

# 博士論文

論文題目 脳梁膨大後部皮質における神経興奮性の制御

氏 名 高 夢璇

## 目次

1. 序論 .....	3
2. 方法 .....	6
3. 結果 .....	13
4. 考察 .....	24
5. 図 .....	29
6. 参考文献 .....	45
7. 謝辞 .....	48

## 1. 序論

脳梁膨大後部皮質（retrosplenial cortex; RSC）は頭頂葉内側部の尾側に位置し、哺乳動物において共通して存在する大脳皮質の亜領域である。RSC は空間ナビゲーションや感覚情報の処理、エピソード記憶、将来の出来事の想像など、様々な認知機能に関与することが知られている（Vann SD et al. 2003; Vann SD et al. 2009; Czajkowski R et al. 2014）。RSC には場所細胞（place cell）（Mao D et al. 2017）や頭方位細胞（head-direction cell）（Chen LL et al. 1994）が含まれており、空間シグナルの制御において、神経回路の「ハブ」（中枢）として機能するとされている（Alexander AS and DA Nitz 2017）。また、RSC における損傷や不活性化は、文脈的恐怖条件付けや、経験および価値関連の情報の符号化（encoding）などに障害をもたらすことも明らかにされた（Keene CS and DJ Bucci 2008; Corcoran KA et al. 2011）。

これらの多様な機能を支えるのは、RSC が持つ解剖学的特性である。RSC が海馬支脚（subiculum）や頭頂葉（parietal cortex）、前頭前皮質（prefrontal cortex）、大脳辺縁系の視床など、皮質および皮質下の多くの脳部位と神経連絡を形成することが報告されている（Vann SD et al. 2009）。こうした豊かな結合性に基づき、RSC が各脳領域から入力を受け取り、例えば場所細胞と格子細胞（grid cell）の信号や、自己中心的・他者中心的枠組みの情報など、多様な情報を統合・変換する役割を果たしている（Alexander AS and DA Nitz 2015; Nixima K et al. 2017; Alexander AS and DA Nitz 2017）。また、近年の研究により、海馬において鋭波リップル（sharp wave ripple; SWR）という記憶の形成・固定に関連す

る脳波（150-250 Hz の高周波振動）が発生するとき、RSC が海馬の情報を皮質に伝達する架け橋を担う可能性が示唆された（Nitzan N et al. 2020; Opalka AN et al. 2020）。

従来の RSC に関する研究は、RSC に損傷が入る際の動物の行動変化や、特定の行動課題における RSC の神経活動など、行動や機能レベルに着目したものが多かった。一方で、脳機能を生み出す基盤となるのは、個々の神経細胞が繋がった神経回路であるが、RSC においては個々の神経細胞や微小神経回路のレベルの知見が未だに少ない。

これまでに、海馬の鋭波リップルが RSC の顆粒性領域（granular RSC, gRSC）において層特異的な応答を引き起こし、鋭波リップル発生時には gRSC 2/3 層の神経活動が増大することが明らかとされてきた（Nitzan N et al. 2020）。gRSC の神経細胞自体も、電流注入を受け取ると、細胞層ごとに活動パターンが異なると報告されている。矩形波の電流注入に対して、gRSC 2/3 層神経細胞のほとんどがランプ状の脱分極および遅延性の活動電位（発火）を示し、late-spiking と呼ばれる発火特性を持っているが、5 層の神経細胞には上記の特徴が見られず、regular-spiking という発火様式を示すことが知られている（Kurotani T et al. 2013）。gRSC 2/3 で見られる late-spiking という発火様式は、細胞膜に発現するカリウムチャネルである Kv1.1、Kv1.4、および Kv4.3 などにより調節されと考えられる。こうした発火特性により、gRSC 2/3 層の神経細胞が海馬支脚など上流脳領域からの持続的な入力に対して、高い精確性と信頼性で応答できると考えられる（Brennan EKW et al. 2020）。

