

博士論文

海馬ニューロン群の発火パターンと
内側前頭前皮質ニューロンの膜電位変動の関係

西村侑也

博士論文

海馬ニューロン群の発火パターンと
内側前頭前皮質ニューロンの膜電位変動の関係

西村侑也

目次

1.序論	p 3
2.方法	p 6
3.結果	p 16
4.図	p 22
5.考察	p 33
6.結論	p 38
7.参考文献	p 39
8.謝辞	p 42

1. 序論

動物が獲得した記憶情報の処理は、様々な脳領域に存在するニューロン同士の発火やシナプス伝達などが協調的に生じることで行われる。中でも、動物のエピソード記憶を支える海馬と呼ばれる脳領域(Eichenbaum., 2017)は、様々な脳領域と解剖学的・機能的に連絡し合い(Cenquizca and Swanson, 2007; Logothetis et al., 2012)、統合した情報を短期記憶として一時的に保存する。その後、海馬に保存された情報は、内側前頭前皮質(mPFC; medial prefrontal cortex)に伝達されることによって、長期記憶として保存されるようになる(Euston et al., 2007)。このような、海馬から mPFC への情報の移行は現在までに、記憶の固定化のモデルとして考えられており、多くの研究が記憶の固定化を支える神経基盤の解明を進めている(Squire et al., 2015; Tonegawa et al., 2018)。

従来の研究から、海馬から mPFC に情報を伝達する上で、複数の海馬ニューロンが同時に活動すること、同期発火が必要であると考えられている(Buzsaki, 2015)。この海馬ニューロンの同期発火は、海馬に見られる記憶の固定化に関わるリップル波(150-250 Hz の高周波振動)に伴って生じることが多い。また、海馬ニューロンの中には、動物がある空間位置を通過した時に発火する場所細胞と呼ばれるニューロンが存在し(O'Keefe and Dostrovsky, 1971; O'Keefe and

Nadel,1978)、場所細胞は動物の空間情報処理を担うと考えられている。海馬ニューロンの中でも、特に場所細胞の同期発火は、動物が過去に経験した出来事の情報再生(メモリーリプレイ)や動物が取るべき将来の行動設計をサポートすることが知られている(Wilson and McNaughton,1994; Lee et al, 2002; Jadhav et al., 2012)。このような海馬ニューロンの同期発火が生じた時、mPFCを含む様々な下流の脳領域に存在するニューロンの発火活動も同時に変化する(Jadhav et al., 2016 ;Wang et al., 2016; Girardeau et al., 2017; Tang et al., 2017; Shin et al., 2019)。近年では、海馬と海馬外の脳領域の協調的な活動を報告する知見は多く、海馬-mPFC 神経回路においては、海馬ニューロンの同期発火によって生成された情報が mPFC に伝達されることで、記憶の固定化が促進されていると考えられている(Maingret et al., 2016)。このような記憶の固定化のモデルは、主にニューロン同士の発火を記録することによって提唱されてきた。しかし、ニューロン同士の情報伝達メカニズムを記述する上で、従来の研究では見過ごされている点が存在する。

ニューロンは周りの他のニューロンから興奮性もしくは抑制性のシナプス入力を受け取り、その興奮性が発火閾値に達すると発火する。従来の研究の多くは、主にニューロンの発火に注目してきたが、近年では、発火に満たないニューロンの膜電位の揺らぎが、ニューロンの発火パターンやシナプス伝達効率を

調節することが明らかとなっている (Epsztein et al., 2011; Gonzalez-Rueda et al., 2018)。このような報告からも、ニューロン同士の情報伝達メカニズムを詳細に理解するためには、ニューロンの発火だけでなく、シナプス入力を反映した発火閾値下の膜電位変動にも注目する必要がある。従来の研究では、神経回路レベルで生じる海馬ニューロンの同期発火が、海馬外のニューロンの発火活動に影響を与えることを示してきた。そうであれば、発火のメカニズムであるシナプス入力を反映した膜電位変動にも影響を与えることが考えられる。しかし、そのような神経回路とシナプスを繋ぐ直接的な証拠は未だに存在しない。その理由は、従来の研究の多くが、ニューロンの発火またはシナプスのみに焦点を当てており、両者の研究が独立して行われてきたためである。

そこで本研究では、海馬-mPFC 神経回路を一つのモデルとして、複数の海馬ニューロンの発火パターンと、シナプス入力を反映する mPFC ニューロンの膜電位変動を同時に記録する技術を確立することをまず目指した。そして、海馬ニューロン群の同期発火パターンと mPFC ニューロンのシナプス入力を反映する膜電位変動を同時に記録することで、領域間情報伝達を支える神経メカニズムの実態を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2-1. 実験動物

全ての動物実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物への苦痛を最小限に抑える努力のもと行った(承認番号 : A30-72)。実験には、3-5 週齢の雄性 Slc:SD ラット (SLC, Shizuoka, Japan) を用いた。ラットは元の体重の 85-90 % の値になるように摂食制限を施し、自由摂水下で飼育した。明期 12 時間、暗期 12 時間(7 時点灯、19 時消灯)で飼育し、行動課題は全て暗期に行った。実験中、苦悶症状(頭部固定処置時に暴れる、鳴き声など)を認めた場合、速やかに安楽死させた。

2-2. U トラック課題

縦幅 70 cm × 横幅 9 cm × 厚さ 2 cm の 3 枚の木板を使用し、U 字型の橋 (U トラック) を作製した。橋の高さは床から 29 cm とした。U トラックの両端に 3cm シャーレを置き、シャーレ中に報酬(チョコミルク)を手動で与えた。これによって、ラットは両端で与えられる報酬を求めて繰り返し U トラック上を往復するようになる。この行動課題に馴化させるために最低 15 分×3 日間のトレーニングを行った。ラットが報酬を求めて自発的に U トラック上を往復した時点で、行動課題を学習したと判断した。行動課題中のラットの軌跡を記録するた

め、天井に設置された CMOS カメラ (MCM-303NIR-880-LED, Gazo Co., Ltd., Niigata, Japan) によって、320*240 pixels、サンプリングレート 25 Hz でラットの動きを撮影した。

2-3. 電極セットの作製

海馬からの電気生理記録には、ねじを回すことにより高さ調節が可能な 8 本のテトロードを使用した。また基板やテトロードを収納する支持体 (マイクロドライブ) を 3D プリンタ (MiiCraft, Young Optics) で作成した。テトロードは、ポリイミドコードされたプラチナ・イリジウムワイヤー (17 μ m polyimide-coated platinum-iridium (90/10%) wire, California Fine Wire Co., Grover Beach, CA) を撚ることで作成した。テトロードのインピーダンスは 180-300 k Ω になるように白金コーティングした。白金コーティング後、テトロードをエタノール消毒した。また、マイクロドライブの物理破損を防ぐために、保護カバーを 3D プリンタで作成し、マイクロドライブの外縁に装着した。

2-4. 電極セット埋め込みおよびパッチクランプ部位の開頭手術

- ・海馬への電極セット埋め込み

行動課題を学習したラットを 2% イソフルランによって麻酔導入した。脳定位

固定装置 (SR-6R-HT, Narishige, Tokyo, Japan) にラットの頭部を固定し、以後 1.0-1.5 % イソフルランで維持した。バリカンで頭部の毛を刈り、外科はさみを用いて、頭皮を切開し頭蓋骨を露出した。その後、開頭部にポビドンヨードを塗布し、殺菌消毒した。次に固定装置用マイクロマニピュレーター (SMM-200, Narishige, Tokyo, Japan) を用いて、Bregma, Lambda が水平になるよう固定角度を調節し、背側海馬が位置する右側頭蓋骨上の座標 (AP -3.6mm, ML +2.5-5.0 mm) に印をつけた。そして、電動ドリル (SD-102, Narishige, Tokyo, Japan; Minimo ONE SERIES ver.2, C2012, Minitor Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いて、印周辺の 15 か所に直径 0.8 mm の穴をあけ、ステンレス製ねじ (stem width: 1.4 mm, stem length: 3 mm, Stainless steel screw M1.4×3.0, 42617687, MonotaRO, Hyogo, Japan) を埋め込み、アンカーねじとした。これによって、歯科用セメントで固定した電極セットが頭部から剥離するのを防いだ。そして、電動ドリルを用いて、印の位置に縦 1.2 mm×横 3 mm 程度の長方形の穴をあけた。26G 注射針 (Terumo Hypodermic Needle, NN-2613S, Terumo Corporation, Tokyo, Japan) を用いて硬膜を剥離し取り除いた。電極セットを脳内に刺入した後、開頭部位をゲル (Neuro seal: 塩化カルシウム水溶液とアルギン酸ナトリウム水溶液を混和させたもの) によって保護した。これによって開頭部が直接、歯科用セメントで覆われることを防いだ。その後、歯科用セメント (RE-FINE

