

ニューロフィードバックによる
海馬シータ位相歳差の誘導

青木 勇樹

目次

1. 序論	4
2. 方法	7
動物実験の承認.....	7
実験動物.....	7
手術.....	7
電極の位置調整.....	9
電気生理学的記録.....	9
電極位置確認のための組織学的解析.....	10
スパイクソーティング.....	11
リニアトラック課題.....	11
行動試験系.....	12
フィードバックシステム.....	12
成功トライアルと失敗トライアルの分類.....	14
発火場所の類似度の計算.....	15
リップルイベントの検出.....	15
リップル中の発火頻度の計算.....	16
3. 結果	17
光遺伝学的手法とマルチユニット記録手法による神経活動操作・記録手法.....	17
シータ位相歳差を誘導するニューロフィードバックの開発。.....	18
シータ位相歳差を誘導した場所細胞は、安定した場所表象を示す。.....	22
シータ位相歳差の誘導が、その後の睡眠時の再活性化を上昇させる。.....	23
4. 考察	26
ニューロフィードバックを用いたシータ位相歳差への介入.....	26
シータ位相歳差とシナプス結合強度の上昇.....	28
コリン性入力とシナプス結合強度の上昇の関連.....	29
空間記憶の獲得・固定化との関連.....	30
総括.....	32
5. 図.....	33
図 1. 光遺伝学的手法とマルチユニット記録手法による神経活動操作・記録系.....	33
図 2. ニューロフィードバックを用いた光刺激.....	35
図 3. シータ位相歳差の誘導により、発火場所の類似度が上昇した。.....	39
図 4. シータ位相歳差の誘導により、直後の睡眠時におけるリップル中の発火頻度が上昇した。.....	41
6. 補足図.....	43

補足図 1. 場所細胞の発火活動.....	43
補足図 2. 場所細胞のシータ位相歳差.....	44
補足図 3. 行動時と睡眠時の海馬神経活動	45
補足図 4. ニューロフィードバックのフローチャート	47
補足図 5. 海馬 CA1 野とその上流脳領域	48
7. 参考文献.....	49
謝辞.....	57

1. 序論

海馬は個体のエピソード記憶の形成や、空間学習にとって重要な役割を持つ脳領域である。個体の覚醒・運動時において、海馬に存在する多数の神経細胞は、動物が特定の場所を通過するときのみ発火活動を示す「場所細胞」として活動する (O'Keefe and Dostrovsky, 1971) (補足図 1)。この場所依存的な発火活動は動物種を超えて保存された神経活動であることが知られており、コウモリや霊長類、ヒトにおいても海馬に場所細胞が存在することが報告されている (Ekstrom et al., 2003; Hori et al., 2005; Ulanovsky and Moss, 2007)。場所細胞の発火活動は、個体の現在地という外部情報を精緻に反映する神経活動であり、脳内における情報処理の神経基盤を解明するためのモデルとして非常に多くの研究が行われている。

場所細胞が示す発火活動は、個体の場所の情報にのみ依存して生じるわけではないことがこれまでの研究から知られている。動物の覚醒・運動時には海馬においてシータ波と呼ばれる 5 - 10 Hz 程度の脳波が記録される。場所細胞は、個体の場所の情報に加えて、このシータ波の位相にも依存して発火活動を示すことが知られている。シータ波の位相と場所細胞の発火タイミングを比較すると、動物が場所受容野に侵入する際には、シータ波の位相の後半で場所細胞が発火し、動物が場所受容野内を進むにつれてシータ波の位相の前半で発火するようになる。このように、場所細胞の発火がシータ波の位相に対して前進する現象は、「シータ位相歳差」と呼ばれている (O'Keefe and Recce, 1993)

(補足図2)。この発見により、海馬で行われる場所の情報の処理が、神経細胞の発火頻度の上昇によって情報がコードされる Rate coding に加えて、神経細胞の発火タイミングによって情報がコードされる Temporal coding も同時に行われていると考えられてきた(Harris et al., 2002; Mehta et al., 2002)。シータ位相歳差は、海馬以外にも、前頭前皮質や腹側線条体などでも観測されることが知られており(Jones and Wilson, 2005; van der Meer et al., 2011)、コウモリやヒトの海馬においてもシータ位相歳差が存在することが報告されている(Eliav et al., 2018; Qasim et al., 2020)。これらの知見から、シータ位相歳差は、動物種を超えて保存されている、脳内の情報処理メカニズムの基盤である可能性が考えられる。

このシータ位相歳差の持つ役割の解明を目指して、様々な研究が行われてきた。近年特に注目されているのは、行動後の睡眠・安静時の神経活動との関連である。海馬の神経活動は、個体の覚醒・行動時と、睡眠・安静時において異なることが知られている(補足図3)。睡眠・安静時には、シータ波は消失し、リップルと呼ばれる 150–250 Hz 程度の高周波の脳波が不規則なタイミングで生じる。さらに、このリップルに伴い複数の場所細胞が同期的に発火活動を示す「再活性化」が生じる。再活性化は記憶の固定化に重要な役割を果たすことが阻害実験や誘導実験から示されている(Girardeau et al., 2009; Jadhav et al., 2012; Fernández-Ruiz et al., 2019)。近年、行動時のシータ位相歳差を阻害するとその後の睡眠時における再活性化が低下することが報告された(Drieu et

al., 2018)。これらの知見から、行動時の場所細胞のシータ位相歳差がその後の睡眠時の再活性化を誘導する可能性が挙げられており、行動時のシータ位相歳差とその後の再活性化が記憶の獲得・固定化の神経基盤を担うと考えられている。

しかし、従来の研究では、シータ位相歳差に介入するために、薬理的な神経活動の抑制や動物の行動の阻害などの手法を用いている。これらの手法には時間解像度が低いという問題点がある。これらの手法はシータ位相歳差自体を阻害しているのではなく、シータ波を抑制することによって、シータ位相歳差が阻害されるという間接的な手法となっている。わずか数百ミリ秒程度で生じるシータ位相歳差自体を操作するためには、シータ波をリアルタイムに記録・解析し、特定の条件を満たした際にのみ操作を行うニューロフィードバックが必要となる。さらに、そのようなニューロフィードバックを用いれば、従来の手法では実現できなかったシータ位相歳差の誘導を行うことが可能となり、シータ位相歳差の誘導が海馬神経活動に与える影響を初めて解析することができる。本研究では、このシータ位相歳差を誘導するニューロフィードバックを開発し、シータ位相歳差の持つ役割を直接示すことを目的とした。特に、シータ位相歳差の誘導によって形成された場所細胞の発火活動がその後にも保存されているか、また、直後の睡眠時の再活性化にどのような影響が生じるかに注目して解析を行った。

2. 方法

動物実験の承認

すべての動物実験は、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おこなった(承認番号：P29-7)。

実験動物

日本 SLC より購入した 16 匹の雄性 Long Evans ラット (3-6 ヶ月齢； 体重 400-500 g) を用いた。ラットは昼夜逆転した 12 時間の明暗サイクル (午前 7:00 に消灯) のもと、自由摂食・摂水下で個飼いした。動物搬入後少なくとも 1 週間は飼育環境に馴れさせた。行動課題のトレーニングの前には、それぞれの体重の 85 % まで体重を減らすように、食餌制限を行った。

手術

最初にイソフルラン吸入麻酔下 (0.5-2.5 %) で背側海馬 CA1, CA3 にアデノ随伴ウイルスを導入するため、Bregma から AP 方向に -3.5 mm, ML 方向に 3.3 mm の位置を中心に、直径 1.2-1.6 mm の穴をドリルで頭蓋骨にあけた。硬膜を取り除き、ガラス電極を用いて、AAV₅-CaMKIIa-hChR2(H134R)-EYFP を 300 nL (100 nL/min) ずつ CA1 に 3 箇所 (AP: -3.5 mm, ML: 2.4 mm, DV: 2.4 mm, AP: -3.5 mm, ML: 3.0 mm, DV: 2.6 mm,

AP: -3.5 mm, ML: 3.6 mm, DV: 2.8 mm)、CA3 に 4 箇所(AP: -3.5 mm, ML: 3.4 mm, DV: 3.8 mm, AP: -3.5 mm, ML: 3.7 mm, DV: 4.0 mm, AP: -3.5 mm, ML: 4.0 mm, DV: 4.0 mm, AP: -3.5 mm, ML: 4.3 mm, DV: 4.0 mm)、局所投与した。各箇所において、局所投与後 1 分間ガラス電極を留置し、100 μm 引き上げてから再び 5 分間留置した。その後ガラス電極を引き抜いた。露出した脳表は Kwik-Sil Silicone Elastomer (World Precision Instruments, FL, USA) で保護し、頭皮を縫合した。

ウイルス導入手術から 2-4 週間後にイソフルラン吸入麻酔下 (0.5-2.5 %) でマイクロドライブ埋め込みの手術を行った。三点固定装置に頭部を固定して頭皮を切開したのち、2 本のステンレスビスを前頭皮質上部の頭蓋骨に埋め込み、GND と参照電極とした。マイクロドライブは、独立に下ろす深さを調節できる 16 本のテトロードと 1 本の光ファイバー (直径 200 μm) からなり、3D プリンタ (Form 2, Formlabs) を用いて製作を行った。マイクロドライブは、AP: -3.5 mm, ML: 3.0 mm の位置に刺入した。マイクロドライブの先端は皮質表面まで下ろし、ビスと歯科用セメントで固定した。埋め込み手術が終わった時点で、それぞれのテトロードを 1.0 mm 下げて脳に刺入した。テトロードは、ポリイミドコートされた白金イリジウム合金 (90/10%) のワイヤー (直径 17 μm ; California Fine Wire) を撚ることで製作した。テトロードの先端は白金メッキを行い、1 kHz におけるインピーダンスを 150-300 $\text{k}\Omega$ に下げた。ラットは術前の少なくとも 3 日前には食餌制限を解除し、自由摂食・接水下で飼育した。術後少なく