そこで、本研究では、海馬鋭波リップル時に神経活動が増大する gRSC の 2/3 層に着目している。gRSC 2/3 層神経細胞の電気生理学的性質を調べるために、パッチクランプ法により、gRSC 2/3 層神経細胞に対して電流注入と膜電位の記録を行った。また、海馬から入力を受け取ったときの応答を検証するために、光遺伝学的手法を用いて、gRSC 2/3 層の上流脳領域である海馬支脚にアデノ随伴ウイルスを導入し、2/3 層神経細胞に投射する神経終末を光活性化させた。これは、海馬における鋭波リップルなどの神経活動が、海馬支脚を介して gRSC 2/3 層に伝播する過程を模倣している。以上の操作により、gRSC 2/3 層神経細胞の電気生理学的特性、および情報伝達における可能な役割の解明に迫った。

## 2. 方法

### 実験動物

全ての動物実験は、東京大学の動物実験倫理委員会の承認を得て（承認番号：P24-8、P29-9）、東京大学実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施されました。実験プロトコルは、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示 71 号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年環境省告示第 88 号）および動物の処分方法に関する指針（平成 7 年総理府告示第 40 号）に従い、実験動物への苦痛を最小限に抑える努力のもとで行った。マウスは  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$  室温の下、自由摂食・摂水下で 12 時間の明暗サイクル（7 時点灯、19 時消灯）で飼育された。

### 急性脳切片の作製

生後 3～5 週齢の雌雄 ICR マウス（SLC, Shizuoka, Japan）から急性脳切片を作製した。マウスにイソフルランで短時間麻酔をかけ、素早く断頭して全脳を摘出した。摘出した全脳は、予め 95 %  $\text{O}_2$  / 5 %  $\text{CO}_2$  ガスで飽和させた氷冷下の人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid, ACSF (in mM): 127 NaCl, 3.5 KCl, 1.24  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.3  $\text{MgSO}_4$ , 2.4  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 10 d-glucose）の中に入れ、その後氷冷したシャーレ上で小脳および嗅球の部分を除去了。脳を瞬間接着剤（アロニアルファ, Toagosei, Japan）でステージに固定し、ビブラトーム（VT1200S, Leica Biosystems, Nussloch, Germany）を用いて、氷冷したスクロース置換人工脳脊髄液（sucrose-based ACSF (in mM): 222.1 sucrose, 27  $\text{NaHCO}_3$ , 2.5 KCl, 1.4

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.0 MgSO<sub>4</sub>, 1.0 CaCl<sub>2</sub>, 0.5 ascorbic acid) において 0.08 mm/s の速度で、RSC 領域が含まれる 400 μm 厚の冠状切片を作製した。作製した脳切片をさらに 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub> ガスで飽和した ACSF に移し、35°C で 20 分以上回復させて実験に用いた。

### *In vitro* 電気生理記録

*In vitro* 電気生理実験は、脳切片を記録チャンバー内に設置し、プラチナグリッド (10 mm×10 mm) を切片上に置いて固定した状態で実施された。室温下において、チャンバー内には 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub> ガスで飽和させた ACSF を 7-9 ml/min の流速で灌流した。パッチクランプ記録のために、記録電極は外径 1.5 mm のガラスキャピラリー (1B150F-4, World Precision Instruments) を使用し、プラーにより電極抵抗を 4-7 MΩ とした。電極内液の組成 (mM) は、120 K-gluconate, 5 KCl, 10 HEPES, 10 Na<sub>2</sub>-phosphocreatine, 2 Mg-ATP, 0.1 Na<sub>2</sub>-GTP, 0.2 EGTA とし (0.2% biocytin)、pH は 7.2-7.3 になるように調節し、浸透圧は 280-295 mOsm/kg にした。記録には Multiclamp 700B パッチクランプ増幅器 (Molecular Devices) および Digidata 1440A デジタライザー (Molecular Devices) を使用し、データを Clampex 10.5 (Molecular Devices) により 20 kHz でサンプリングした。*In vitro* パッチクランプの機器セットとしては、正立顕微鏡 (Eclipse FN1, Nikon)、水浸対物レンズ (40× / 0.80w, DIC N2, NIR Apo, Nikon) を用いた。