BRIGHT,03-4601,YAMAHACHI DENTAL MFG.,CO., Aichi, Japan)を用いて電極セットを頭蓋骨上に固定した。この際アンカーねじは完全にセメントに覆われるようにした。

・パッチクランプ部位の開頭手術

内側前頭前皮質(mPFC)が位置する右側頭蓋骨上の座標 (AP +2.5-3.5 mm, ML +1.0-1.5 mm)に印をつけた。次に、3D プリンタで作成した扇形のパーツを、印の位置を囲むようにして置き、接着剤(LOCKTITE 454, Henkel AG & Co. KGaA, Dusseldorf, Germany)で固定した。そして、電動ドリルを用いて、印の位置に、直径 1.4 mm 程度の穴をあけた。この際、硬膜は取り除かず、開頭部位に直径 1.4 mm、長さ約 4 mm の保護チューブ(ポリイミドチューブ)を硬膜上に接するように挿入した。その後、開頭部をエタノール消毒し、塵や床敷の付着を防ぐために、扇形パーツにサージカルテープを貼付した。

電極埋め込みの手術を終えた後、ラットの両耳上部に 3D プリンタで作成したパーツをセメントで接着した。パッチクランプ記録時に、このパーツを両側から挟むことにより、頭部固定台にラットの頭部を固定した。手術終了後、ラットを頭部固定装置から取り外し、飼育ケージに戻し、麻酔から覚めるまで観察した。

2-5. 電極位置の調整

手術後、電極セット上にある電子基板にデジタルヘッドステージ (Celeplex M, Blackrock microsystems, Salt Lake City, UT) を接続し、記録装置 Cereplex Direct (Celeplex Direct, Blackrock microsystems, Salt Lake City, UT) に脳波データ(局所場電位)をリアルタイムで送った。サンプリングレートは 30 kHz とした。ねじ調節によって脳内の電極を徐々に降下させ (一日最大 250 μ m)、約 2 週間程度で海馬付近に位置させた。複数の神経細胞のスパイク、記録される局所場電位から海馬で見られる 150-250 Hz 帯域のリップル波が観察された時、電極の位置調整を止めた。

この期間中、行動課題の再トレーニングを行った。また、チョコミルクを与えながら、パッチクランプ記録時に使用する頭部固定台にラットを固定し、馴化させた。

2-6. 電気生理記録

- ・ Uトラック上での複数の海馬ニューロンの発火パターンの記録

海馬に埋めた電極から安定してスパイクが記録でき、さらにラットが頭部固定台に馴化した時、Uトラック課題中の電気生理記録を行った。まず、飼育ケージ内で、Uトラック課題を行う前の海馬ニューロンの発火パターンを 10 分間記

録した。次に、Uトラック課題中の海馬ニューロンの発火パターンを10分から15分間記録した。

・内側前頭前皮質(mPFC)ニューロンの膜電位変動の記録

Uトラック課題後、海馬ニューロンの発火パターンを記録しながらラットを頭部固定台に移した。その後、リドカイン液(0.05 mg/kg, ~1 ml)を開頭部に塗布し、保護チューブを除去した。そして、30G注射針を用いて、硬膜に微小の穴を開け、ガラス電極(4.0–7.0 M Ω)を刺入した。マニピュレーターを用いて、脳表から750–3600 μ mに位置する前辺縁皮質(Prelimbic cortex: PL)領域に存在する単一の神経細胞から膜電位記録を行った。膜電位記録の開始時、-200 pAから+350 pAの1s長の矩形電流(50 pA刻み)を注入することで、神経細胞の発火特性を調べた。

電極内液は、35 mM K-gluconate、4 mM KCl、10 mM HEPES、10 mM Na₂-phosphocreatine、4 mM Mg-ATP、0.3 mM Na₃-GTP、0.3 mM EGTA、0.2% Biocytinの組成とした。また、pHは約7.3に調製し、浸透圧は285–289 mOsmとした。電気シグナルはMultiClamp 700Bにより増幅し、pCLAMP10.1(Molecular Devices, Union City, CA, USA)で処理した。サンプリングレートは20 kHzとした。

2-7. 海馬電極痕跡とパッチクランプ記録ニューロンの確認

神経活動記録を終えた動物にウレタンを腹腔内注射し、麻酔をかけた。その後4% PFA を灌流して固定した。電極跡を脳に残すために、電極を脳に刺入した状態で12時間以上冷蔵保存した。その後、電極を脳表まで引き揚げ、脳を摘出した。4% PFA/PBS に浸漬して後固定を行い、内側前頭前皮質(mPFC)を含む脳切片と海馬を含む脳切片に切り分けた。内側前頭前皮質(mPFC)を含む脳切片に対しては、まず、マイクロスライサー (DTK-1000N MicroSlicer, Dosaka EM Co., Ltd., Kyoto, Japan) を用いて、100-150 μ m 厚の冠状切片を作成した。次に、2 μ g/ml streptavidin-Alexa Fluor 594 conjugate (Thermo Fisher Scientific; S11227) と 0.2% Triton X-100 の混合溶液に浸漬し、常温で12時間振盪した。蛍光画像は、共焦点顕微鏡 (FV1200, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて取得した。可視化できなかったニューロンについては、パッチクランプ記録を行った際の電極を降下させた距離や電極の傷跡をもとに推定位置を判断した。

海馬を含む脳切片に対しては、まず、30% スクロース水溶液に1日浸漬してスクロース置換した。ドライアイスによって脳を凍結させ、マイクロトーム (Sliding Microtome, SM2010 R, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) を用いて150 μ m 厚の冠状切片を作成した。切片はPLAコートされたスライドガラス (Micro Slide Glass, S7441, Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) に貼り付

け、マウンティング溶液(0,2%ゼラチン/PBS)を滴下した後、1日以上風乾させた。プレパラートをニッスル染色し、疎水性封入剤 (PARAmount-D, Falma, Tokyo, Japan) で封入した。光学顕微鏡 (All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X710, Keyence Corporation, Osaka, Japan) で2倍レンズを用いて切片を可視光で撮影した。撮影された画像データから各電極の記録箇所を特定した。

2-8. データ解析

・海馬ニューロンのスパイクソーティング

スパイク検出は記録後に行った。脳波記録からスパイク波形を抽出した。

MATLAB プログラムである MClust (by Redish, A.D., <http://redishlab.neuroscience.umn.edu/MClust/MClust.html>) を用いて、スパイクの特徴量 (スパイク波形の山谷の大きさ、スパイク波形の積分値や PCA 解析結果) から、全スパイクをクラスター分類した。それぞれのクラスターがある単一細胞に由来するという仮定の下でデータ解析に利用した。

・海馬場所細胞の定義

Uトラックを直線化し、10cm ごとの区画に分けて、各位置の平均発火率を求めた。海馬場所細胞の基準は (1) 最大発火率が 1 Hz 以上であること (2) 最大

発火率が、最大発火率を示した位置を除いた全ての位置の平均発火率 ± 2 SD 以上であること、とした。この基準を満たさない海馬神経細胞は非場所細胞と定義した。また、最大発火率の 30%以上の発火率を持つ範囲を場所受容野とした。

・海馬ニューロン群の同期発火イベントの検出

mPFC ニューロンの膜電位記録時間中において、2 細胞以上の海馬ニューロンが 100 ミリ秒以内に発火した時間を同期発火イベントとした。また、同期発火イベントでいずれかのニューロンが最初に発火した時間を 0 秒とした。