とも 5 日後も自由摂食・接水下で飼育した後、徐々に食餌制限を開始し、もとの体重の 85 % まで体重を下げてトレーニングを再開した。

電極の位置調整

ラットの頭上のマイクロドライブは、アナログ-デジタル変換器 Cereplex M (Blackrock)、コミュニテータを介して、データ取り込み装置 Cerebus recording system (Blackrock) に接続した。ラット頭上のマイクロドライブ、アナログ-デジタル変換器、およびケーブルは、ラットが行動課題を問題なく遂行できる重さである。電極位置の調整は、ラットがレストボックス (1.2 m × 1.4 m) で安静にしているときに行った。術後、それぞれのテトロードを 1 日あたり 25-100 μm ずつ、12-23 日間に渡って海馬 CA1 野の細胞層に到達するまで下ろした。海馬の細胞層への到達は、局所場電位 (local field potential; LFP) と単一の細胞の発火パターンから推定した。テトロードが細胞層に近づいたら (小さい multi-unit activity が見られるようになる)、テトロードを細胞層に留め、数日間に渡り記録を行った。

電気生理学的記録

神経活動の記録は、海馬の multi-unit activity が安定してよく分離できるようになってから始めた。術後の行動電気生理記録のパラダイムは術前のトレーニングと同様であ

る。記録を始める前に、ラットは ~7 日間トレーニングを行った。記録状況にラットが慣れるように、マイクロドライブにケーブルを繋いでトレーニングを行うこともした。術後のラットの行動課題の成績が、術前と同じ水準を超えてから、電気生理記録を始めた。LFP の記録は 2 kHz のサンプリングレートで行い、500 Hz のローパスフィルタをかけた。細胞のスパイクの記録は、750 Hz のハイパスフィルタをかけた LFP からスパイクの波形を抽出した。スパイクの波形が $-50 \mu\text{V}$ の閾値を下回った時点をトリガーとし、30 kHz で 1.6 ms 記録した。行動課題中の電気生理記録は少なくとも 3 日間行った。

電極位置確認のための組織学的解析

ラットに過剰量のウレタン麻酔を腹腔内投与した後に開胸し、心臓内から 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝生理食塩水 (PFA; pH 7.4) を灌流した。電極の痕を残すために灌流固定後すぐに電極は抜かずに、首を切断して 3-4 時間静置した。脳を摘出し、4% PFA に一晩浸して固定した。その後、20% スクロース水溶液、30% スクロース水溶液の順に浸し、スクロース置換を行った。脳を凍結し、マイクロトームを用いて $50 \mu\text{m}$ の厚さの coronal 切片を作成した。スライドガラスに脳切片を載せ、DAPI 染色液に約 1 分間浸けて染色した後、スライドガラスに貼り付け、封入剤 PermaFlour (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を用いて封入した。倒立型蛍光位相差顕微鏡 BZ-

X710 (Keyence, Osaka, Japan) により撮影を行った。

スパイクソーティング

スパイクソーティングは電気生理記録が終わった後に、MClust (<http://redishlab.neuroscience.umn.edu/MClust/MClust.html>) を用いて行った。電気生理記録の安定性を確認し、また行動課題中に発火しない海馬の細胞を判別するために、行動課題前後のレストボックスにおけるデータも解析している。クラスタリングは、複数のスパイク特徴量（各テトロード 4 チャンネルから得られたスパイクの大きさ、スパイクのピークの大きさ、スパイク波形の積分値、スパイク波形の主成分）を様々な組み合わせで 2 次元平面上にプロットし、手動で境界線を引くことで行った。またスパイクタイミングの自己相関関数および相互相関関数もクラスタリングの基準として用いた。スパイクの大きさがノイズレベルよりも大きく、L raito が 0.4 以下であるクラスターを採用した。細胞の不応期も考慮にいれている。

リニアトラック課題

2.0 m × 0.1 m のプラットフォーム上（床から 70 cm 上）でトレーニングを行った。プラットフォームの周囲は高さ 2 cm の壁で囲まれている。プラットフォーム上の一端にチョコミルクを約 200 μ L を置いた。ラットがそのチョコミルクを得た後、プラッ

トフォームのもう一端にチョコミルクを約 200 μ L 置いた。これを交互に繰り返すことにより、ラットにプラットフォーム上を往復させた。

行動試験系

リニアトラック課題を行う前に、レストボックスにおいて睡眠・安静時の神経活動を課題前レストとして1時間記録した。次に、フィードバックを用いて光刺激を行いつつリニアトラック課題を15分間行わせた。再びレストボックスにラットを戻し、睡眠・安静時の神経活動を課題後レストとして1時間記録した。最後にアフターコントロールとして、フィードバックを行わない条件でリニアトラック課題を15分間行わせた。

フィードバックシステム

電気生理記録装置 Cerebus (Blackrock) の extension code の機能を使った。C 言語でプログラムを用意し、記録装置にアップロード、コンパイルすることでリアルタイムにデータを解析し、フィードバックを行う。シータ位相歳差を誘導するために、動物の位置のデータと脳波についてリアルタイムに解析を行った。

動物の位置データは、カメラを用いて動物の位置をリアルタイムに推定し、記録装置に電気信号として送信した。カメラは天井に固定した。暗所においてラットの位置を撮影しやすくするため、電極セットに赤色の LED を装着した。カメラから得られた映像

(約 25 fps) を、Python を用いて解析し、ラットの位置を推定した。刺激エリア内でのラットの位置を 0~1 で表現し、その値に対応する Duty 比の PWM 波を、Arduino Uno (Arduino) を介して Cerebus に送信した。Arduino の制御には pyFirmata ライブラリを用いた。Cerebus では、受け取った PWM 波から、9 周期分ごとに Duty 比を計算し、ラットの位置をデコードした。また、ラットが刺激エリア内にいるかどうかを判定するシグナル(In field signal)を Arduino の Digital Output から送信した。

脳波は、オプト電極から得られる脳波となるべくシータ波の位相が類似している脳波を代表として使用した。得られた脳波(30 kHz)に対してリアルタイムに 7-8 Hz のバンドパスフィルタを適用し、シータ波を得た。得られたシータ波に対し、3 フレーム前、6 フレーム前の値と比較を行い、シータ波の山と谷を検出した。

以上の 2 変数を用いて、以下のようにして刺激タイミングを決定した。まず、In field signal を常に監視し、ラットが刺激エリア内に侵入したフレームからシータ波の解析、PWM 波のデコードを開始した。また、これ以降、In field signal がオフになったフレームで脳波の解析、PWM 波のデコードは即時に終了する。最初にシータ波の山が検出されたタイミングで一度光刺激を行った。それと同時に、次の刺激タイミングを、以下の式に従って計算した。

$$Frame = \frac{Sampling\ rate * (1 - \frac{Number\ of\ Past\ Theta\ Waves}{Number\ of\ Theta\ Waves'})^{NL}}{Frequency'}$$

Frame: シータ波の山を検出した後、Frame 数後に刺激を行う。

Number of Theta Waves': これまでの走行距離と検出したシータ波の山の数から推定した、場所受容野を通過するまでに生じるシータ波の数。

Frequency': シータ波の数と記録時間から推定される、現在のシータ波の周波数

NL: Phase precession の速度の変化率。本研究では 0.9 を採用した。

以降、In field signal がオフになるまで、シータ波の山が検出されるたびに上記の計算式に従って光刺激を行うフレームを決定した。補足図 4 に処理のフローチャート図を示す。

成功トライアルと失敗トライアルの分類

行動課題中、ラットがトラックの端から端まで走り抜けずに、道を引き返す行動をしばしば示す。このようなトライアルは失敗トライアルとして分類し、以降の解析では使用しなかった。失敗トライアルの分類は以下の 2 つの基準を用いた。①トラックの両端から 25 cm をそれぞれ報酬エリアとした。一端の報酬エリアを出たあともう一端の報酬エリアに侵入することなく、同じ端の報酬エリアに侵入したトライアルは失敗トライアルと分類した。②一端の報酬エリアから、もう一端の報酬エリアに進む際に、各フレームにおけるラットの速度を算出する。正しい進行方向の速度を正、逆走した場合の速度を負とした場合に、速度の大きい方から上位 85% に負の速度が含まれていた場合、失敗トライアルと分類した。上記①、②の基準に当てはまらないトライアルを成功トラ

イアルと分類し、以降の解析で用いた。

発火場所の類似度の計算

リニアトラック上の場所を 50 mm ごとの bin で区切り、各 bin におけるラットの滞在時間を算出した。また、各神経細胞について、ラットが各 bin にいた際に記録された発火数をそれぞれ算出した。発火数を滞在時間で割ることで、各神経細胞が各場所で示した発火頻度を算出した。各課題において得られた発火頻度の相関係数を求め、発火場所の類似度とした。

リップルイベントの検出

各記録日について、代表電極を 1 本選び、150-250 Hz のバンドパスフィルタを適用した後、ヒルベルト変換で envelope を求め、sigma=4 ms のガウシアンフィルタを適用し、リップルパワーとした。リップルパワーの平均と、標準偏差を計算し、 $\text{mean} + 3 \text{ s.d.}$ 以上のパワーを示したタイミングを検出し、それぞれのイベントについて、 $\text{mean} + \text{s.d.}$ との交点をリップルイベントの開始点、終了点とする。ただし、イベントの期間が 50 ms 以下のもの、500 ms 以上のものはノイズとして解析に用いなかった。

リップル中の発火頻度の計算

リップルにロックした発火活動を解析するため、リップル発生タイミングを基準として、相対的発火時間を算出し、5 ms ごとに bin を区切って発火率を求めた。リップル発生タイミングから 15ms の発火率の最大値をリップル中の発火頻度と定義した。