本実験では gRSC 2/3 層神経細胞 (small pyramidal cells) からホールセル記録

を行う際、細胞を赤外線微分干渉により可視化し、まず目視で細胞層を識別した。上記の電極内液をガラス電極に充填し、ヘッドステージ (CV-7B, Molecular Devices) に設置した。電極に陽圧をかけながら細胞に近づけ、陽圧を解除することでギガシールを形成させた。その後、順番に陰圧をかけ、細胞膜を貫通させ、ホールセルモードに移行した。ホールセルモードにおいて細胞体に矩形波の過分極電流を注入し、特徴的な late-spiking 応答を確認することで神経細胞を同定した。Late-spiking 応答とは、ランプ状の脱分極および比較的に長い発火潜時 (spike latency) により定義されている。過分極電流を注入して膜電位を記録した場合、記録後 20 分以上  $I = 0$  のモードで電極をさしたまま静置し、biocytin の細胞内拡散を待っていた。記録したデータは、アクセスレジスタンス  $45\text{ M}\Omega$  以下あるいは記録前後のアクセスレジスタンスの変化率が 30 %以下、平均膜電位が  $-60\text{ mV}$  以下をデータ採用のクライテリアとした。電流注入により誘発された脱分極の時定数 (time constant;  $\tau$ ) を、膜電位が静止膜電位から活動電位の閾値の 63% ( $= 1 - e^{-1}$ ) に達する時間として計算した。細胞外電気刺激には、同心円状の刺激電極 (USK-25, Unique Medical) を使用した。

### アデノ随伴ウイルスの導入

ウイルス導入のために、14-17 日齢のマウスをキシラジン ( $0.01\text{ ml/g}$ ) およびペントバルビタール ( $0.005\text{ ml/g}$ ) の腹腔内投与、あるいはイソフルラン (1.5%) の吸入により麻酔した。足の痛覚、ひげの動き、瞬きの消失により麻酔がかかったことを確認後、頭部固定装置に頭を固定した。手術部位に 1.5%リドカイン



を 0.1 ml 皮下投与し、頭皮を切開した。海馬支脚（十字縫合（bregma）から尾側に 3.5 mm、矢状縫合から腹外側に 2.5 mm の座標）あるいは gRSC 5 層（bregma から尾側に 2.5 mm、矢状縫合から腹外側に 0.2 mm の座標）の上から、開頭用ハイスピードドリルにより頭蓋骨に穴をあけた。アデノ随伴ウイルス（AAV5-CaMKII $\alpha$ -ChR2 (H134R) -EYFP,  $2.2 \times 10^{12}$  GC/ml）をガラスキャピラリーに充填し、プラスチックチューブによりマイクロシリンジにつなぎ、シリンジポンプ（Legato101, KDScientific）を用いて片方の海馬支脚（軟膜下 1.5 mm、500 nl）あるいは gRSC 5 層（軟膜下 0.6 mm、250 nl）に 100 nl/min の速度でウイルスを注入した。導入してから 2-3 週間のウイルス発現期間を設け、4-5 週齢となったマウスを実験に用いた。

#### In vitro 光遺伝学的刺激

*In vitro* における光遺伝学的刺激は、対物レンズを通して 473 nm のレーザーパルス照射した。約 5 mV の興奮性シナプス後電位（excitatory postsynaptic potential; EPSP）を誘発するように、光照射の強度を 0.1-1.5 mW の区間で調整した。誘発された EPSP の開始点（initiation）を、照射が始まってから膜電位の上昇速度が初めて 0.1 mV/ms を超えた時点として定義した。

#### In vivo 電気生理記録

*In vivo* 電気生理実験では、28-40 日齢の雄性 ICR マウスを用いてホールセル記録を行った（Ishikawa D et al. 2014; Funayama K et al. 2015）。実験当日にマウス