・線形回帰分析による mPFC ニューロンの膜電位変動量の予測

線形回帰分析により、海馬ニューロンの同期発火パターンから mPFC ニューロンの膜電位変動量を予測した。 N を海馬ニューロンの数として、 l 番目の同期発火について $N+1$ 次元の予測ベクトルを集団ベクトル \mathbf{s}_l と定義した。このベクトルの N 次元の成分には、個々の海馬ニューロンの同期発火イベントへの参加の有無(発火すれば 1、発火しなければ 0)を入れ、残りの 1次元の成分には定数項のために +1 を入れた。mPFC ニューロンの膜電位変動量をベクトル \mathbf{v} とし、 l 番目の同期発火イベントの膜電位変動量 v_l を定義した。 L を全同期発火イベントの数として、線形回帰分析により、予測ベクトルの集合、 $\mathbf{s} = (\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_2, \mathbf{s}_3, \dots, \mathbf{s}_L)^T$ 、

と対象変数の集合、 $\mathbf{v} = (v_1, v_2, v_3, \dots, v_L)^T$ の線形の関係性を評価した。両者の関係性を示す予測係数 \mathbf{w} は以下の式で求められる。

$$\mathbf{w} = \mathbf{s}^+ \mathbf{v}$$
$$\mathbf{s}^+ = (\mathbf{s}^T \mathbf{s})^{-1} \mathbf{s}^T$$

l 番目の対象変数 s_l における予測度を評価する際、leave-one-out クロスバリデーションを行い、 \mathbf{w} は s_l と v_l を除外して計算した。予測した対象変数 v'_l は以下の式で計算した

$$v'_l = \mathbf{s}_l^T \mathbf{w}$$

この解析を全ての同期発火イベントで行った。予測精度は、 v'_l と v_l の誤差の平均を計算することにより評価した。そして、1000個の疑似データから予測誤差を算出し、予測データの誤差が疑似データの誤差と比較して、どれだけ正確かを調べるために、分布を z-score 化し、負の値をとることで予測スコアを算出した。本研究では、この予測スコアが有意水準 95%の境界である 1.96 以上の場合に予測が成功したと定義した。

全てのデータ解析は MATLAB を用いて行った。また、記録した海馬ニューロン数が 4 細胞以下の個体は解析から除いた。

3. 結果

3-1. 海馬ニューロン群の発火と mPFC ニューロンの膜電位変動の同時記録

海馬-mPFC 神経回路において、海馬ニューロンの同期発火が mPFC ニューロンの発火閾値下の膜電位変動にどのような影響を及ぼすかは明らかでない。その一つの理由として、複数のニューロンの発火パターンと単一のニューロンの膜電位変動を同時に記録する実験手法が存在しないことが挙げられる。そこで、複数の海馬ニューロンの発火を記録するために、テトロードと呼ばれる電極を搭載した電極セットを独自に作成し、ラットの海馬に埋め込んだ(図 1A)。次に、mPFC ニューロンから膜電位変動を記録するためにパッチクランプ記録を行った。パッチクランプ記録は微小ガラス電極をニューロンの細胞膜に密着させる操作が必要である。そこで、動物の頭部を安定して固定する頭部固定パーツ(図 1B)やパッチクランプ電極刺入部位を保護するカバー(図 1C)を作成した。これによって、無麻酔条件の動物から安定してパッチクランプ記録を行うことが可能となった(図 1D)。実験の事前検討を行った後、電極セットを取り付けたラットに約 2 週間、U 字型トラック課題 (10-15 分間/日) を行わせた (図 2A)。同時記録当日は、U 字型トラック課題を行った後、ラットを頭部固定台に移動させた。そして、海馬ニューロンの発火パターンを記録したまま、mPFC ニューロンからパッチクランプ記録を行った (図 2B)。以上より、無麻酔条件の動物を

用いて、海馬ニューロン群の発火パターンと mPFC ニューロンの膜電位変動を同時記録する実験系を確立した。実験終了後、海馬に刺入した電極痕跡と膜電位を記録した mPFC ニューロンの位置を確認した(図 3)。

3-2. 海馬ニューロン群の同期発火は、一部の mPFC ニューロンの膜電位変動に反映される

次に、確立した同時記録法により得られたデータから、海馬ニューロン群の同期発火が mPFC ニューロンの膜電位変動にどのような影響を与えうるかを調べた。まず、mPFC ニューロンの膜電位記録中に生じた海馬ニューロン群の同期発火イベントを検出した。同期発火イベントは、2 個以上の海馬ニューロンが 100 ミリ秒以内に発火した時間と定義し、検出した同期発火イベントのヒストグラムを作成した (図 4A)。そして、同期発火海馬ニューロン数(N_{sync})ごとに、同期発火イベントを 0 秒とした前後 400 ミリ秒の mPFC ニューロンの膜電位変動をプロットした(図 4B 上、黒色:平均膜電位、灰色:実トレース)。次に、同期発火前 50-200 ミリ秒間の平均膜電位をベースとし、同期発火後 0-150 ミリ秒間の平均膜電位との差 (膜電位変動量: ΔV_m) を求め、全ての同期発火イベントで求められる ΔV_m の実データ分布(黒色)を示した(図 4B 下)。また 1000 個のランダムな時間を抽出し、擬似データとして ΔV_m を上述と同様に求め、擬似デ

ータの分布(緑色)を作成した。そして、それぞれの分布平均値の差を比較して、実データ分布の偏り(ΔV_m シフト)を調べた。すると、同期発火する海馬ニューロン数が多くなるにつれて、 ΔV_m シフトの値は増加する傾向にあった。記録した全ての mPFC ニューロンについて、2 から 5 個の海馬ニューロンが同期発火した時の ΔV_m シフトの値をプロットすると、同様の傾向が得られた(図 4C; $*P < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test, $n = 9$ cells)。しかし、膜電位変動量(ΔV_m)を求める時間を変えて、 ΔV_m シフトを算出した場合、そのような傾向を示す mPFC ニューロンの数は減少した(図 4D,E)。また、一部の mPFC ニューロンについては、海馬ニューロンの同期発火の大きさが増大しても、 ΔV_m シフトが変化しなかった。以上のことから、海馬ニューロン群の同期発火の大きさは、同期発火直後に生じる一部の mPFC ニューロンが受ける興奮性シナプス入力量を増大させることが示唆された。

3-3. 海馬ニューロン群の発火パターンから mPFC ニューロンの膜電位変動量を予測できる

膜電位変動量 (ΔV_m) の分布から、同期発火する海馬ニューロンの数が同じでも、膜電位変動量にはバラつきがあることを確認できる。このことから、mPFC ニューロンの膜電位変動量は同期発火する海馬ニューロンの組み合わせ(同期発

火パターン)によって異なる可能性が考えられる。そこで、線形回帰分析により、海馬ニューロンの同期発火パターンから mPFC ニューロンの膜電位変動量を予測できるかどうか、その可能性を調べた。図 5A では、17 個の海馬ニューロンの同期発火パターンから予測した mPFC ニューロンの膜電位変動量の代表例を示す(実際の膜電位変動量:青色、予測した膜電位変動量:紫色)。予測した膜電位変動量の正確さを定量するために、実測値と予測値の差の平均値を計算し、この値を予測誤差とした(図 5B)。図 5C に、記録した mPFC ニューロンの膜電位予測の結果を示す。すると、9 個中 5 個の mPFC ニューロンにおいて、予測スコアが 1.96 以上であった(z-score for 95% CI, $n = 9$ cells)。上記 3-2 と同様に、膜電位変動量(ΔV_m)を求める時間を変えて、膜電位予測を行った場合、予測スコアが 1.96 以上を示す mPFC ニューロンの数は減少した(図 5D,E)。このことから、海馬ニューロンの同期発火パターンと同期発火直後の mPFC ニューロンの膜電位変動量には関連があることが示唆された。

3-4. 個々の海馬ニューロンの発火と mPFC ニューロンの膜電位変動量の関係

膜電位予測に成功した予測スコアが 1.96 以上のデータにおいて、個々の海馬ニューロンの発火がどの程度 mPFC ニューロンの膜電位を変化させるか、その度合いである膜電位予測係数を算出した。この予測係数が正であれば mPFC ニ

ニューロンは興奮性のシナプス入力を受け取り、負であれば抑制性のシナプス入力を受け取れることを予測することを意味する(図 6A)。図 6B では、膜電位予測に成功した全データにおける海馬ニューロンの発火率と予測係数の関係を示す。予測係数を算出した結果、個々の海馬ニューロンが持つ予測係数の大きさや正負は様々であった。以上の結果から、同期発火する海馬ニューロンの様々な組み合わせは、mPFC ニューロンが受け取るシナプス入力量を調節することが示唆された。

