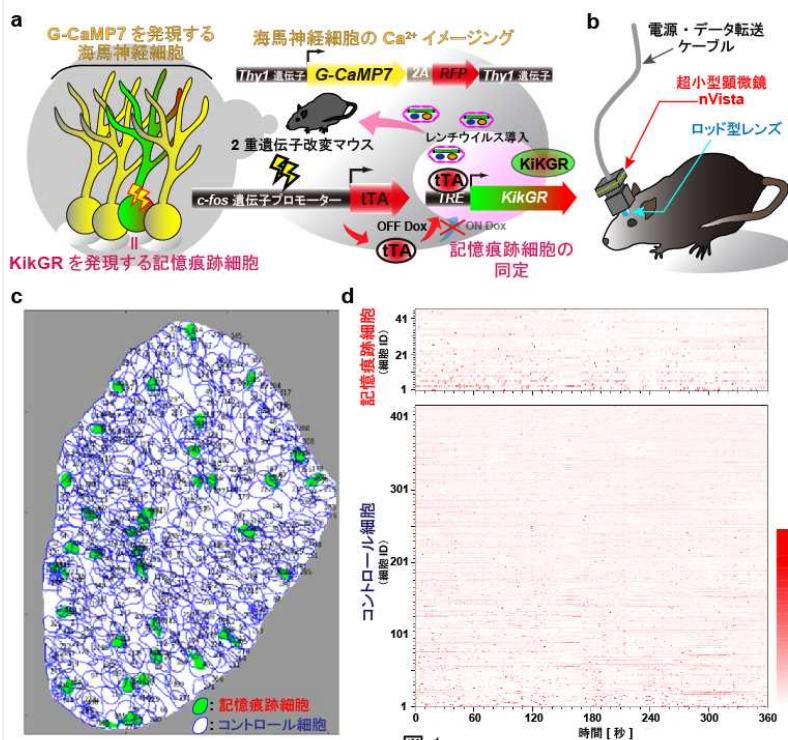


図 1

きる遺伝子改変マウス (Thy1::G-CaMP7 マウス) を準備した。さらに、記憶痕跡細胞を別の蛍光タンパク質 KikGR で観察できる遺伝子改変マウス (c-fos::tTA マウス) も準備し、この両者を交配させ、神経細胞の活動 (G-CaMP7 の蛍光) と記憶痕跡細胞の存在 (KikGR の蛍光) を区別して観察することができるマウス (二重遺伝子改変マウス)

を作出した(図 1a)。そして、このマウスの海馬に内視鏡としてロッド型レンズ{Gradient index (GRIN) レンズ}を挿入し、神経細胞の活動(G-CaMP7 蛍光)と記憶痕跡細胞の存在(KikGR 蛍光)を超小型蛍光顕微鏡(nVista)で観察できる技術を確立した(図 1b)。このマウスをこれまで経験したことのない空間に入れて自由に行動させ、部屋を記憶する様子を調べたところ、海馬で数百個の神経細胞の活動を示す G-CaMP7 の蛍光を直接観察することができた(図 1c)。また、これらの活動している神経細胞について KikGR の蛍光を観察することで、記憶痕跡細胞とそれ以外のコントロール細胞に区別して神経活動(G-CaMP7 の蛍光)を検出することに成功した(図 1c, d)。

そこで、マウスが新規空間に入れられたときなど新しい出来事(新奇エピソード)を経験している際、記憶痕跡細胞がどのようなパターンで活動するかを検討した。相関行列解析と呼ばれる手法で解析したところ、記憶痕跡細胞集団は、新しい出来事(新奇エピソード)の経験中に、類似したパターンの活動を頻繁に繰り返していることが明らかとなった。この現象は、記憶痕跡以外のコントロール細胞集団では見られなかった。

近年、学習後の Non-REM や REM 睡眠時にそれぞれ異なる形態のリプレイが起こることや、それぞれの睡眠自体やそこに特徴的な脳波の攪乱によって記憶の固定化が阻害されることが報告されてきている。そこで、マウスが、「(1)新たな形の空間を経験しているとき(新奇エピソード)」、「(2)Non-REM 睡眠中」、「(3)REM 睡眠中」、「(4)それらの睡眠後に再度同じ空間に入れたとき(2 度目の経験)」、「(5)それらの睡眠後に同じ実験室で違う空間に入れたとき」について検討したところ、(2)～(5)での記憶痕跡細胞の集団の活動パターンは、「(1)最初の経験」から一貫して類似性を保持していることが分かった。