を新奇環境ボックスに暴露し、30 分間自由に環境を探索させた後、ウレタン (2.25 g/kg) の腹腔内投与により麻酔した。足の痛覚、ひげの動き、瞬きの消失により麻酔がかかったことを確認後、頭皮を切除し、頭蓋骨に歯科用セメントを用いて金属製の頭部固定用プレートを取り付けた。開頭手術により頭蓋骨に  $2.0 \times 1.0 \text{ mm}^2$  のウィンドウを開け（中心：bregma から尾側に 1.5 mm、矢状縫合から腹外側に 1.0 mm の座標）、露出した皮質ウィンドウは厚さ約 1.5 mm の 1.7% アガロースで覆った。抵抗を  $4\text{--}7 \text{ M}\Omega$  としたガラス電極を使用し、gRSC 領域（bregma から尾側に 1.0–3.0 mm、矢状縫合から腹外側に 0.5 mm）において深部へ 0.5–0.9 mm 下ろし、ブラインド法により 2/3 層の神経細胞から *in vivo* パッチクランプ記録を行った。電極内液の組成 (mM) は、120 K-gluconate, 5 KCl, 10 HEPES, 10  $\text{Na}_2$ -phosphocreatine, 2 Mg-ATP, 0.1  $\text{Na}_2$ -GTP, 0.2 EGTA とし (0.2% biocytin)、pH は 7.2–7.3 になるように調節し、浸透圧は 280–295 mOsm/kg にした。記録を行う前に、神経細胞には  $-200 \text{ pA}$  から  $+200 \text{ pA}$  の 1 s 長の矩形電流 (50 pA 刻み) を注入し、発火パターンを確認した。発火パターンが late-spiking である神経細胞を用いて、記録に進めた。記録したデータについて、平均膜電位が  $-55 \text{ mV}$  以下、また活動電位が  $-20 \text{ mV}$  以上をデータ採用のクライテリアとした。

#### In vivo 光遺伝学的刺激

*In vivo* 光遺伝学的刺激はパッチクランプ記録と同時に実施された。パッチクランプ記録の直前、海馬支脚におけるウイルス導入部位（bregma から尾側に 3.5 mm、矢状縫合から腹外側に 2.0 mm の座標）に光ファイバー（直径 200  $\mu\text{m}$ ,

Thorlabs) を埋め込み、記録時に 3 mW の光照射を行った (LUCIR)。gRSC 2/3 層神経細胞においてホールセル記録を行い、光照射時に EPSP が誘発されることを確認した。

### 記録細胞の可視化

*In vitro* 実験後の急性脳切片は、4 % パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液に浸漬し、24 時間以上冷所で保存した。後固定の後、2 µg/ml streptavidin-Alexa Fluor 594 conjugate および 0.1 % Triton X-100 の混合液に浸漬し、常温で 4-6 時間振盪した。その後、脳切片をリン酸緩衝食塩水 (Phosphate Buffered Saline, PBS (-) (in mM): 137 NaCl, 2.68 KCl, 8.1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で 10 分間 3 回の洗浄を行い、そのうち 2 回目は 0.1% Hoechst 33342 を入れ、15 分間の振盪を行った。記録細胞の位置が gRSC 2/3 層にあることを確認できた場合のみ、細胞を解析に用いた。

*In vivo* の場合、実験後に電極を慎重に引き上げた。マウスは PBS および 4 % PFA 溶液を用いて灌流固定を行い、全脳を摘出した。摘出した全脳は 4 % PFA 溶液に浸漬し、24 時間以上冷所で保存した。後固定の後、PBS で 10 分間 3 回の洗浄を行い、ビブラトーム (DTK-1000N, D.S.K) を用いて 100 µm 厚の矢状断切片標本作製した。その後、2 µg/ml streptavidin-Alexa Fluor 594 conjugate、0.2 % Triton X-100 および PBS の混合液に浸して常温で 4 時間振盪し、記録細胞が確認された切片のみ、0.4 % NeuroTrace 435/455 Blue Fluorescent Nissl Stain と PBS の混合液に浸して、常温で 24 時間以上振盪した。蛍光画像は、共焦点顕微鏡

(FV1200, Olympus または BX61WI, Olympus) を用いて取得した。

### データ解析

データ解析は MATLAB R2016a (The MathWorks, MA, USA) を用いて行った。

統計分析は、Student's *t*-test, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test および bootstrap test for means によって行われた。