3-5. 海馬場所細胞の同期発火は mPFC ニューロンの膜電位変動に反映される

これまでの結果は、海馬の機能的な性質を無視して解析を進めた。海馬には、動物が環境内の特定の位置にいる時に発火率が増加するニューロン(場所細胞)とそうでないニューロン(非場所細胞)が存在し、特に場所細胞が動物の空間情報の処理を担うと考えられている。このような海馬ニューロンの機能的性質を考慮し、場所細胞もしくは非場所細胞が同期発火した時、mPFC ニューロンの膜電位変動量が異なるかどうか、その可能性を調べた。本研究では、同時記録前に U 字型トラック課題中の海馬ニューロン群の発火パターンを記録した。ここで記録した個々の海馬ニューロンの発火パターンから、場所細胞もしくは非場所細胞に分類した(図 7)。次に、場所細胞ペアと非場所細胞ペアを作り、それぞれ

の細胞ペアが同期発火した時間を 0 秒とした前後 250 ミリ秒の mPFC ニューロンの膜電位変動をプロットした(図 8A,B 上、黒色:平均膜電位、灰色:実トレース)。次に、上記 3-2 と同様に、mPFC ニューロンの膜電位変動量(ΔV_m)の分布(黒色)と擬似データの分布(緑色)を作成した。すると、場所細胞ペアが同期発火した時の膜電位変動量の分布は、非場所細胞ペアの分布と比較して、より脱分極側に偏っていた(図 8B 下; $*P < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test)。さらに、場所情報の位置に注目し、最大発火率を示す位置が近い細胞ペア(最大発火率を示す位置が 20 cm 以内)、遠い細胞ペア(最大発火率を示す位置が 50cm 以上)、非場所細胞ペアに分けた。そして、上記 3-2 と同様に実データ分布の偏り(ΔV_m シフト)を調べた。すると、最大発火率を示す位置が近い細胞ペア、次いで遠い細胞ペアの同期発火が mPFC ニューロンの膜電位変動に反映されやすいことが分かった(図 8C; $*P < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test, $n = 36, 14, 10$ cell pairs, respectively)。このことから、空間情報の処理を担う複数の場所細胞の同期発火は、非場所細胞の同期発火に比べて mPFC ニューロンの膜電位変動に反映されやすいことが考えられる。これは、海馬が mPFC に伝達する全ての情報は、均一に伝達されるのではなく、一部の情報が選択的に伝達されることを示唆する。

4. 図

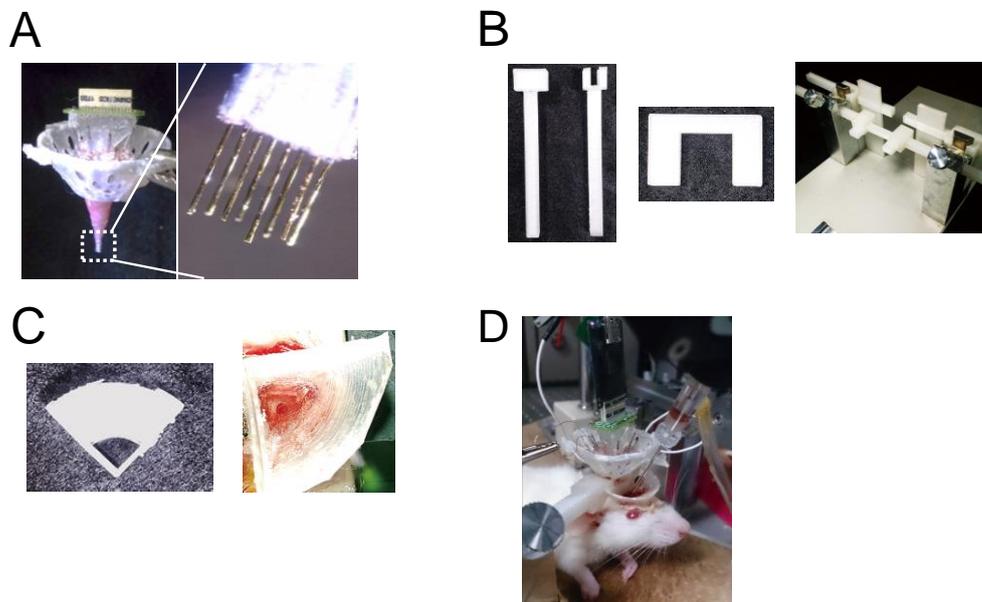


図 1. 同時記録に使用する電極セットと 3D パーツ

- A) 記録に使用した電極セット。テトロードと呼ばれる電極を使用し、マイクロドライブという支持体に収納される。個々の電極の位置は、ねじ回しによる調節が可能である。
- B) 覚醒動物の頭部を固定する 3D パーツ。
- C) パッチクランプ開頭部位を保護する 3D パーツ。中心部にパッチクランプ電極を刺入する穴を開けている。
- D) テトロードとパッチクランプ記録を組み合わせた同時記録実験の様子。

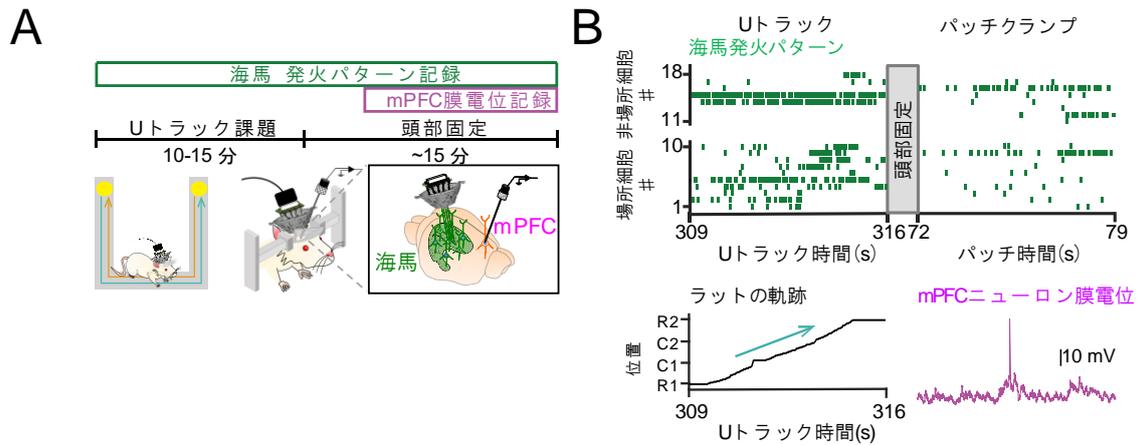


図 2. 海馬発火パターンおよび mPFC ニューロン膜電位変動の同時記録

- A) 実験のタイムコース。電極セットを海馬に埋めたラットに U 字型のトラックを探索させる行動課題を行い、その時の海馬ニューロンの発火パターンを記録する。その後、ラットを頭部固定台に移動させ、海馬ニューロンの発火パターンを記録したまま、同時に mPFC ニューロンからパッチクランプ記録により膜電位変動を記録する。
- B) 左には U トラック課題中の海馬ニューロンの発火パターンのラスタープロット表示およびラットの軌跡を示す。右にはパッチクランプ記録中の海馬ニューロンの発火パターンと mPFC ニューロンの膜電位変動を示す。