3. 結果

光遺伝学的手法とマルチユニット記録手法による神経活動操作・記録手法

本研究では、時間解像度高く神経活動の操作と記録を行う必要があるため、光遺伝学的手法と、マルチユニット記録手法を組み合わせる自由行動下のラットに適用した(図 1A)。光遺伝学的手法は、光照射によって特異的に活性化するタンパク質を遺伝的に細胞に導入する手法であり、特に神経細胞に導入することで、光照射によって時間解像度高く神経活動を操作することが可能となる。本実験においては、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて、興奮性神経細胞マーカーである CaMKII プロモーター下特異的に光感受性陽イオンチャネルであるチャネルロドプシン 2 (ChR2) を導入することを試みた。ChR2 は青色光の照射によって陽イオンチャネルを開口させる。これにより、神経細胞を脱分極させることで発火活動を誘導する。右側海馬 CA1 野、CA3 野に AAV5-CaMKII-hChR2(H134R)-EYFP を局所投与し、タンパク質の安定した発現まで 4 週間以上待ってから青色光照射による神経活動操作を行った。この神経活動操作と同時に神経活動の記録を行うため、マルチユニット記録手法を適用した。マルチユニット記録手法は、多数の電極を脳内に刺入することで、脳波や複数の神経細胞の発火活動を同時に記録する手法である。今回用いたテトロッド電極の内、1 本を光ファイバーと接着した(図 1B)。これにより、光が照射された神経細胞の発火活動を記録することが可能になると考えた。実際に神経活動の操作・記録を行った代表例を図 1C に示す。上段は海馬

脳波を下段は神経細胞の発火活動を示す。水色の網掛けで青色光照射を行ったタイミングを示す。2秒おきに5msの光照射を行った。光照射を行ったタイミングで下向きの脳波の応答と、発火活動が記録された。図1Dに光照射に対して発火活動を上昇させた神経細胞と、発火活動の上昇を示さなかった神経細胞の代表例を示す。発火応答を示した神経細胞は、光照射の直後に発火頻度を上昇させている様子が見て取れる。本研究では光照射に対して、①2割以上の確率で発火活動を示し、②発火活動の誘導が統計的に有意に生じたと判断された神経細胞を、光応答を示した神経細胞と定義した。記録を行った後に、脳薄層切片を作製し、DAPI染色液を用いて細胞核を染色した。ChR2の発現と、電極跡・光ファイバー跡の確認を行った結果を図1Eに示す。電極と光ファイバーが海馬CA1野の錐体細胞層に位置し、同じ個所でChR2の発現が観察された。以上の結果から、光遺伝学的手法とマルチユニット記録手法を組み合わせることにより、時間解像度高く神経活動の操作・記録を行う実験系を確立した。

シータ位相歳差を誘導するニューロフィードバックの開発

次に、シータ位相歳差を誘導するタイミングで光照射を行うためのニューロフィードバックの開発を行った。ニューロフィードバックの大まかな構造を図2Aに、ニューロフィードバックのデータ処理の流れを補足図4に示す。シータ位相歳差はラットの位置とシータ波の位相の2つの変数に依存して生じる現象である。そこで、カメラを用いて

行動中のラットを撮影し、その映像からラットの位置を自動で推定するプログラムと、海馬脳波からシータ波の位相を自動で推定するプログラムをそれぞれ開発した。さらにこの2つのプログラムを組み合わせ、ラットの位置とシータ波の位相の組み合わせがシータ位相歳差を模倣するようなタイミングでのみ光照射を行うようなニューロフィードバックを開発した(シータ位相歳差光刺激プロトコル)。実際に、一本道の上をラットが走行する際(リニアトラック課題)に、開発したニューロフィードバックを適用した結果を図2B-Hに示す。図2Bは記録された海馬脳波、海馬シータ波、光照射タイミングの代表例である。光照射タイミングと、シータ波の位相に注目すると、徐々に早いシータ波の位相で光照射を行うことに成功したことがわかる。図2Cはリニアトラック課題中のラットの走行軌跡と、光照射タイミングを示す。本研究では、光照射をラットがリニアトラックの左端から80-160 cmの範囲(光刺激エリア)にいる際に限定して行った。図2Dは光照射を行ったタイミングにおける、シータ波の位相とラットの場所をプロットしたものである。シータ波2周期分について表示してある。特定のシータ波の位相とラットの場所の組み合わせでのみ光照射が行われており、シータ位相歳差を模倣するタイミングで光照射を行うことに成功した。シータ位相歳差の精度を定量的に評価するため、光照射が生じた際のシータ波の位相とラットの場所の組み合わせの存在割合の分布を擬似カラー表示した(図2E)。そして、図2Eの下に示すように存在割合分布を4つに区切り、各領域内の存在割合の分布比率からシータ位相歳差の精度を算出した(図

2E 下計算式)。この値は-1 から 1 の間で正規化された値であり、大きな値を示すほど、シータ位相歳差が精度高く生じていることを示す値である。この記録結果からは 0.39 という値が得られた。この値からも、シータ位相歳差を模倣するタイミングで光刺激を行うことに成功したことがわかる。さらに詳細に刺激結果を調べるため、いくつかのパラメータを定量化した。最初に刺激間隔の分布を定量化した(図 2F)。約 125 ms (= 8 Hz)にピークがあることから、およそシータ波 1 周期ごとに 1 度光照射を行ったことがわかる。図 2G にラットが 1 度リニアトラック上を端から端まで走り抜ける際(1 トライアル)に光照射を行った回数の分布を示す。1 トライアルにつきおよそ 5 - 10 回程度の光照射を行った。図 2H はトライアルごとのラットの光刺激エリアへの滞在時間の分布である。0.8 - 1 秒程度に集中している様子が見て取れる。シータ波が 8 Hz 程度とすると、0.8 - 1 秒の滞在時間中にシータ波がおよそ 6 - 8 周期程度生じていると考えられ、図 2G の結果と合わせてもおよそ 1 周期につき 1 度刺激を行ったことがわかる。

コントロールとして、シータ波に依存せず、ランダムなタイミングで光照射を行うフィードバックも同様に開発した(ランダム光刺激プロトコル)。リニアトラック課題中に適用した結果を図 2I-O に示す。図 2I が光照射の代表例である。図 2B と比較して、シータ波に依存しない、非周期的なタイミングで刺激を行った。図 2J はリニアトラック課題中のラットの走行軌跡と、光照射タイミングを示す。シータ位相歳差光刺激プロトコルと同様に、ラットが光刺激エリア内にいる際に限定して光照射を行った。図 2K, J

は光照射を行ったタイミングにおける、シータ波の位相とラットの場所をプロットしたものである。それぞれ図 2D, E と比較すると、シータ位相歳差を模倣しないランダムなタイミングで光刺激を行うことに成功したことがわかる。シータ位相歳差精度も -0.11 と負の値を示した。図 2M は光刺激間隔の分布を示す。図 2F と比べるとシータ波の周期に応じた 8 Hz 程度のピークが消失したことがわかる。図 2N は 1 トライアル当たりの光照射回数の分布を示す。図 2G と同様におよそ 5-10 回程度の刺激を行った。図 2O は光刺激エリアへのラットの滞在時間を示す。図 2H と同様におよそ 0.8 秒程度の滞在時間を示した。以上の結果から、光刺激回数は保ちつつ、シータ波の位相に依存せず刺激することに成功した。

図 2P-R において、全ての記録結果に関して、各フィードバックシステムを用いた際の刺激パラメータを比較した結果を示す。図 2P は図 2E と同様の手法を用いて、各トライアルにおける位相歳差精度を算出した結果を示す。シータ位相歳差光刺激プロトコルを用いた際には、ランダム光刺激プロトコルを用いた際に比べて位相歳差精度が有意に大きかった ($*p = 4.6 \times 10^{-24}$, $n = 208$ trials, 115 trials, Student's t -test)。同様に刺激間隔の分布も 2 群間で有意に異なっていた (図 2Q; $*p = 2.3 \times 10^{-44}$, $n = 917$ intervals, 468 intervals, Kolmogorov-Smirnov test)。一方で、図 2R に示すように、1 トライアル当たりの刺激回数には 2 群間で有意な差は認められなかった ($p = 0.050$, $n = 209$ trials, 115 trials, Mann-Whitney U test)。以上の結果から、シータ位相歳差を模倣するタイミング

で光刺激を行うことを可能にするニューロフィードバックシステムの開発と、刺激回数は保ったまま、光刺激タイミングをシータ波の位相に対してランダム化したコントロール用のニューロフィードバックシステムの開発に成功した。

シータ位相歳差を誘導した場所細胞は、安定した場所表象を示す。

シータ位相歳差の誘導が海馬神経活動に与える影響を解析するため、図 3A に示すような行動試験系を用いた。最初に、レストボックスにおいて睡眠・安静時の神経活動を課題前レストとして 1 時間記録した。次に、フィードバックシステムを用いて光刺激を行いつつリニアトラック課題を 15 分間行わせ、覚醒・行動時の神経活動を記録した。その後、再びラットをレストボックスに戻し、課題後レストとして睡眠・安静時の神経活動を 1 時間記録した。その後、光刺激を行わない条件で、アフターコントロールとして再度リニアトラック課題を 15 分間行わせ、覚醒・行動時の神経活動を記録した。まず、光照射によって誘導した場所細胞の活動が、アフターコントロールにおいても保存されているかについて検証を行った。図 3B にシータ位相歳差の誘導を行った際に記録された場所細胞の発火活動の代表例を示す。この神経細胞は、光刺激時とアフターコントロールの両方において、リニアトラック上の類似した場所で発火活動を示した。発火場所の類似度を定量的に評価するため、ラットがリニアトラック上の各場所にいた際に記録された平均発火頻度を算出した(図 3B 下)。光刺激時とアフターコントロールにお