### 3. 結果

#### gRSC 2/3 層の神経細胞はプライミング刺激により発火潜時が短くなる

gRSC 2/3 層神経細胞の電気生理学的性質について調べるために、マウスから急性脳切片を作製し、*in vitro* パッチクランプ法により gRSC 2/3 層の神経細胞からホールセル記録を行った（図 1A 左）。gRSC 2/3 層神経細胞の 9 割以上が脱分極電流の注入に対して、比較的遅い活動電位（図 1B）と高い入力抵抗（input resistance,  $432 \pm 146 \text{ M}\Omega$ , mean  $\pm$  SD of 89 cells）、そして低い静止膜電位（resting membrane potential,  $-76.2 \pm 5.9 \text{ mV}$ , mean  $\pm$  SD of 89 cells）を示した。これらの特徴はラットを用いた先行研究に一致している（Kurotani T et al. 2013）。本研究では、パッチクランプ記録時に、「ランプ状の脱分極」および「遅延性の活動電位（発火）」を特徴とする late-spiking という性質を、gRSC 2/3 層の神経細胞を識別する生理学的マーカーとした。記録後に biocytin に基づいた記録細胞の可視化を行い、細胞の位置が gRSC 2/3 層にあることをさらに確認してから、解析に用いた（図 1A 右）。

電流注入の開始時刻から、細胞が発火を示すまでの時間は発火潜時と呼ばれ、神経興奮の遅さの指標となる。一般的には、刺激に対する神経細胞の発火潜時は、情報の伝達や符号化に重要であるとされている（Gautrais J and S Thorpe 1998; Chase SM and ED Young 2007）。gRSC 2/3 層神経細胞が示す長い発火潜時は、入力された情報を統合する役割に関わると推測されている（Kurotani T et al. 2013; Nixima K et al. 2013; Nixima K et al. 2017）。そこで、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時が細胞の直前の活動によって調節されるかを調べた。細胞に短い電

流を予め注入し（priming stimulation = 200 ms、プライミング刺激）、1回の発火を引き起こした後、間隔を置いて二回目の電流注入（main stimulation = 500 ms、テスト刺激）を行った（図 1C 左、下段）。200 ms のプライミング刺激が1回の発火を誘発するように、注入電流の強さを調節した。テスト刺激の電流はプライミングと同じ強さである。対照群のトライアルでは、プライミング刺激を加えずにテスト刺激のみを行った（図 1C 左、上段）。こうした「プライミングなし」（w/o）のトライアルと、プライミング刺激が含まれる「プライミングあり」（w/）のトライアルを交互に実施した。その結果、テスト刺激によって誘発された最初の発火までの潜時（first spike latency）は、プライミングなしのトライアルよりも、プライミングありのほうが有意に短かった（図 1C 右； $n = 10$  trials each;  $**P = 8.5 \times 10^{-8}$ , Student's  $t$ -test）。つまり、促進的なプライミング効果が観察された。以上の実験を 8 枚の脳切片から 1 細胞ずつ用いて同様に実施したところ、同じ結果が得られた（図 1D）。

電流注入を行う実験では、発火のタイミングに関与する因子として、1) 活動電位を発生させるための発火閾値（spike threshold）および 2) 膜電位が閾値に達する脱分極の速度の二つが挙げられる。プライミング刺激がこれらの因子に影響するかを調べたところ、発火閾値も脱分極の時定数も有意に変化しなかった（図 1E-F）。また、プライミング刺激の前後、静止膜電位にも有意な変化が見られなかった（before:  $-81.9 \pm 7.3$  mV; after:  $-81.9 \pm 7.5$  mV; mean  $\pm$  SD of 66 trials from 7 cells;  $P = 0.94$ ,  $t_6 = 0.077$ , paired  $t$ -test）。興味深いことに、上述の促進的なプライミング効果を誘導するには、プライミング刺激が活動電位を引き起

こす必要はなかった。プライミング刺激において、注入電流の強度を上記の 80%まで減少させ、発火閾値を下回るように調節した場合でも、有意なプライミング効果が認められた（図 1G）。ただし、プライミング刺激が活動電位を引き起こした場合より、促通的なプライミング効果がやや弱かった（図 1H）。