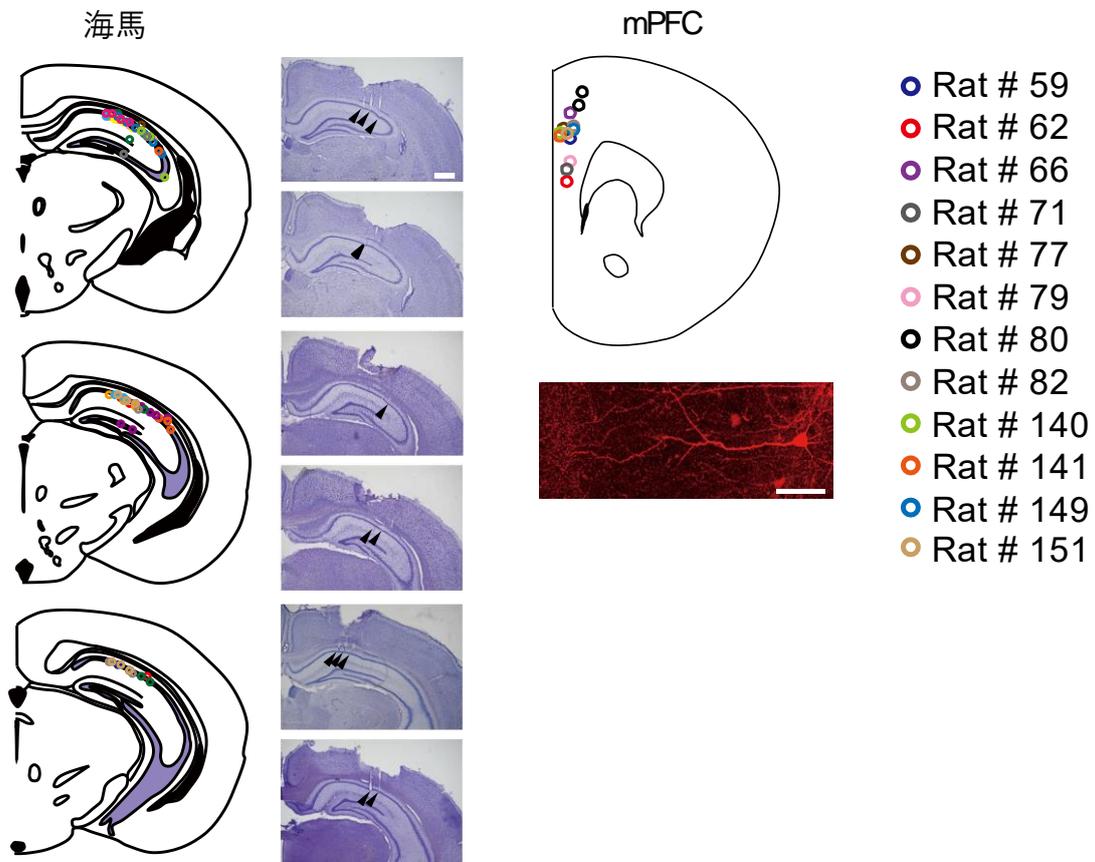


図 3. 海馬および mPFC ニューロンの記録位置

左) テトロード記録を行った海馬冠状切片のクレイシルバイオレット染色像の代表写真(黒矢じりが電極先端を示す。スケールバー = 1 mm)。

右) パッチクランプ記録を行った mPFC ニューロンの代表写真。バイオサイチンにより可視化を行った(スケールバー = 50 μ m)。

個々のラットの記録位置はそれぞれ図中の色付きの丸印に対応している。

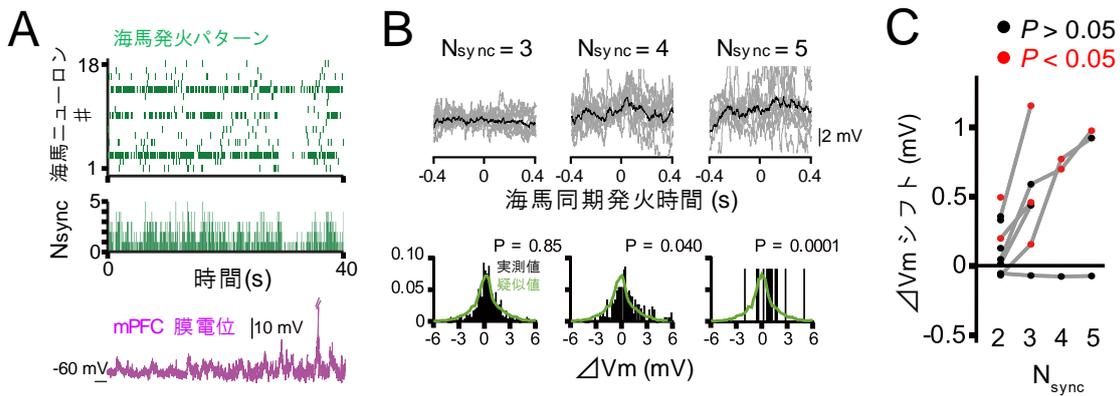


図 4. 海馬同期発火の大きさと mPFC ニューロンの膜電位変動の関係

- A) 同時記録中における海馬ニューロン群の同期発火イベント。100 ミリ秒以内の同期発火に参加した海馬ニューロン数(N_{sync})のヒストグラムを作成した。
- B) 上) 同期発火海馬ニューロン数(N_{sync})を分けて、同期発火前後 400 ミリ秒の mPFC ニューロンの膜電位変動をプロットした(黒色:平均膜電位、灰色:実トレース)。
- 下) 同期発火前 50-200 ミリ秒間と同期発火後 0-150 ミリ秒間の平均膜電位の差を mPFC ニューロンの膜電位変動量(ΔV_m)とし、そのヒストグラムを作成した(黒色:実測値、緑色:疑似値)。
- C) B の実データ分布と疑似データ分布の分布平均値の差を ΔV_m シフトとし、同期発火海馬ニューロン数(N_{sync})に対する ΔV_m シフトの値をプロットした。

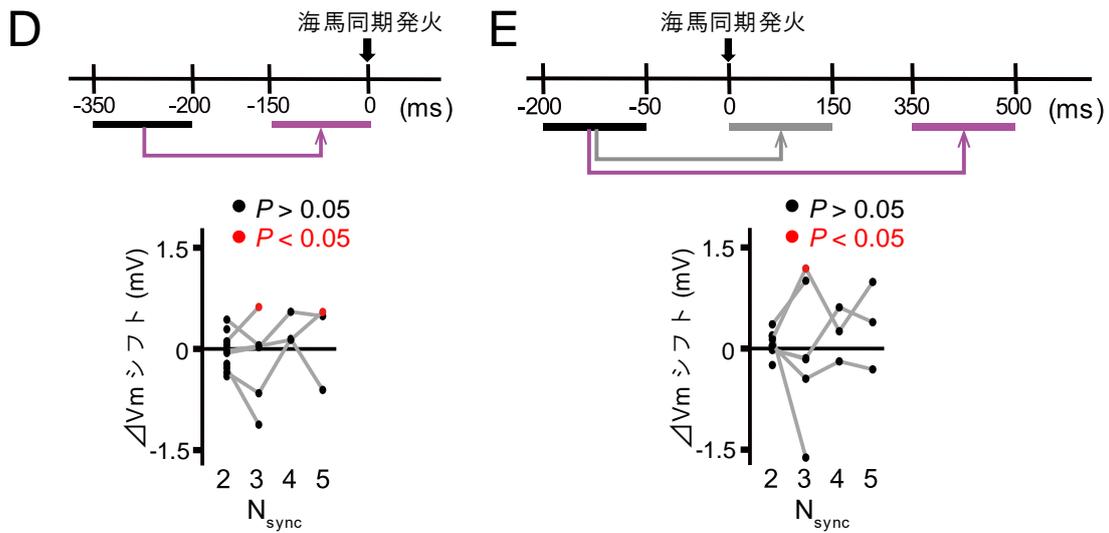


図 4. 海馬同期発火の大きさと mPFC ニューロンの膜電位変動の関係(続き)

- D) 同期発火前 200-350 ミリ秒間と同期発火前 0-150 ミリ秒間の平均膜電位の差から求められる膜電位変動量(ΔV_m)を用いて ΔV_m シフトを計算し、同期発火海馬ニューロン数(N_{sync})に対する ΔV_m シフトの値をプロットした。
- E) 同期発火前 50-200 ミリ秒間と同期発火後 350-500 ミリ秒間の平均膜電位の差から求められる膜電位変動量(ΔV_m)を用いて ΔV_m シフトを計算し、同期発火海馬ニューロン数(N_{sync})に対する ΔV_m シフトの値をプロットした。