その後の睡眠や 2 度目の経験を経ても類似の活動パターンを繰り返すことから、記憶痕跡細胞の集団の中で同期活動している特徴的な亜集団の存在を検討した。(1)～(5)の記憶痕跡細胞の集団的な活動パターンについて、非負値行列因子分解解析を行ったところ、新奇エピソードで現れた記憶痕跡細胞の集団の中に複数の亜集団が存在していることが明らかとなった。それらの亜集団が活動するタイミングや細胞構成はばらばらであったことから、それぞれの亜集団は異なる記憶を保持するのに関わっていると考えられる。

さらに、「(1)新奇エピソード」で現れた記憶痕跡細胞の亜集団の活動パターンが、その後の睡眠や再度同じ箱に入れられたときにも出現するのかどうかを調べたところ、亜集団の約 40%が一貫して再出現していた。一方、記憶痕跡細胞以外の亜集団で活動が再出現するものはほとんどないことが分

かった。また、この記憶痕跡細胞の再活動の多くは、同じ実験室で違う箱に入れたときには消失した。このことから、記憶痕跡細胞の亜集団のうち約 40%は、睡眠中に自発的に再度活動するとともに、記憶を呼び起こす際にも再び優先的に活動す

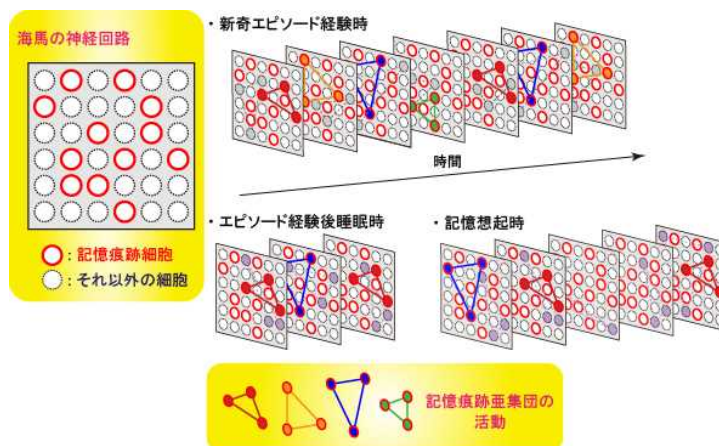


図 2



ることが分かった(図 2)。

このように、記憶痕跡細胞は複数の亜集団を構成し、それぞれが経験した記憶の全体像をつくる個別の情報に応じて、時間的にずれて活動していることが明らかとなった。つまり、ある出来事を経験する記憶の全体像は、複数の記憶痕跡細胞の亜集団からなる活動が協奏的に脳内で出現することで表現されていること、そして、睡眠中に亜集団の一部の活動が再現されることによって、脳内に定着することが強く示唆された(原著論文 3, 5)。

## 研究テーマ 2 「光を用いた記憶痕跡亜集団の活動操作法の確立」

デジタルミラーデバイス(DMD)でパターン照明光をつくり、亜集団を構成する一部の記憶痕跡細胞のみを標的にした光遺伝学的操作法の開発を試みている。これまでに、DMD パターン照明光システムを製作したアスカカンパニー社と共同で、顕微鏡にパターン照明を導入し、対物レンズから脳に挿入した GRIN レンズを介して標的脳部位へパターン光を導入できるか検証を行った。その結果、GRIN レンズ直下のミラーから反射し再度 GRIN レンズを経て顕微鏡に戻った像がパターンを保持していることを確認した(図 3)ことから、GRIN レンズを経て脳内にもパターン光を導入できるものと考えている。さらに、海馬内の神経細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングと光操作の両立を試みている。これまでに、活性化型オプシンの ChrimsonR を神経細胞に発現するウイルスを感染させた G-CaMP マウスにおいて、視野全体への励起光を照射することにより、視野内の神経細胞全体の活動に対応した G-CaMP 蛍光の上昇を誘