いて記録された発火頻度の相関係数を計算することで、発火場所の類似度とした。同様にランダム光刺激プロトコルを適用した際に記録された場所細胞の発火活動の代表例を図 3C に示した。図 3B の神経細胞と比較して、シータ位相歳差精度が低く、場所細胞の安定性も低いことがわかる。記録した全細胞について、同様に光刺激を行った課題中のシータ位相歳差精度を定量した結果を図 3D に示す。シータ位相歳差の誘導を行った群は、有意に 0 より大きなシータ位相歳差精度の値を示した(シータ位相歳差光刺激: $*p = 0.040$; ランダム光刺激: $p = 0.21$; 光刺激無し: $p = 0.068$; $n = 13, 16, 87$ place fields, One-sample t-test vs. 0.)。この結果から、シータ位相歳差光刺激によって、シータ位相歳差の誘導に成功したことがわかる。各課題間における場所細胞の発火の類似度を比較した結果を図 3E に示す。シータ位相歳差を誘導した群が他の群と比べて有意に高い発火場所の類似度を示した(シータ位相歳差光刺激 vs. ランダム光刺激: $*p = 0.0029$; シータ位相歳差光刺激 vs. 光刺激無し: $*p = 0.016$; ランダム光刺激 vs. 光刺激無し: $p = 0.45$; $n = 13, 16, 87$ place fields, Steel-Dwass test)。以上の結果より、シータ位相歳差の誘導が、海馬場所細胞の発火活動の安定性に寄与することが示唆された。

シータ位相歳差の誘導が、その後の睡眠時の再活性化を上昇させる。

上項において、シータ位相歳差の誘導によって、場所細胞の発火活動の安定性が上昇することを示した。この場所細胞の発火活動の安定性が変化する間に、1 時間の睡眠(課

課題後レスト)を行わせている。では、シータ位相歳差の誘導はこのレスト中の神経活動にどのような影響を与えるだろうか。ここでは、光刺激を行う前後のレスト(課題前レスト、課題後レスト)における神経活動を比較することによって、その影響を解析した(図 4A)。睡眠時の神経活動の内、高周波数の脳波(リップル)を伴う発火活動である、再活性化に注目した(図 4B)。過去の知見から、シータ位相歳差の阻害が、その後の睡眠時における再活性化を低下させることが示されている(Drieu et al., 2018)。では、シータ位相歳差の誘導は、その後の睡眠時における再活性化を上昇させるだろうか。これを検証するために、光刺激を行う前後のレストにおけるリップル中の発火頻度に着目した。シータ位相歳差光刺激を行った代表神経細胞について、課題前レスト、課題後レストにおいて記録されたリップル中の発火頻度を図 4C に示す。課題後のレストにおいて、リップル中の発火頻度、つまり再活性化が上昇していた。記録した全細胞について、同様にリップル中の発火頻度を定量化した結果を図 4D に示す。シータ位相歳差光刺激を行った群では、課題後のレストにおいて、リップル中の発火頻度が有意に上昇していた(図 4D 左; $*p = 0.033$, $n = 13$ cells, Wilcoxon signed-rank test)。一方で、ランダム光刺激を行った群や光刺激無し群においては、課題後レストにおける発火頻度の有意な上昇は認められなかった(図 4D 中央、右; ランダム光刺激: $p = 0.82$, $n = 16$ cells, Wilcoxon signed-rank test; 光刺激無し: $p = 0.91$, $n = 62$ cells, Wilcoxon signed-rank test)。以上の結果から、シータ位相歳差の誘導が、直後の睡眠時における再活性化に寄与することが

示唆された。

4. 考察

本研究では、シータ位相歳差の誘導が海馬神経活動に与える影響を解析するため、シータ位相歳差を模倣するタイミングで光刺激を行うニューロフィードバックを新たに開発した。このニューロフィードバックを用いることで、シータ位相歳差の誘導が、

1. 場所細胞の発火場所の安定性を上昇させること
2. 直後の睡眠時における再活性化を上昇させること

の2点を示した。

ニューロフィードバックを用いたシータ位相歳差への介入

本研究では、図 2 で示したように、新規に開発したニューロフィードバックを用いて、シータ位相歳差の誘導を行った。

これまでシータ位相歳差の役割の解明を目指して様々な研究が行われてきた。代表的なものとして、動物を乗り物に乗せて強制的に走行させることによってシータ位相歳差を阻害すると、直後の再活性化が低下することを示した知見(Drieu et al., 2018)や、薬理的に海馬の上流脳領域の神経活動を抑制することでシータ位相歳差を阻害すると、場所細胞の場所選択的な発火活動の低下や、空間記憶の低下が生じることを示した知見(Robinson et al., 2017; Schlesiger et al., 2015; Shirvalkar et al., 2010; Wang et al., 2015)などが挙げられる。しかし、上記のような過去のシータ位相歳差の阻害実験は、シータ

位相歳差の阻害を行うために、シータ波の強度を低下させており、シータ位相歳差のみに介入を行えていないという問題点がある。このような手法が採用されてきた理由として、シータ位相歳差というわずか数百ミリ秒程度の神経活動に介入することを可能とする、時間解像度の高い介入手法が存在していなかった点が挙げられる。本研究では、リアルタイムに、シータ波の位相とラットの位置を推定するニューロフィードバックを開発することにより、その問題の解決を図った。実際に、図2に示すように、ラットの行動時にリアルタイムかつ高精度にシータ位相歳差を誘導することに成功した。また、シータ位相に依存しない、ランダムなタイミングで光刺激を行うニューロフィードバックについても開発を行った。図2P-Rに示すように、刺激回数はシータ位相歳差光刺激プロトコルと揃えつつ、シータ位相歳差精度、刺激間隔についてはランダムレベルとなるように設定した。今後、このニューロフィードバックを用いることで、シータ位相歳差のみに介入を行うことにより、シータ位相歳差の持つ役割の解明が進むと考えられる。さらに、海馬においてはシータ波だけでなく、ガンマ波(25-55 Hz)についても同様に位相歳差が生じることが報告されている(Zheng et al., 2016)。本ニューロフィードバック手法は様々な周波数帯域の脳波に対して応用可能となるように開発しており、今後シータ位相歳差以外の神経活動への応用も期待される。

シータ位相歳差とシナプス結合強度の上昇

図 3,4 で示したように、行動課題中にシータ位相歳差を誘導した神経細胞は、アフターコントロールにおいて類似した場所で発火活動を示し、直後の睡眠時においてリップル中の発火頻度を上昇させた。

本研究では、海馬 CA1 野と呼ばれる脳領域から神経活動記録を行った。海馬 CA1 野の主な上流脳領域として、海馬 CA3 野や内側嗅内皮質などが挙げられる (Andersen et al., 1969) (補足図 5)。各脳領域には場所依存的な発火活動を示す神経細胞が存在することが知られており、海馬 CA3 野には場所細胞が、内側嗅内皮質には格子細胞(場所受容野が格子状に存在する神経細胞)が存在する (Hafting et al., 2005; Fyhn et al., 2004; Fyhn et al., 2008)。海馬 CA1 野に存在する場所細胞は、これら上流脳領域からの入力を受け取ることによって、場所特異的な発火活動を示すと考えられている (Sanders et al., 2015; Fernández-Ruiz et al., 2017; Drieu and Zugaro, 2019)。これは、各脳領域の破壊実験や (Brun et al., 2008; Van Cauter et al., 2008; Hales et al., 2014)、モデルを用いた計算結果 (Wang et al., 2015; Park et al., 2019) からも検証されている。

本研究で用いた 5-10 Hz 程度の刺激は、シナプス結合強度を上昇させ、上流脳領域からの入力を自身の神経活動へ反映させやすくすることが示されている (Larson and Lynch, 1986; Capocchi et al., 1992)。本研究では、シータ位相歳差を模倣したおよそ 8 Hz 程度の光刺激によって、このシナプス結合強度の上昇を *in vivo* で誘導することに成

功したと考えられる。シータ位相歳差を模倣するタイミングで発火を誘導し、シナプス結合強度が上昇するかを調べた知見はこれまで報告されていない。しかし、場所細胞の発火タイミングを模倣して刺激を行った知見が *in vitro* の実験系で存在する (Isaac et al., 2009)。この知見では、*in vivo* において記録した場所細胞の発火タイミングを基にして、脳切片上の神経細胞を発火させるとシナプス結合強度の上昇が生じることを示している。つまり、*in vivo* において場所細胞が示すシータ位相歳差に基づくおよそ 5-10 Hz 程度の発火活動は、シナプス結合強度の上昇の誘導に十分であることが示されている。この知見からも、本研究で用いたシータ位相歳差を模倣した刺激が、*in vivo* においてシナプス結合強度の上昇を誘導した可能性は高いと考えられる。シナプス結合強度の上昇によって、上流脳領域からの入力を反映しやすくなった結果、①CA3 野や嗅内皮質からの場所依存的な入力を反映しやすくなり、課題間で同じ場所で発火する細胞が増加した、②興奮性が上昇することにより、リップル中の発火頻度が上昇したと考えられる。

コリン性入力とシナプス結合強度の上昇の関連

上記の場所細胞の発火タイミングを模倣して刺激を行った知見 (Isaac et al., 2009) では、シナプス結合強度の上昇を引き起こすために、コリン濃度の上昇が必要であることが報告されている。生体の海馬におけるコリン性の入力、内側中隔核からの投射が知られている (Shute and Lewis, 1963; Lewis et al., 1967)。また、内側中隔核からの入力は

海馬におけるシータ波の形成に必要であることや(Brandon et al., 2014; Aoki et al., 2019)、内側中隔核の発火頻度の操作によって海馬シータ波の周期を操作可能であること(Bender et al., 2015)などが示されている。さらに、内側中隔核の神経細胞の発火頻度が動物の走行速度と相関を持つこと(King et al., 1998)などが明らかにされており、走行時における、内側中隔核から海馬へのコリン性の投射が、海馬の可塑性を上昇させると考えられる。さらに、アセチルコリンは、ドパミンとの組み合わせによって、海馬の可塑性を上昇させることが報告されている(Brzosko et al., 2017)。走行時に海馬へのコリン性の入力が増大し、直後に報酬を得ることによって海馬にドパミン性の入力が行われることで、海馬の可塑性が上昇していると考えられる。これにより、報酬が得られるような重要な経験をコードする神経活動が神経回路により強固に保存されるようになっている可能性が挙げられる。