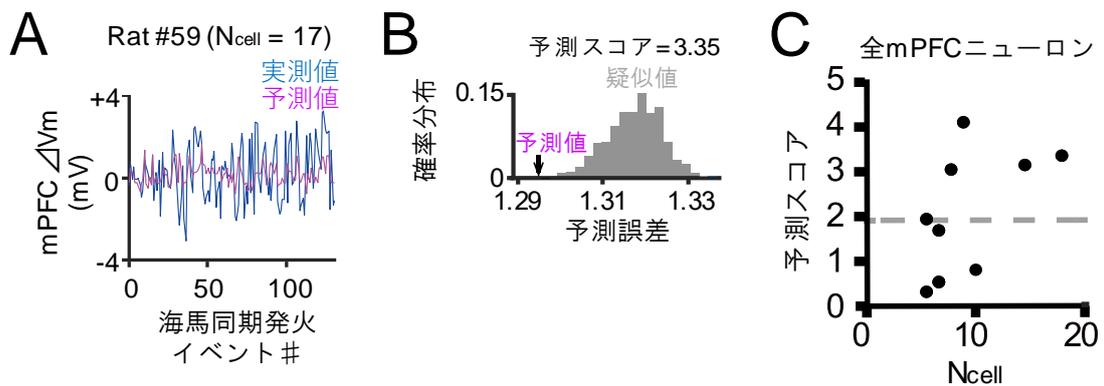


図 5. 海馬ニューロンの発火パターンと mPFC ニューロンの膜電位変動量の関係

- A) 線形回帰分析によって、各同期発火イベントの海馬ニューロンの発火パターンから mPFC ニューロンの膜電位変動量を予測する。各同期発火イベントに対応する実際に観測された膜電位変動量を青色で、予測した膜電位変動量を紫色で示した。
- B) 全ての同期発火イベントにおける膜電位変動量の実測値と予測値の差の平均値を予測誤差として求めた。分布を z-スコア化し、その値を予測スコアとした。
- C) 全 mPFC ニューロンの膜電位予測スコア。予測に用いた海馬ニューロン数 (Ncell) に対する予測スコアをプロットした。予測スコアが有意水準 95% の境界である 1.96 以上の値を持つ場合、予測が成功したと定義した。

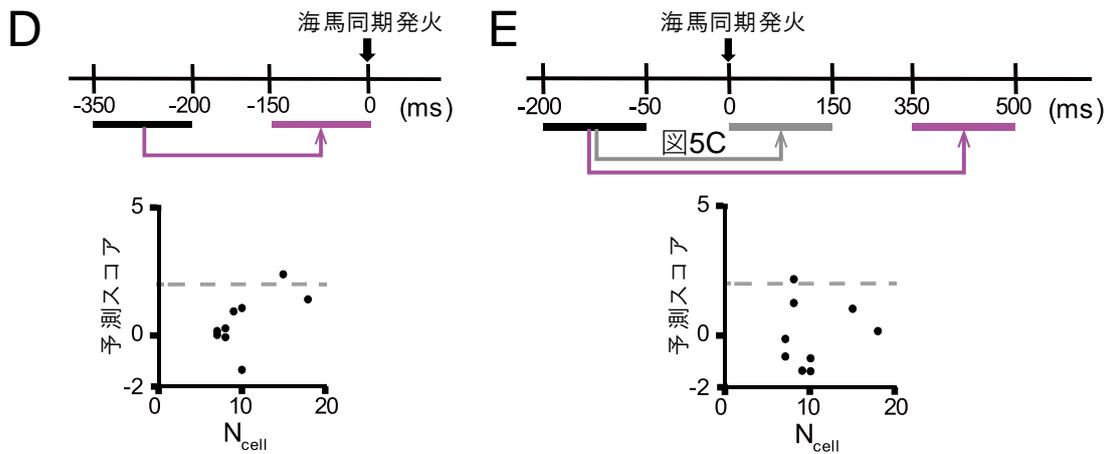


図 5. 海馬ニューロンの発火パターンと mPFC ニューロンの膜電位変動量の関係

(続き)

D) 海馬同期発火パターンから、同期発火前 200-350 ミリ秒間と同期発火前 0-150 ミリ秒間の平均膜電位の差から求められる膜電位変動量(ΔV_m)を予測できるかどうかを調べた。

E) 海馬同期発火パターンから、同期発火前 50-200 ミリ秒間と同期発火前 350-500 ミリ秒間の平均膜電位の差から求められる膜電位変動量(ΔV_m)を予測できるかどうかを調べた。

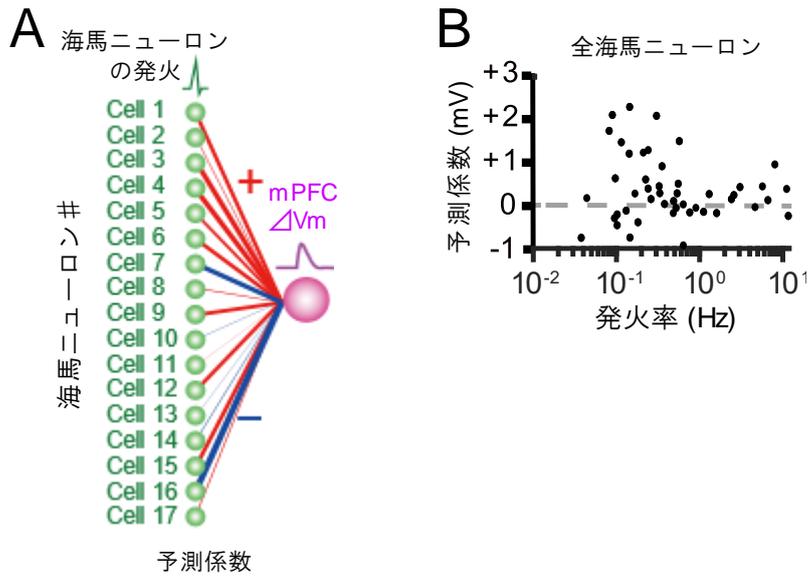


図 6. 個々の海馬ニューロンが予測する mPFC ニューロンの膜電位変動量

- A) 各海馬ニューロンが持つ膜電位予測係数。各細胞から伸びる直線の太さは予測係数の大きさを、直線の赤色は正を、青色は負を表す。
- B) 膜電位予測に成功した(予測スコアが 1.96 以上)mPFC ニューロンの記録において、海馬ニューロンの発火率と予測係数の関係を示した。

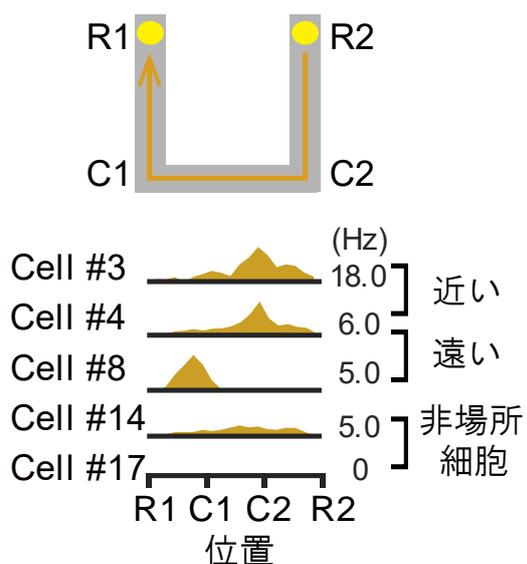


図 7. Uトラック上で記録される海馬場所細胞

Uトラック上のある空間位置で特異的に発火率を増大させる海馬場所細胞とそうでない非場所細胞の発火率の例。Uトラックを直線化し、各位置における海馬ニューロンの発火率をプロットした。右の数値は最大発火率を表す。そして場所受容野(最大発火率の30%以上の発火率を持つ範囲)が近い細胞ペア、遠い細胞ペア、非場所細胞ペアに分類した。

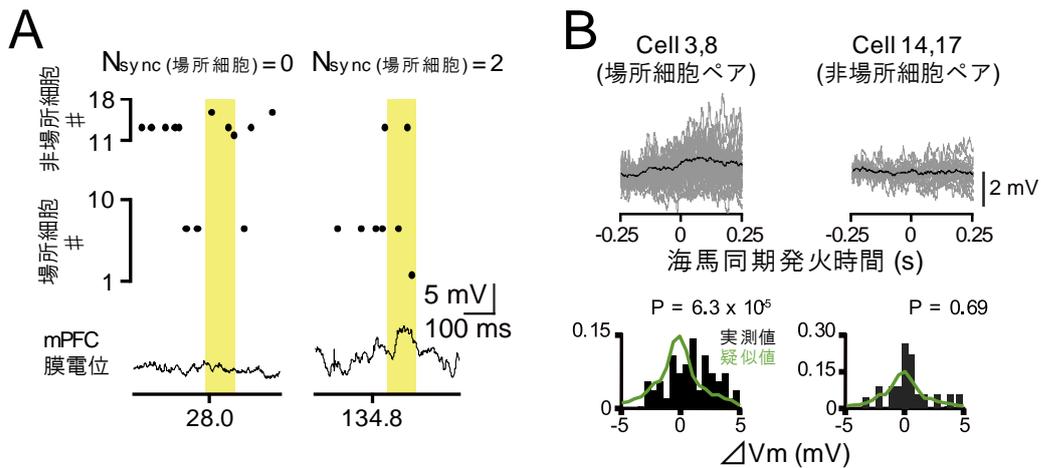


図 8. 海馬場所細胞の同期発火と mPFC ニューロンの膜電位変動量の関係

- A) 場所細胞、非場所細胞が同期発火した時の mPFC ニューロンの膜電位変動の代表例。黄色枠において 100 ミリ秒以内の海馬ニューロンの同期発火が生じている。
- B) 上) 場所細胞ペア、非場所細胞ペアが同期発火した時の mPFC ニューロンの膜電位変動をプロットした。同期発火前後 250 ミリ秒の mPFC ニューロンの膜電位変動を示す(黒色:平均膜電位、灰色:実トレース)。
- 下) 海馬同期発火前後の mPFC ニューロンの膜電位変動量(ΔV_m)のヒストグラムを作成した(黒色:実測値、緑色:疑似値)。