図 3

導できている。今後は、このマウスに DMD パターン照明光システムを適用し、実際に標的化した細胞特異的な活性制御の評価を進める予定である。

## 研究テーマ 3 「光を用いた様々な記憶の操作」

もともと関連していない複数の過去の記憶を何らかのきっかけで関連づけてより深い意味のある情報に進化させていくことは、脳機能にとって非常に重要な特性である。私はこれまでに、マウスが円柱形の箱に入れられた時に出現した海馬 CA1 領域と立方体の箱内で軽微な電気ショックを経験した時に出現した扁桃体領域の 2 つのセル・アンサンブルを同時に活性化すると、円形の箱の中で恐怖を思い出してしまう人工連合記憶の誘導に成功していた(大川ら, 2015)。この研究の一環として、海馬 CA3 領域内に出現した 2 つのセル・アンサンブルを同時に活性化したところ、人工連合記憶を誘導できることが明らかとなった。CA3 領域内の神経細胞同士は反回性シナプスで連絡し合っていることから、2 つの記憶痕跡細胞集団が同時に活動すると、それぞれの集団が活動している間にもう一方の集団からの入力を受け取ることになり、2 つの情報が容易に混じり合うことが想定された。この結果から、CA3 の記憶痕跡細胞の操作でこれまでの 2 領域を標的とした操作よりも簡便に 2 つのエピソードの記憶の融合を誘導できることを提唱した(原著論文 2)。さらに、生理的に 2 つの記憶が連合する際には、2 つの記憶痕跡細胞集団で重複する細胞が増加することから、この重複した

部分集合に相当する細胞集団の活動を抑制することにより、元となる 2 つの記憶はそのままに、記憶の連合のみを切り離すことに成功した(原著論文 1)。以上の結果は、特に記憶の連合機構の解明に寄与するものとなることが考えられる。また、光での記憶の操作に加えて、学習時の入力を反映すると考えられる電気生理学的な刺激パターンを用いて特定回路の活性化を誘導することにより、記憶形成に必須な分子挙動の空間的制御にも成功した(原著論文 4)。

### 3. 今後の展開

記憶情報の表現様式が、記憶障害を示す認知症や統合失調症でどのように変化しているのかは不明である。これらの病態脳を診断する上では CT や MRI による画像診断が有用とされ、認知機能と脳の形態異常(脳の萎縮等)との相関が主な診断基準となっていることから、早期診断は未だ難しいものと考えられる。そこで、脳波や fMRI を利用することにより、形態学的異常に至る前の脳機能の観察から認知症を診断する取り組みがなされており、その中で、ヒトにおける複数脳領域の活動観察から類推される神経ネットワークが健常者と認知症患者との間で異なっていることが報告されているが、実際に認知機能との直接の関連を示した上での理解には至っていない。今回の研究から、記憶痕跡亜集団活動によってエピソード記憶が、経験後の睡眠時に『固定化』している様子と、『想起』時に情報を再表出している様子の可視化が可能となった。この知見を踏まえ、認知機能の 1 つである“記憶”に障害が現れるヒト型変異を導入したアルツハイマー病(AD)モデルマウスや統合失調症モデルマウスにおいて、記憶痕跡細胞の活動と記憶レベルの関連を検討することにより、記憶障害の原因となる病態脳内での記憶情報表現機構の理解が進むものと期待される。そして、病態脳理解の新たな概念や診断・治療の指針も提供可能となるであろう。さらにこの取り組みは、記憶障害の理解から“記憶できる”とはどういうことなのか、という記憶に対する本質的な疑問への答えに結びつくものとする。

### 4. 自己評価

記憶痕跡を扱う他の研究室が着手していなかった、記憶痕跡に特化した活動パターンを観察できるシステムを確立していたことから、記憶成立の機構解明に寄与できる何らかの観察結果を出すことができるだろう、という漠然とした期待を胸にさきがけ研究の船出をした。研究開始直後の七田総括との面談で、本研究の目標を、「記憶痕跡細胞に特有の活動パターンから真の記憶痕跡を同定」し、「光による真の記憶痕跡の活動操作法の確立」をする、という明快かつ困難とも思われる 2 つの目標を設定することとなった。

この 3 年半のさきがけ期間のほとんどを、「真の記憶痕跡の同定」に集中することになったが、脳の中で、記憶痕跡細胞からなる複数の亜集団活動によってエピソード記憶の全体像が表現されている様子、そして、亜集団活動による記憶の固定化と想起の様子を可視化できたという点で、この目標に関しては達成できたとともに、独自の記憶研究の世界観を構築できたと考えている。今後はこの知見を病態モデルマウスに適用し、記憶障害と記憶痕跡亜集団活動の破綻との関連を明らかにしていこうと考えている。近い未来、1 細胞レベルの解像度と秒レベルの時間分解能を持った非侵襲的な脳活動のイメージングシステムが登場するならば、エピソードに対応した亜集団活動を指標とした記憶障害の早期診断法のヒトへの応用も夢ではないだろうと期待している。