空間記憶の獲得・固定化との関連

図4の結果から、シータ位相歳差の誘導によって直後の睡眠時の再活性化が上昇することを示した。睡眠時の再活性化は記憶の固定化に重要な役割を果たすことが過去の阻害実験や誘導実験から明らかにされている(Girardeau et al., 2009; Jadhav et al., 2012; Fernández-Ruiz et al., 2019)。本研究では再活性化が上昇したことから、直前の行動課題に関する空間記憶の固定化が促進された可能性が挙げられるが、用いた行動試験系が

単純であり、空間記憶を必要としないため、ラットの行動から空間記憶を定量することはできていない。しかし、近年、空間記憶を保っている個体では、場所細胞の発火活動の安定性が上昇していることが報告された(Gridchyn et al., 2020)。シータ位相歳差の誘導を行った個体において、場所細胞の発火活動の安定性が上昇していた(図 3)ことから、シータ位相歳差の誘導によって生じた再活性化の上昇が空間記憶の固定化を促進した可能性は高いと考えられる。これを検証するためには、i) 空間記憶を必要とする行動課題へニューロフィードバックを適用できるように行動課題、ニューロフィードバックの改変を行うこと、ii) シータ位相歳差誘導後の睡眠時に再活性化を阻害するためのフィードバック(Girardeau et al., 2009; Igata et al., 2020)を適用することの 2 点によって検証が可能となる。得られる結果として、①シータ位相歳差の誘導によって空間記憶の固定化が誘導され、行動試験の成績が改善する、②再活性化の阻害を行うと空間記憶の固定化が阻害され、行動試験の成績が低下すると仮説を立てている。これが検証されれば、脳内の記憶の神経基盤の解明がさらに一步進むと考えている。

総括

本研究では、海馬場所細胞が示す、シータ位相歳差の持つ役割を示すことを目的として、新たにシータ位相歳差を誘導するニューロフィードバックを開発した。このニューロフィードバック技術と、神経活動操作・記録手法を組み合わせ、海馬神経細胞にシータ位相歳差を誘導することに成功した。さらに、シータ位相歳差を誘導した神経細胞の発火活動を記録・解析することによって、以下の2点、

1. シータ位相歳差の誘導により、場所細胞の発火活動の安定性が上昇する
2. シータ位相歳差の誘導により、直後の睡眠時における再活性化が上昇する

を初めて示した。本研究は、シータ位相歳差が海馬神経活動に与える影響を示した初めての知見である。脳波の周期に依存した周期的な発火活動は、ラット海馬に限らず、複数の脳領域、複数の動物種で見られる現象であり、本研究で開発したニューロフィードバックが脳内の情報処理機構の基盤を解明する一端を担うことが期待される。

5. 図

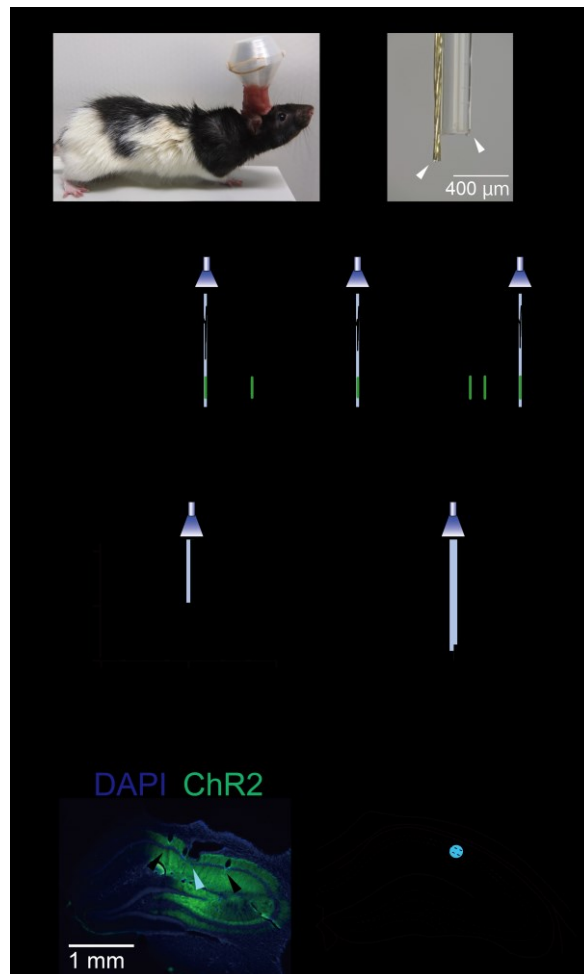


図 1. 光遺伝学的手法とマルチユニット記録手法による神経活動操作・記録系

A) 自由行動下のラット海馬に記録電極と光ファイバーのセットを埋め、神経活動の操作・記録を行った。

B) 記録電極(左側矢尻)と光ファイバー(右側矢尻)の先端の拡大写真。光ファイバーの先端からおよそ 100-200 μ m 下に記録電極の先端がくるよう、両者を接着した。

C) 記録結果の代表例。記録された脳波と、代表神経細胞の発火タイミングを示した。

水色の網掛けが光照射タイミングを示す。5 ミリ秒間の光照射を行った。

D) 光照射前後における平均発火頻度を定量化した。光照射に対して発火頻度を増加させた神経細胞(左図)と、発火頻度に変化が見られなかった神経細胞(右図)の代表例を示した。

E) 左) 神経活動記録を行った個体の、海馬冠状脳切片画像。緑色蛍光は ChR2 の発現を、青色蛍光は DAPI による染色を示す。電極先端を黒色の矢尻で、光ファイバー先端を水色の矢尻で示した。

右) 記録電極跡を黒色丸、光ファイバー跡を水色丸で示した。

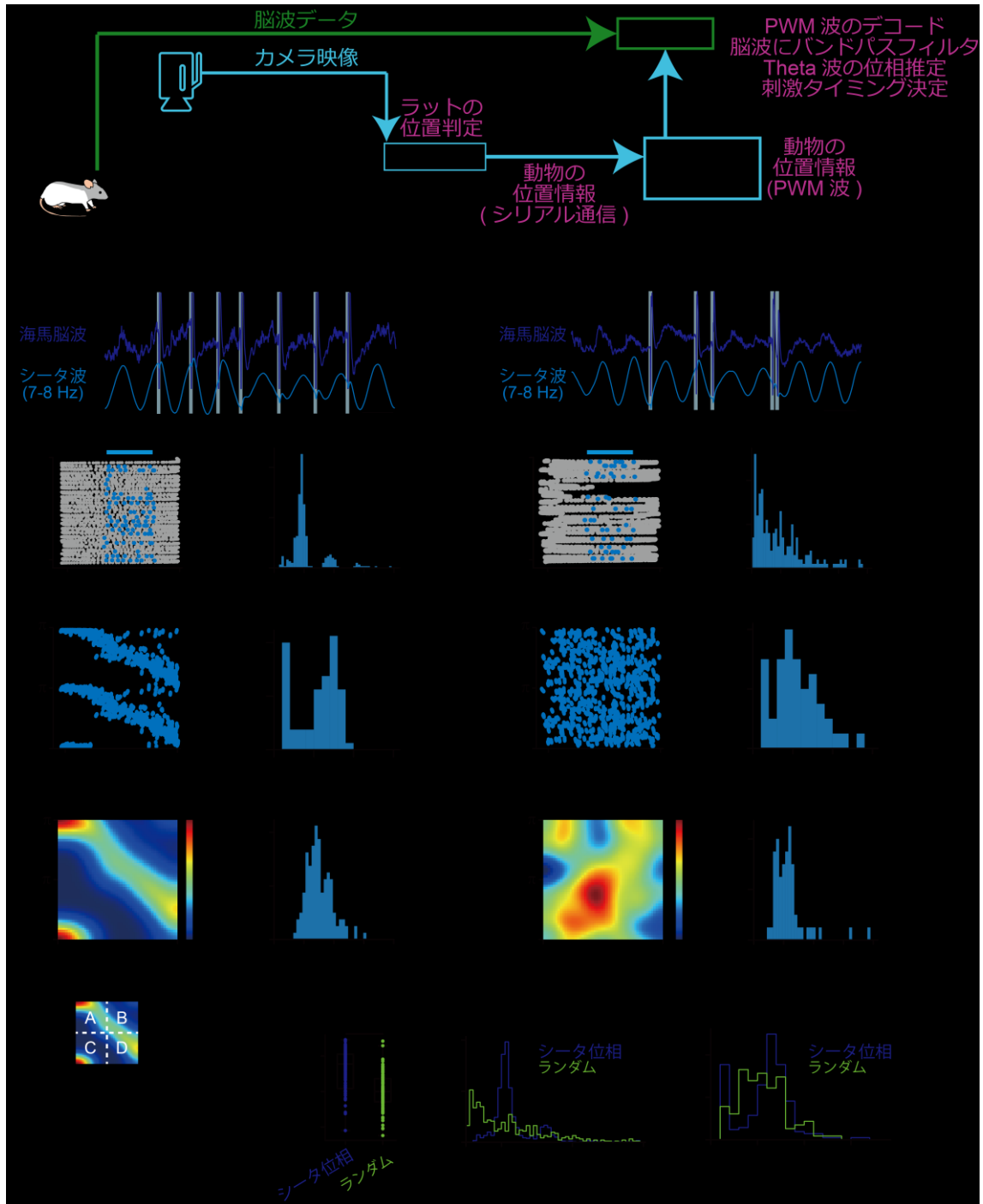


図2. ニューロフィードバックを用いた光刺激

A) ニューロフィードバックの構成。補足図4も参照。リニアトラック課題中のラットのカメラ映像と、脳波をそれぞれ個別に処理し、2変数が特定の条件を満たすタイ

ミングでのみ、光刺激を行った。

- B) シータ位相歳差光刺激プロトコルを用いた際に記録された脳波の代表例を示す。青色は海馬 CA1 野から記録された脳波を、水色は脳波の内、シータ波成分を示す。水色の網掛けで光刺激タイミングを示す。光刺激タイミングとシータ波の位相に注目すると、徐々に早い位相で刺激を行った。
- C) 行動課題中のラットの走行軌跡(灰色)と、光刺激タイミング(水色)。
- D) 光刺激を行ったタイミングにおける、ラットの位置とシータ波の位相の組み合わせを示す。シータ位相歳差を模倣するタイミングで光刺激を行った。シータ波 2 周期分について表示している点に注意。
- E) 光刺激を行ったタイミングにおける、ラットの位置とシータ波の位相の組み合わせの分布を擬似カラー表示した。下段に示すように各領域における分布割合を計算し、シータ位相歳差精度を定量化した。
- F) 光刺激の時間間隔の分布をヒストグラム表示。
- G) 1 トライアル当たりの光刺激回数の分布をヒストグラム表示。
- H) 1 トライアル当たりのラットの光刺激エリアへの滞在時間の分布をヒストグラム表示。
- I) ランダム光刺激プロトコルを用いた際に記録された脳波の代表例。シータ位相に依存しない、非周期的なタイミングで光刺激を行った。