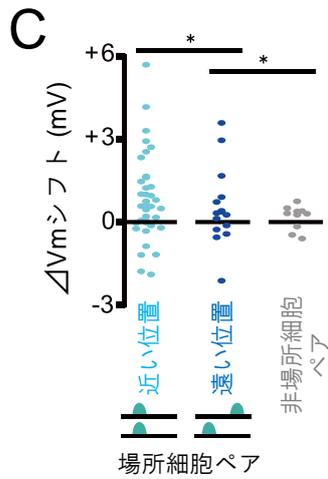


図 8. 海馬場所細胞の同期発火と mPFC ニューロンの膜電位変動量の関係(続き)

C) 実データ分布と疑似データ分布の分布平均値の差を ΔV_m シフトとし、場所受容野が近い場所細胞ペア、遠い場所細胞ペア、非場所細胞ペアが同期発火した時の mPFC ニューロンの ΔV_m シフトの値をプロットした。

5. 考察

本研究では、海馬ニューロン群の発火パターンと mPFC ニューロンの膜電位変動の関係を明らかにするため、テトロード記録とパッチクランプ記録を組み合わせた同時記録実験系を初めて確立した。この同時記録法を用いて、海馬ニューロン群の同期発火の大きさは一部の mPFC ニューロンの膜電位変動量を増大させる傾向にあること、海馬ニューロン群の同期発火パターンと mPFC ニューロンの膜電位変動量には関連があること、海馬ニューロンの中でも、海馬場所細胞の発火パターンが mPFC ニューロンの膜電位変動量に反映される傾向があることを見出した。

海馬同期発火時に生じる mPFC ニューロンが受け取るシナプス入力

本研究で、同期発火を記録した海馬ニューロンは全て背側 (dorsal) 海馬に位置する。海馬-mPFC の投射関係について、解剖学的な知見を考慮すると、腹側 (ventral)/中間(intermediate)海馬-mPFC の直接的な結合が主要な一方で、背側海馬-mPFC の直接的な結合は少数であることが知られている (Jay and Witter, 1991; Cenquizca and Swanson, 2007; Ye et al., 2017)。そのため、本研究で見られた海馬同期発火時の mPFC ニューロンの膜電位変化は、背側海馬ニューロンからの直接的なシナプス入力によるものではなく、機能的結合を反映し

たものであると考えられる。背側海馬から mPFC への情報伝達の経路として、背側海馬の活動に協調した腹側(ventral)/中間(intermediate)海馬の活動を介した経路、背側海馬と mPFC の中継点である視床結合核(Ito et al., 2015; Hallock et al., 2016)などの脳領域を介した経路が考えられる。図 6A では、個々の海馬ニューロンの発火が、mPFC ニューロンの興奮性シナプス入力だけでなく、抑制性シナプス入力をも予測することが示唆された。この結果からも、mPFC ニューロンは、抑制性ニューロンから間接的なシナプス入力を受けている可能性が考えられる。過去の研究から、海馬ニューロンの同期発火パターンによって、mPFC ニューロンの発火活動様式が異なることが知られている(Yu et al., 2017)。このような報告や個々の海馬ニューロンが持つ予測係数はその大きさや正負が様々である、という本研究結果をふまえると、同期発火する海馬ニューロンの組み合わせによって、mPFC ニューロンが受け取るシナプス入力が調節されている可能性が考えられる。

海馬同期発火時に生じる mPFC ニューロンの膜電位変動の意義

海馬ニューロンの同期発火時に、mPFC ニューロンの発火活動が変化することはこれまでに数多く報告されてきた(Jadhav et al., 2016; Shin et al., 2019)。しかし、海馬ニューロンの同期発火がシナプスレベルで mPFC ニューロンにどの

ような影響を与えうるかは明らかでなかった。従来の研究から、in vivo 麻酔条件下において、腹側海馬 CA1/海馬台への電気刺激が前辺縁皮質(Prelimbic Cortex : PL)に存在するニューロンの膜電位を変化させることは知られていた(Degenetais et al., 2003)。一方で、本研究では、in vivo 無麻酔条件下において、一部の mPFC ニューロンの膜電位が、海馬ニューロンの同期発火時に約 1mV 程度、脱分極することを見出した(図 4C)。これは発火に満たない弱いシナプス入力であるが、多数のニューロンから受けるシナプス入力の加算によって、発火を誘導するには十分なシナプス入力量である(Ikegaya et al., 2013)。

In vivo 麻酔条件下の体性感覚皮質ニューロンにおいては、発火に満たない約 3-6 mV の興奮性シナプス入力を受け取ることで、ニューロンのシナプス結合強度が変化することが知られている (Gonzalez-Rueda et al., 2018)。また、海馬内においては、海馬ニューロンの同期発火を伴うリップル波と呼ばれる高周波数振動が、海馬ニューロンのシナプス結合強度を調節することが知られている (Norimoto et al., 2018)。この海馬同期発火を伴うリップル波の発生時には、mPFC ニューロンを含む様々な脳領域のニューロンの活動量が増加することが報告されている(Logothetis et al., 2012; Tang et al., 2017,2019; Girardeau et al., 2017)。本研究で見出された結果をふまえると、海馬同期発火は、海馬内だけでなく、海馬外の脳領域に存在するニューロンのシナプス結合強度を調節する可

能性が考えられる。

一方で、海馬ニューロンの同期発火時に、膜電位変動量が変化しない mPFC ニューロンも存在した。海馬ニューロンの同期発火時、実際には約 35% の mPFC ニューロンにおいて、発火率の増大や減少が見られることが報告されている (Jadhav et al., 2016)。海馬同期発火に応答する閾値が mPFC ニューロン間で異なることで、個々の mPFC ニューロンが処理する情報量に差が生じ、神経回路が最適化される可能性が考えられる。

海馬場所細胞の同期発火と mPFC ニューロンの膜電位変動の関係

海馬から mPFC への情報伝達を記述する従来の研究のほとんどは、単に両者の発火数や発火タイミングを比較したものであった。そのため、mPFC は海馬からどのような情報を受けているのか、個々の海馬ニューロンの発火が持つ情報の内容に関しては無視されてきた。本研究では、同時記録を行う前に、ラットに U 字型トラック課題を行わせることで、記録した海馬ニューロンが持つ場所情報の内容を分類した。これにより、近い位置に場所受容野を持つ場所細胞ペアの同期発火が、mPFC ニューロンの膜電位変動に反映されやすいことを見出した(図 8C)。従来の研究から、近い位置に場所受容野を持つ場所細胞ペアは同期発火しやすいことが知られている (O'Neill et al., 2008)。また、動物の課題学習

後には課題学習前に比べて、同期発火が生じやすくなることが知られている (Cheng et al., 2008; Eschenko et al., 2008)。このことをふまえると、動物が直前に経験した学習に関与する一部の情報が海馬で強く表現された時、mPFC にその情報が優先して伝達されている可能性が考えられる。すべての情報を脳内に留めておくことは脳の情報処理に大きなコストが生じる。脳内の情報処理において、動物の生存にとって重要な情報は、ニューロン間のシナプス結合を強めることで脳内に優先的に保存する一方で、重要でない情報はニューロン間のシナプス結合を弱めることで脳内に保存しない、というようなシナプスの重みづけ機構(シナプティック・スケーリング)が備わっていると考えられる。本研究で見出された場所細胞の同期発火時に見られる mPFC ニューロンの膜電位変動は、そのような情報の選別機構の存在を支持するものであり、効率的な脳内情報処理を促進する可能性が考えられる。