さきがけで支援いただいたことや、七田総括と掲げた難しい目標設定にチャレンジしたことで、明瞭なメッセージに繋がる研究成果を得ることができた。このおかげで、多くの講演の機会をいただき、たくさんの方々から研究に対してのご質問や激励をいただくことができた。この経験によって、自身の研究の意義や社会的な位置づけを今まで以上に考えるようになったという点で、研究に対峙する心境の変化を感じている。

一方で、「記憶痕跡の活動操作法の確立」に関しては、未だ達成には至っていない。より高度な技術を利用した神経細胞の光操作法が報告され始めているが、私も着実に検証を進め、この達成に向けて検討を継続していく。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yokose J, Okubo-Suzuki R, Nomoto M, **Ohkawa N**, Nishizono H, Suzuki A, Matsuo M, Tsujimura S, Takahashi Y, Nagase M, Watabe AM, Sasahara M, Kato F, Inokuchi K  
Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories.  
**Science** (2017) Vol. 355, No. 6323: pp398-403.
2. Oishi N, Nomoto M, **Ohkawa N**, Saitoh Y, Sano Y, Tsujimura S, Nishizono H, Matsuo M, Muramatsu S, Inokuchi K  
Artificial association of memory events by optogenetic stimulation of hippocampal CA3 cell ensembles.  
**Molecular Brain** (2019) Vol. 12, No. 1: 2
3. Ghandour K<sup>#</sup>, **Ohkawa N<sup>\*,\*</sup>**, Fung CCA<sup>#</sup>, Asai H, Saitoh Y, Takekawa T, Okubo-Suzuki R, Soya S, Nishizono H, Matsuo M, Osanai M, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Sakurai T, Kitamura T, Fukai T, Inokuchi K<sup>\*</sup> (#筆頭著者, \*責任著者)  
Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram.  
**Nature Communications** (2019) Vol. 10, No. 1: 2637
4. Asai H, **Ohkawa N**, Saitoh Y, Ghandour K, Murayama E, Nishizono H, Matsuo M, Hirayama T, Kaneko R, Muramatsu S-I, Yagi T, Inokuchi K  
Pcdh deficiency affects hippocampal CA1 ensemble activity and contextual fear discrimination.  
**Molecular Brain** (2020) Vol. 13, No. 1: 7
5. Nihonmatsu I<sup>#</sup>, **Ohkawa N<sup>\*,\*</sup>**, Saitoh Y<sup>#</sup>, Okubo-Suzuki R, Inokuchi K (#筆頭著者, \*責任著者)  
Selective targeting of mRNA and following protein synthesis of CaMKII at the long-term potentiation-induced site.  
**Biology Open** (2020) Vol. 9, No. 1: pii: bio042861

### (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. Ensemble representation of contextual memory in hippocampal engram cells.  
第 41 回日本神経科学大会・シンポジウム:最先端光イメージングによる深部脳観察へのアプローチ・Seeing the invisible: the art of deep brain imaging, 神戸, 2018 年 7 月 27 日
2. Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram.  
第 57 回日本生物物理学会年会・シンポジウム:Elucidation of biological functions by optical control, 宮崎, 2019 年 9 月 25 日

受賞

1. 田村科学技術振興財団・第二回 田村四郎科学賞, 2019 年 2 月 10 日

著作物

1. 記憶の操作  
中外医学社, 『Clinical Neuroscience』・特集:光が開く神経科学の未来 - オプトジェネティクスと光イメージング. (2018) Vol. 36, No. 8, pp916-920.
2. 記憶痕跡セル・アンサンブルを利用した人工連合記憶の創出  
日本認知症学会誌 『Dementia Japan』, (2019) Vol. 33, No. 1: 2-9.
3. 光で記憶を見る・操作する  
ニューサイエンス社, 月刊『細胞』・特集:光操作が拓く生体機能解明への道, (2020) Vol. 52, No. 1: 12-16.

プレスリリース

1. 経験を記憶する新たな神経細胞集団を発見 ~ 睡眠中に記憶が定着する様子の観察にも成功 ~  
科学技術振興機構(JST)・富山大学, 2019 年 6 月 12 日  
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190614/index.html>