- J) 図 C と同様に、行動課題中のラットの走行軌跡(灰色)と、光刺激タイミング(水色)を示す。
- K) 図 D と同様に、光刺激を行ったタイミングにおける、ラットの位置とシータ波の位相の組み合わせを示す。シータ位相歳差光刺激プロトコル使用時とは異なり、ランダムなタイミングで光刺激を行った。
- L) 図 E と同様に、ラットの位置とシータ波の位相の組み合わせの分布を擬似カラーで表示した。
- M) 図 F と同様に、光刺激の時間間隔の分布をヒストグラム表示。
- N) 図 G と同様に、1 トライアル当たりの光刺激回数の分布をヒストグラム表示。
- O) 図 H と同様に、1 トライアル当たりのラットの光刺激エリアへの滞在時間の分布を示す。
- P) 各刺激プロトコルを用いた際に得られた、トライアルごとのシータ位相歳差精度を定量化。シータ位相歳差光刺激プロトコルを用いた際に有意に高いシータ位相歳差精度を示した。* $p < 0.001$, $n = 208$ trials, 115 trials, Student's t -test.
- Q) 各刺激プロトコルを用いた際に得られた、刺激間隔の分布を比較した。2 群は有意に異なる分布を示した。* $p < 0.001$, $n = 917$ intervals, 468 intervals, Kolmogorov-Smirnov test.

R) 各刺激プロトコルを用いた際に得られた、1 トライアル当たりの刺激回数の分布を比較した。2 群間で分布に有意な差は認められなかった。 $p > 0.05$, $n = 209$ trials, 115 trials, Mann–Whitney U test.

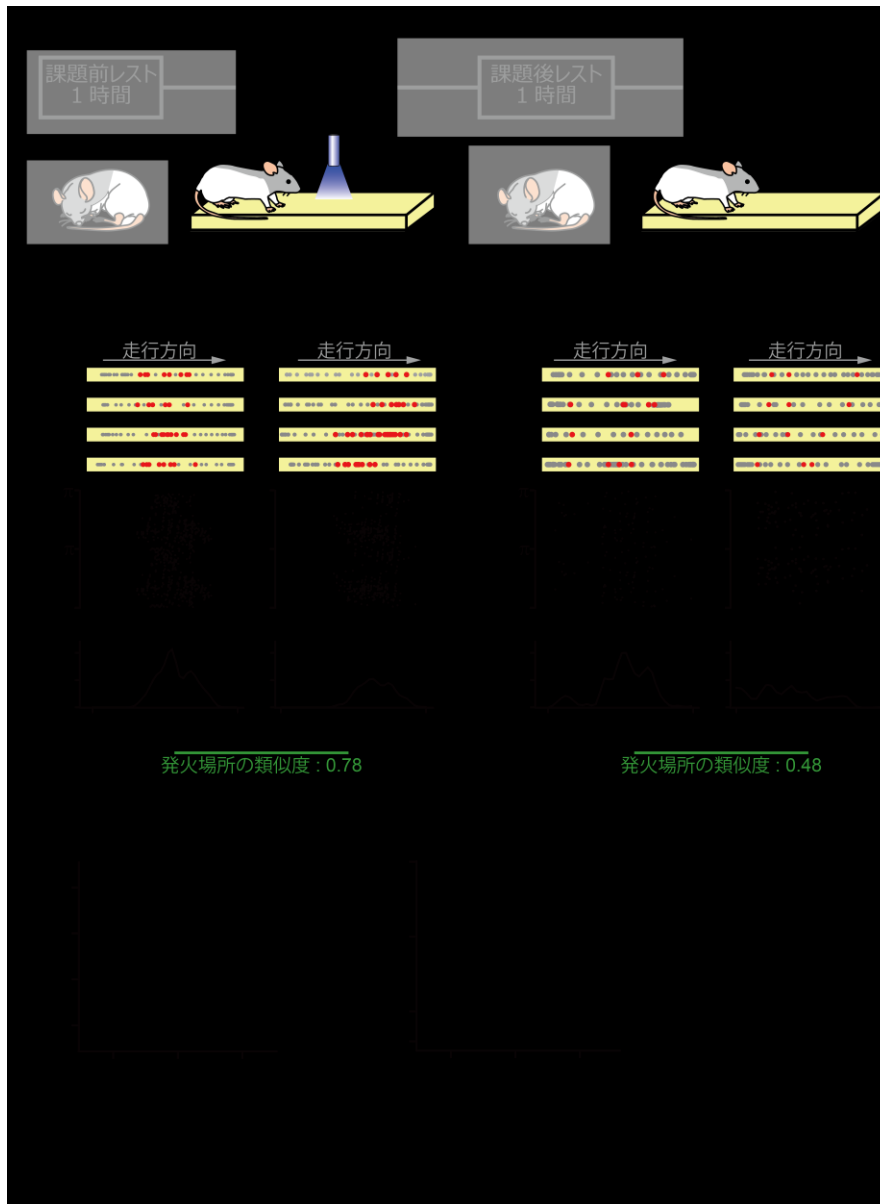


図 3. シータ位相歳差の誘導による、発火場所の類似度の上昇

A) 実験パラダイム。行動課題前に睡眠・安静時の神経活動を 1 時間記録した(課題前レスト)。ニューロフィードバックを用いて光刺激を行いながらリニアトラック課題を 15 分間行わせた。その後再び、睡眠・安静時の神経活動を 1 時間記録した(課題後レスト)。最後に、光刺激を行わない条件で、再度リニアトラック課題を 15 分

間行わせた。図 3 においては、初回の行動課題と、アフターコントロールにおいて記録された神経活動に注目した。

- B) シータ位相歳差光刺激を行った際に、各行動課題中において記録された 1 個の場所細胞の発火活動の代表例を示す。上段は代表 4 トライアル分について、ラットの走行軌跡(灰色)と、神経細胞の発火活動(赤色)を示す。中段は 15 分間で記録された発火活動の場所とシータ波の位相の組み合わせを示す。シータ波 2 周期分について表示した。下段はトラック上の各場所において記録された発火頻度を示した。各場所における発火頻度について、課題間での相関係数を計算し、得られた値を場所細胞の発火場所の類似度とした。
- C) ランダム光刺激プロトコルを適用した海馬場所細胞について、図 B と同様に示した。
- D) 記録した神経細胞について、光刺激課題中に記録されたシータ位相歳差精度を定量化した。シータ位相歳差の誘導を行った群は、有意に 0 より大きなシータ位相歳差精度の値を示した。* $p < 0.05$, $n = 13, 16, 87$ place fields, One-sample t-test vs. 0.
- E) 記録した神経細胞について、課題間における場所細胞の発火場所の類似度を比較した。シータ位相歳差光刺激を行った群が有意に高い発火場所の類似度を示した。* $p < 0.05$, $n = 13, 16, 87$ place fields, Steel-Dwass test.