ニューロンの同期発火は、海馬以外にも mPFC、視覚皮質、聴覚皮質などの多くの他の脳領域でも生じることが確認されている (Ji and Wilson, 2006; Peyrache et al, 2009; Rothschild et al; 2017)。そのため、本研究が明らかにした現象は、海馬-mPFC 神経回路のみならず、あらゆる神経回路に共通する現象である可能性が考えられる。

6. 結論

本研究では、ラットを用いて、複数の海馬ニューロンの発火と mPFC ニューロンの膜電位変動を同時記録する手法を初めて確立した。この方法を用いて、海馬ニューロン群の同期発火の大きさは mPFC ニューロンの膜電位変動に影響を与えること、個々の海馬ニューロンの発火パターンと mPFC ニューロンの膜電位変動量には関連があること、さらに海馬場所細胞の同期発火は mPFC ニューロンの膜電位変動に反映されやすいことを見出した。このような、海馬で生成される情報の mPFC への選択的な伝達は、効率的な情報処理を支えるメカニズムの一つである可能性が考えられる。本研究は海馬と mPFC の二つの脳領域をモデルとして、神経回路レベルとシナプスレベルをつなぐ情報伝達メカニズムの直接的な証拠の一つを提示したものである。本研究は海馬-mPFC 神経回路のみならず、神経回路全般における領域間情報伝達の特徴に言及しうる初めての知見となる。

7. 参考文献

- Buzsaki G (2015) Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 25:1073-1188.
- Cenquizca LA, Swanson LW (2007) Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:1-26.
- Cheng S, Frank LM (2008) New experiences enhance coordinated neural activity in the hippocampus. *Neuron* 57:303-313.
- Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2003) Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex* 13:782-792.
- Eichenbaum H (2017) Prefrontal-hippocampal interactions in episodic memory. *Nat Rev Neurosci* 18:547-558.
- Epszstein J, Brecht M, Lee AK (2011) Intracellular determinants of hippocampal CA1 place and silent cell activity in a novel environment. *Neuron* 70:109-20
- Eschenko O, Ramadan W, Molle M, Born J, Sara SJ (2008) Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn Mem* 15:222-228.
- Euston DR, Tatsuno M, McNaughton BL (2007) Fast-forward playback of recent memory sequences in prefrontal cortex during sleep. *Science* 318:1147-1150.
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsaki G, Zugaro MB (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci* 12:1222-1223.
- González-Rueda A, Pedrosa V, Feord RC, Clopath C, Paulsen O (2018) Activity-Dependent Downscaling of Subthreshold Synaptic Inputs during Slow-Wave-Sleep-like Activity In Vivo. *Neuron* 97:1244-1252
- Hallock HL, Wang A, Griffin AL (2016) Ventral Midline Thalamus Is Critical for Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Spatial Working Memory. *J Neurosci* 36:8372-8389.
- Ikegaya Y, Sasaki T, Ishikawa D, Honma N, Tao K, Takahashi N, Minamisawa G, Ujita S, Matsuki N (2013) Interpyramid spike transmission stabilizes the sparseness of recurrent network activity. *Cereb Cortex* 23:293-304.
- Ito HT, Zhang SJ, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2015) A prefrontal-thalamo-hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature* 522:50-55.
- Jadhav SP, Rothschild G, Roumis DK, Frank LM (2016) Coordinated Excitation and Inhibition of Prefrontal Ensembles during Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripple Events. *Neuron* 90:113-127.

- Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313:574-586.
- Ji D, Wilson MA (2007) Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. *Nat Neurosci* 10:100-107.
- Larry R. Squire, Lisa Genzel, John T. Wixted and Richard G. Morris (2015) Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a021766
- Lee AK, Wilson MA (2002) Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron* 36:1183-1194.
- Logothetis NK, Eschenko O, Murayama Y, Augath M, Steudel T, Evrard HC, Besserve M, Oeltermann A (2012) Hippocampal-cortical interaction during periods of subcortical silence. *Nature* 491:547-553.
- Maingret N, Girardeau G, Todorova R, Goutierre M, Zugaro M (2016) Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci* 19:959-964.
- Norimoto H, Makino K, Gao M, Shikano Y, Okamoto K, Ishikawa T, Sasaki T, Hioki H, Fujisawa S, Ikegaya Y (2018) Hippocampal ripples down-regulate synapses. *Science* 359:1524-1527.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Res.* 34:171-175
- O'Keefe J, Nadel L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press, Oxford 1978
- O'Neill J, Senior TJ, Allen K, Huxter JR, Csicsvari J (2008) Reactivation of experience-dependent cell assembly patterns in the hippocampus. *Nat Neurosci* 11:209-215.
- Peyrache A, Khamassi M, Benchenane K, Wiener SI, Battaglia FP (2009) Replay of rule-learning related neural patterns in the prefrontal cortex during sleep. *Nat Neurosci* 12:919-926.
- Rothschild G, Eban E, Frank LM (2017) A cortical-hippocampal-cortical loop of information processing during memory consolidation. *Nat Neurosci* 20:251-259.
- Shin JD, Tang W, Jadhav SP (2019) Dynamics of Awake Hippocampal-Prefrontal Replay for Spatial Learning and Memory-Guided Decision Making. *Neuron*.
- Tang W, Jadhav SP (2019) Sharp-wave ripples as a signature of hippocampal-prefrontal reactivation for memory during sleep and waking states. *Neurobiol Learn Mem* 160:11-20.
- Tang W, Shin JD, Frank LM, Jadhav SP (2017) Hippocampal-Prefrontal Reactivation during Learning Is Stronger in Awake Compared with Sleep States. *J Neurosci* 37:11789-11805.

- Tonegawa S, Morrissey MD, Kitamura T (2018) The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat Rev Neurosci* 19:485-498.
- Wang DV, Ikemoto S (2016) Coordinated Interaction between Hippocampal Sharp-Wave Ripples and Anterior Cingulate Unit Activity. *J Neurosci* 36:10663-10672.
- Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265:676-679.
- Ye X, Kapeller-Libermann D, Travaglia A, Inda MC, Alberini CM (2017) Direct dorsal hippocampal-prelimbic cortex connections strengthen fear memories. *Nat Neurosci* 20:52-61.
- Yu JY, Liu DF, Loback A, Grossrubatscher I, Frank LM (2017) Specific hippocampal representations are linked to generalized cortical representations in memory. *Nat Commun.* 9(1): 2209.

8. 謝辞

本研究を行うにあたり、いつも親身にご指導・ご鞭撻いただきました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の池谷裕二 教授に、心より感謝致します。セミナーにおいては、研究に対する鋭い御指摘・適切な御助言を数多く賜りました。また、研究の困難に直面した際には、私の粘り強さを認めて頂き、いつも温かい励ましの言葉を掛けて下さり、大きな支えとなりました。

研究室内でのセミナーをはじめとする議論の場において、研究に対する適切な御指摘・御助言を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の小山隆太 准教授、中嶋藍 助教、松本信圭 助教、および 化学物質安全性評価システム構築教室の竹内春樹 准教授に心よりお礼を申し上げます。

五年間の研究生活において、直接の指導を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の佐々木拓哉 助教に心よりお礼申し上げます。私の手先の器用さと行動特性を把握し、他の人が真似できない挑戦的な実験テーマを設定して頂きました。また実験環境の整備、実験系の立ち上げなどに関わることができました。地道な作業を行うことに労を惜しまず、コツコツと努力する姿勢を身につけることができ、その経験は研究者として大きな糧となりました。

同研究グループとして、本研究をあらゆる面からサポートしていただきました東京大学薬学系研究科薬品作用学教室の井形秀吉君、鹿山将君、中山亮太君、青木勇樹君、岡田桜さん、八木佐一郎君、小此木闘也君、三宅功朔君に心よりお礼を申し上げます。

研究生活を送る中で、温かいご支援をいただきました薬品作用学教室の先輩、後輩の皆さまに心よりお礼を申し上げます。

本研究は、様々な方のご指導やご支援のもと行ってまいりました。最後に今一度、お力添えいただいた全ての方へ、深く感謝申し上げます、本論文の結びとさせていただきます。