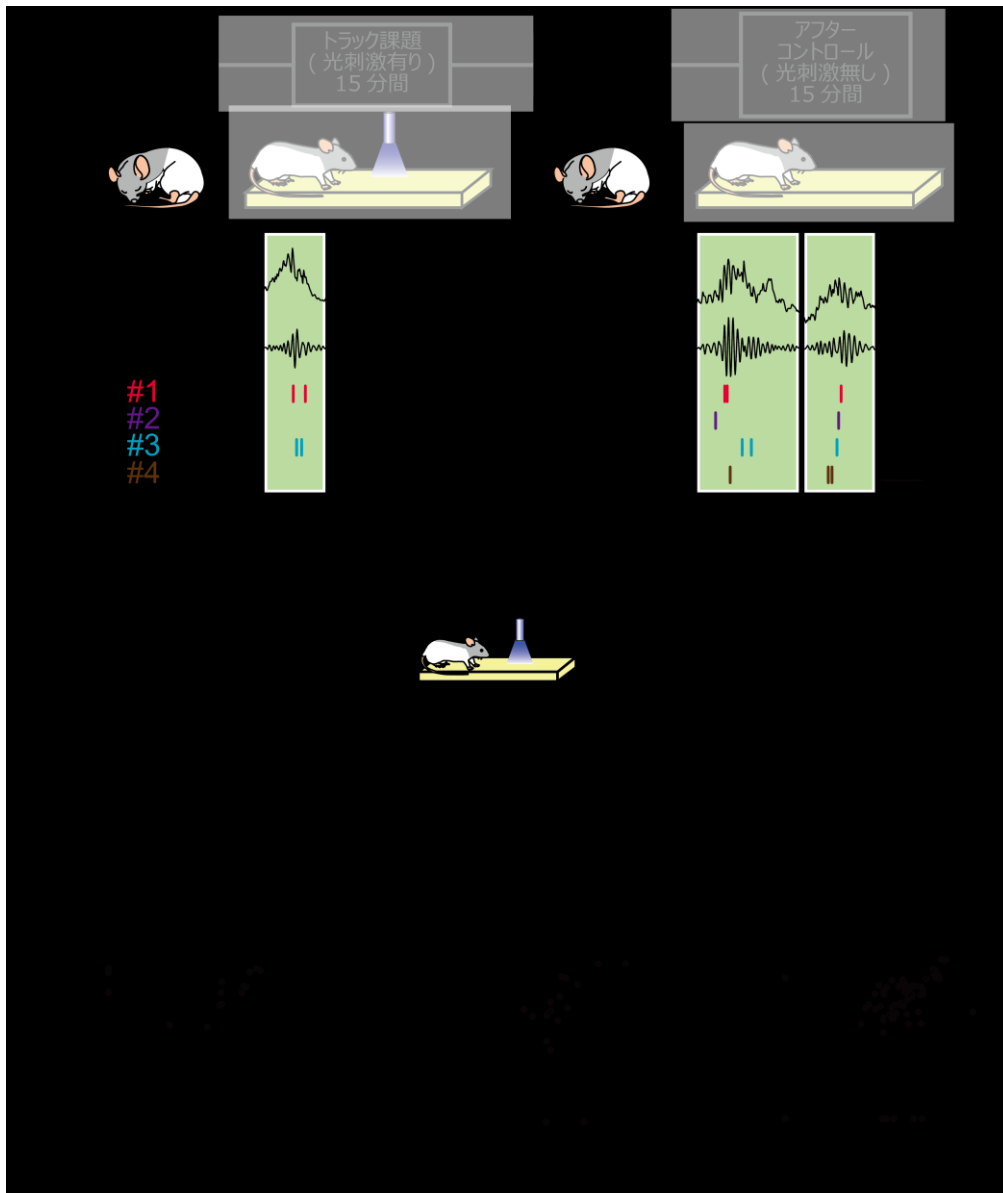


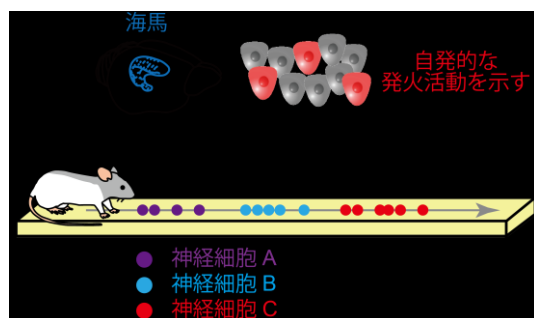
図 4. シータ位相歳差の誘導による、直後の睡眠時におけるリップル中の発火頻度の上昇

- A) 図 3 と同様の行動パラダイムを用いた。図 4 では課題前レスト、課題後レストにおいて記録された神経活動に注目した。
- B) レスト中に記録された神経活動の代表例を示す。上段から、海馬で記録された脳波、脳波のリップル帯域(150-250 Hz)成分、4 つの代表神経細胞の発火タイミングを示

す。緑色の網掛けでリップルの発生タイミングを示す。

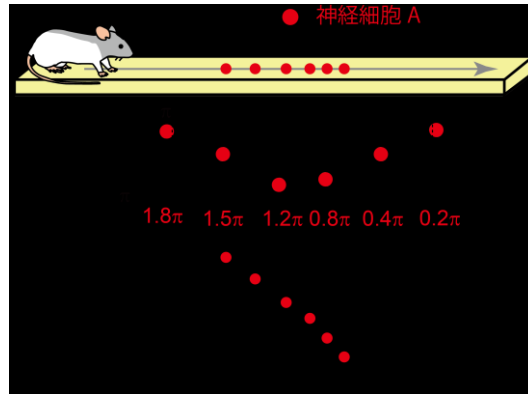
- C) 1個の代表神経細胞について、課題前レスト、課題後レストにおいて記録されたリップル中の発火頻度を示した。リップルの発生タイミングを0として、その前後における発火タイミングを、記録した全リップルに対して算出した。課題後レストにおいてリップル中の発火頻度が上昇している様子が見られた。
- D) 記録した神経細胞について、課題前レスト、課題後レストでのリップル中の発火頻度を比較した。シータ位相歳差光刺激群でのみ、課題後レストにおいて有意なリップル中の発火頻度の上昇が生じた。* $p < 0.05$, $n = 13, 16, 62$ cells, Wilcoxon signed-rank test.

6. 補足図



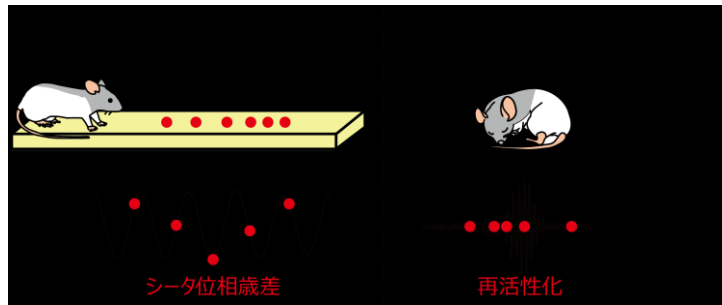
補足図 1. 場所細胞の発火活動

海馬神経細胞は常に自発的に発火活動を示す(上段)。一部の海馬神経細胞の発火活動は、動物の現在地の情報に依存して生じる(下段)。そのような発火活動を示す神経細胞は「場所細胞」と呼ばれる。



補足図 2. 場所細胞のシータ位相歳差

動物の行動時、海馬ではシータ波(およそ 8 Hz)が生じる。場所細胞の発火場所とシータ波の位相を比較すると、ラットの位置が進むにつれて、徐々に早いシータ波の位相で発火活動を示すようになる(中段)。横軸をラットのトラック上での位置、縦軸をシータ波の位相として発火タイミングをプロットすると、下段のように左上から右下へ向かって直線上にプロットされる。このように、ラットの位置が進むにつれて、場所細胞の発火活動が徐々に早いシータ位相で生じる現象は「シータ位相歳差」と呼ばれている。

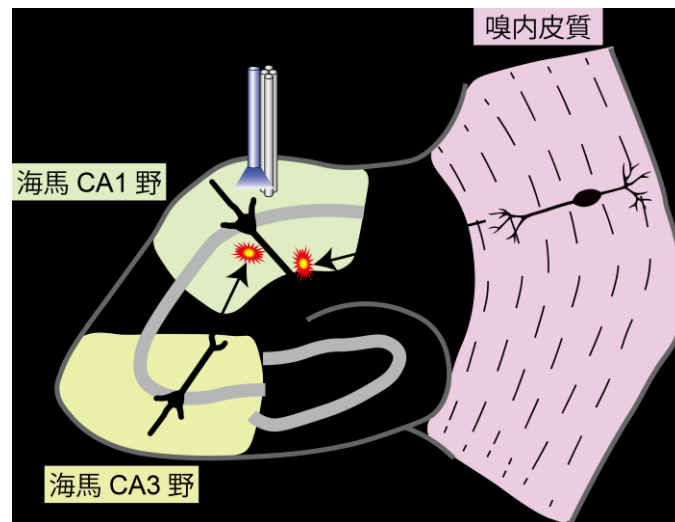


補足図 3. 行動時と睡眠時の海馬神経活動

物の行動時(左図)、海馬ではシータ波(およそ 8 Hz)が生じる。また、一部の神経細胞は場所細胞として活動し、その発火活動はシータ位相歳差を示す。一方で、動物の睡眠・安静時(右図)においては、シータ波が生じず、代わりにリップルと呼ばれる高周波の脳波が生じる。また、リップルに伴って場所細胞が再び発火活動を示す、再活性化と呼ばれる現象が生じる。

補足図 4. ニューロフィードバックのフローチャート

ニューロフィードバックで行う処理のフローチャート図を示す。



補足図 5. 海馬 CA1 野とその上流脳領域

今回神経活動の記録を行った海馬 CA1 野は、海馬 CA3 野や嗅内皮質と呼ばれる脳領域から投射を受けている。海馬 CA1 野だけでなく、海馬 CA3 野や嗅内皮質にも場所依存的な発火活動を示す神経細胞が存在する。シータ波に応じたおよそ 8 Hz 程度の周期的な刺激によって、海馬 CA1 野の神経細胞の可塑性が上昇し、上流からの入力を自身の神経活動へ反映させやすくなった可能性が考えられる。

7. 参考文献

- Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand*. 1969 May-Jun;76(1):4A-5A.
- Aoki Y, Igata H, Ikegaya Y, Sasaki T. The Integration of Goal-Directed Signals onto Spatial Maps of Hippocampal Place Cells. *Cell Rep*. 2019 Apr 30;27(5):1516-1527.e5.
- Bender F, Gorbati M, Cadavieco MC, Denisova N, Gao X, Holman C, Korotkova T, Ponomarenko A. Theta oscillations regulate the speed of locomotion via a hippocampus to lateral septum pathway. *Nat Commun*. 2015 Oct 12;6:8521.
- Bittner KC, Milstein AD, Grienberger C, Romani S, Magee JC. Behavioral time scale synaptic plasticity underlies CA1 place fields. *Science*. 2017 Sep 8;357(6355):1033-1036.
- Brandon MP, Koenig J, Leutgeb JK, Leutgeb S. New and distinct hippocampal place codes are generated in a new environment during septal inactivation. *Neuron*. 2014 May 21;82(4):789-96.
- Brun VH, Leutgeb S, Wu HQ, Schwarcz R, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex. *Neuron*. 2008 Jan 24;57(2):290-302.

- Brzosko Z, Zannone S, Schultz W, Clopath C, Paulsen O. Sequential neuromodulation of Hebbian plasticity offers mechanism for effective reward-based navigation. *Elife*. 2017 Jul 10;6:e27756.
- Capocchi G, Zampolini M, Larson J. Theta burst stimulation is optimal for induction of LTP at both apical and basal dendritic synapses on hippocampal CA1 neurons. *Brain Res*. 1992 Sep 25;591(2):332-6.
- Ciocchi S, Passecker J, Malagon-Vina H, Mikus N, Klausberger T. Brain computation. Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons. *Science*. 2015 May 1;348(6234):560-3.
- Colgin LL. Mechanisms and functions of theta rhythms. *Annu Rev Neurosci*. 2013 Jul 8;36:295-312.
- Drieu C, Todorova R, Zugaro M. Nested sequences of hippocampal assemblies during behavior support subsequent sleep replay. *Science*. 2018 Nov 9;362(6415):675-679.
- Drieu C, Zugaro M. Hippocampal Sequences During Exploration: Mechanisms and Functions. *Front Cell Neurosci*. 2019 Jun 13;13:232.
- Ekstrom AD, Kahana MJ, Caplan JB, Fields TA, Isham EA, Newman EL, Fried I. Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature*. 2003 Sep

11;425(6954):184-8.

Eliav T, Geva-Sagiv M, Yartsev MM, Finkelstein A, Rubin A, Las L, Ulanovsky N.

Nonoscillatory Phase Coding and Synchronization in the Bat Hippocampal

Formation. *Cell*. 2018 Nov 1;175(4):1119-1130.e15.

Fernández-Ruiz A, Oliva A, Nagy GA, Maurer AP, Berényi A, Buzsáki G. Entorhinal-

CA3 Dual-Input Control of Spike Timing in the Hippocampus by Theta-Gamma

Coupling. *Neuron*. 2017 Mar 8;93(5):1213-1226.e5.

Fernández-Ruiz A, Oliva A, Fermino de Oliveira E, Rocha-Almeida F, Tingley D,

Buzsáki G. Long-duration hippocampal sharp wave ripples improve memory.

Science. 2019 Jun 14;364(6445):1082-1086.

Frank LM, Eden UT, Solo V, Wilson MA, Brown EN. Contrasting patterns of receptive

field plasticity in the hippocampus and the entorhinal cortex: an adaptive filtering

approach. *J Neurosci*. 2002 May 1;22(9):3817-30.

Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Spatial representation in the

entorhinal cortex. *Science*. 2004 Aug 27;305(5688):1258-64.

Fyhn M, Hafting T, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Grid cells in mice. *Hippocampus*.

2008;18(12):1230-8.

Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. Selective suppression

- of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci.* 2009 Oct;12(10):1222-3.
- Gridchyn I, Schoenenberger P, O'Neill J, Csicsvari J. Assembly-Specific Disruption of Hippocampal Replay Leads to Selective Memory Deficit. *Neuron.* 2020 Apr 22;106(2):291-300.e6.
- Grosmark AD, Buzsáki G. Diversity in neural firing dynamics supports both rigid and learned hippocampal sequences. *Science.* 2016 Mar 25;351(6280):1440-3.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature.* 2005 Aug 11;436(7052):801-6.
- Hales JB, Schlesiger MI, Leutgeb JK, Squire LR, Leutgeb S, Clark RE. Medial entorhinal cortex lesions only partially disrupt hippocampal place cells and hippocampus-dependent place memory. *Cell Rep.* 2014 Nov 6;9(3):893-901.
- Harris KD, Henze DA, Hirase H, Leinekugel X, Dragoi G, Czurkó A, Buzsáki G. Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 2002 Jun 13;417(6890):738-41.
- Hori E, Nishio Y, Kazui K, Umeno K, Tabuchi E, Sasaki K, Endo S, Ono T, Nishijo H. Place-related neural responses in the monkey hippocampal formation in a virtual space. *Hippocampus.* 2005;15(8):991-6.

- Igata H, Ikegaya Y, Sasaki T, Prioritized experience replays on a hippocampal predictive map for learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021, 118 (1) e2011266118.
- Isaac JT, Buchanan KA, Muller RU, Mellor JR. Hippocampal place cell firing patterns can induce long-term synaptic plasticity in vitro. *J Neurosci*. 2009 May 27;29(21):6840-50.
- Jadhav SP, Kemere C, German PW, Frank LM. Awake hippocampal sharp-wave ripples support spatial memory. *Science*. 2012 Jun 15;336(6087):1454-8.
- Jones MW, Wilson MA. Phase precession of medial prefrontal cortical activity relative to the hippocampal theta rhythm. *Hippocampus*. 2005;15(7):867-73.
- Kentros C, Hargreaves E, Hawkins RD, Kandel ER, Shapiro M, Muller RV. Abolition of long-term stability of new hippocampal place cell maps by NMDA receptor blockade. *Science*. 1998 Jun 26;280(5372):2121-6.
- King C, Recce M, O'Keefe J. The rhythmicity of cells of the medial septum/diagonal band of Broca in the awake freely moving rat: relationships with behaviour and hippocampal theta. *Eur J Neurosci*. 1998 Feb;10(2):464-77.
- Knierim JJ, Zhang K. Attractor dynamics of spatially correlated neural activity in the limbic system. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:267-85.
- Larson J, Lynch G. Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned

- stimulation involves two events. *Science*. 1986 May 23;232(4753):985-8.
- Larson J, Munkácsy E. Theta-burst LTP. *Brain Res*. 2015 Sep 24;1621:38-50.
- Lewis PR, Shute CC, Silver A. Confirmation from choline acetylase analyses of a massive cholinergic innervation to the rat hippocampus. *J Physiol*. 1967 Jul;191(1):215-24.
- Malhotra S, Cross RW, van der Meer MA. Theta phase precession beyond the hippocampus. *Rev Neurosci*. 2012;23(1):39-65.
- Mehta MR, Lee AK, Wilson MA. Role of experience and oscillations in transforming a rate code into a temporal code. *Nature*. 2002 Jun 13;417(6890):741-6.
- Muller RU, Kubie JL, Ranck JB Jr. Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J Neurosci*. 1987 Jul;7(7):1935-50.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 1971 Nov;34(1):171-5.
- O'Keefe J, Recce ML. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*. 1993 Jul;3(3):317-30.
- Park SW, Jang HJ, Kim M, Kwag J. Spatiotemporally random and diverse grid cell spike patterns contribute to the transformation of grid cell to place cell in a neural network model. *PLoS One*. 2019 Nov 14;14(11):e0225100.

- Qasim ES, Fried I, Jacobs J. Phase precession in the human hippocampus and entorhinal cortex. *bioRxiv* 2020.09.06.285320.
- Robinson NTM, Priestley JB, Rueckemann JW, Garcia AD, Smeglin VA, Marino FA, Eichenbaum H. Medial Entorhinal Cortex Selectively Supports Temporal Coding by Hippocampal Neurons. *Neuron*. 2017 May 3;94(3):677-688.e6.
- Sanders H, Rennó-Costa C, Idiart M, Lisman J. Grid Cells and Place Cells: An Integrated View of their Navigational and Memory Function. *Trends Neurosci*. 2015 Dec;38(12):763-775.
- Schlesiger MI, Cannova CC, Boubilil BL, Hales JB, Mankin EA, Brandon MP, Leutgeb JK, Leibold C, Leutgeb S. The medial entorhinal cortex is necessary for temporal organization of hippocampal neuronal activity. *Nat Neurosci*. 2015 Aug;18(8):1123-32.
- Schoenenberger P, O'Neill J, Csicsvari J. Activity-dependent plasticity of hippocampal place maps. *Nat Commun*. 2016 Jun 10;7:11824.
- Shirvalkar PR, Rapp PR, Shapiro ML. Bidirectional changes to hippocampal theta-gamma comodulation predict memory for recent spatial episodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 13;107(15):7054-9.
- SHUTE CC, LEWIS PR. CHOLINESTERASE-CONTAINING SYSTEMS OF THE BRAIN OF THE RAT. *Nature*. 1963 Sep 21;199:1160-4.

- Ulanovsky N, Moss CF. Hippocampal cellular and network activity in freely moving echolocating bats. *Nat Neurosci.* 2007 Feb;10(2):224-33.
- Van Cauter T, Poucet B, Save E. Unstable CA1 place cell representation in rats with entorhinal cortex lesions. *Eur J Neurosci.* 2008 Apr;27(8):1933-46.
- van der Meer MA, Redish AD. Theta phase precession in rat ventral striatum links place and reward information. *J Neurosci.* 2011 Feb 23;31(8):2843-54.
- Wang Y, Romani S, Lustig B, Leonardo A, Pastalkova E. Theta sequences are essential for internally generated hippocampal firing fields. *Nat Neurosci.* 2015 Feb;18(2):282-8.
- Zhang SJ, Ye J, Miao C, Tsao A, Cerniauskas I, Ledergerber D, Moser MB, Moser EI. Optogenetic dissection of entorhinal-hippocampal functional connectivity. *Science.* 2013 Apr 5;340(6128):1232-627.
- Zheng C, Bieri KW, Hsiao YT, Colgin LL. Spatial Sequence Coding Differs during Slow and Fast Gamma Rhythms in the Hippocampus. *Neuron.* 2016 Jan 20;89(2):398-408.

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の池谷裕二 教授に、心より感謝致します。研究に対する様々な御指摘・御助言を賜りました。日ごろから温かい激励の言葉を掛けて下さり、研究生活を送るにあたり、大きな支えとなりました。

研究室でのセミナーをはじめとする議論の場において、本研究に対する様々な御指摘・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 特任助教、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 特任准教授に心よりお礼を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接のご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 特任准教授に心よりお礼申し上げます。研究テーマの立案、実験手技、データ解析手法、論文や学会発表の準備に至るまで、常に親身にサポートをしてくださいました。さらに、研究に対する姿勢や進路などについても、様々な助言を頂き、研究者としての在り方を見つめ直す機会をたくさん与えて下さりました。

博士課程を同期として過ごし、共に切磋琢磨した東京大学大学院薬学系研究科薬品作

用学教室の安藤めぐみさん、岡田桜さん、高夢璇さん、平木俊光君、八木佐一郎君に心よりお礼申し上げます。充実した研究室生活を送ることができました。

同じ研究グループとして本研究をあらゆる面から支えていただき、多くのご助言をいただきました卒業生の鹿野悠博士、井形秀吉博士、中山亮太博士、西村侑也博士、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の鹿山将さん、紺野大地さん、小此木闘也君、三宅功朔君、柳下晴也君、瀧口龍之介君に心よりお礼申し上げます。

日々の研究生生活を送る中で、温かいサポートをいただきました薬品作用学教室の先輩、後輩の皆様へ心よりお礼申し上げます。

日常生活を様々な面からサポートしていただきました家族へと心よりお礼申し上げます。

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。