同じ強度の電流注入でも、異なる発火数を引き起こすことがある。プライミング刺激によって複数回の発火を引き起こした場合、発火数とそれに続くプライミング効果との関連を調べたところ、発火数が多いほどプライミング効果も顕著になることが明らかになった（図 1I）。従って、gRSC 2/3 層の神経細胞は自身の直前の脱分極によって、神経興奮の度合いが高くなる方向に調節されることを明らかにした。

#### gRSC 2/3 層の神経細胞には促通的なプライミング効果が観察される

次に、プライミング刺激に関して 3 つのパラメータを変化させ、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時に対する影響を観察することで、上述のプライミング効果の特性を調べた。3 つのパラメータとして、1) プライミング刺激となる注入電流（プライミング電流）の終了時刻から、テスト刺激の開始時刻までの間隔（interval）；2) プライミング電流の持続時間（duration）；3) プライミング電流の強度（strength）を用いた（図 2A）。実験条件を制御するために、ほかの 2 つのパラメータを一定に保ち、いずれの 1 つのパラメータを変化させた。具体的には、特に指定のない限り、間隔、持続時間および強度を、それぞれ 50 ms、200 ms および 100%に設定した。その中で、プライミング刺激によって 1 回の

発火を誘発するように、各細胞について注入電流の強度をそれぞれ最適な値に調節した。調節した後の強度を 100%として、実験およびデータ解析に進めた。ただし、実際の注入電流は  $94 \pm 8$  pA (mean  $\pm$  SEM of 18 cells) であった。

各パラメータを一連の値に設定し、ほかの条件を変えずに、トライアルを混合した順番で実行した。プライミング刺激とテスト刺激との間隔を 50 ms から 3 s まで拡大して検証した結果、間隔が短いほど、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜在時が短くなる傾向が観察された (図 2B)。最大のプライミング効果の半分を生じさせる平均間隔は  $316 \pm 156$  ms であった (mean  $\pm$  SD of 10 cells)。プライミング刺激の持続時間を 50-300 ms の範囲で変化させて検証した結果、持続時間が長いほど発火潜在時が短くなる傾向が見られ、約 100 ms 以上の持続時間となるとプライミング効果の飽和が生じた (図 2C)。また、プライミング刺激の強度を -100%から 120%まで変えて検証した結果 (-100%は過分極電流を表す)、脱分極電流を注入した場合のみ、促進的なプライミング効果が認められた (図 2D)。過分極電流を用いたプライミング刺激は、発火潜在時に有意な変化を引き起こさなかった。

以上のプロセスにおいて、神経細胞の膜抵抗も観測した。プライミング刺激およびテスト刺激の脱分極電流を注入する 50 ms 直前、短い過分極ステップ電流 ( $-50$  pA, 持続時間が 50 ms) を注入し、膜電位の変化を記録した (図 3)。プライミング電流の終了時刻からテスト刺激の開始時刻までの間隔を 200、500 または 1000 ms に設定し、発火潜在時が異なるトライアルとした (図 3A)。ステップ電流の強度 ( $I = -50$  pA) および膜電位の変化量 ( $\Delta V$ ) を用いて、 $\Delta V/I$ により



各時点の膜抵抗を算出した。ただし、50 ms の過分極電流は、膜電位を定常値まで低下させるのに十分であることを確認した。その結果、膜抵抗はプライミング刺激の前後に有意に変化せず（図 3B）、またその後の発火潜時にも有意に相関しなかった（図 3C）。

#### gRSC 2/3 層以外の脳領域において促通的なプライミング効果が観察されない

これまでに gRSC 2/3 層で見られた促通的なプライミング効果は、ほかの脳領域においても共通して存在するかを検証した。そのために、gRSC の 5 層、前帯状皮質（anterior cingulate cortex; ACC）の 2/3 層、海馬 CA1 野、そして嗅周皮質（perirhinal cortex; PRC）の 6 層にある錐体細胞を用いて、図 2 と同様に 3 つのパラメータについて調べた。各脳領域を選定した理由が以下になっている。1) gRSC 5 層：gRSC 2/3 層と同じ脳領域に位置するほかの細胞層；2) ACC 2/3 層：RSC と同じく帯状皮質に位置するが、帯状皮質の前方（anterior）にあたる同じ細胞層；3) 海馬 CA1 野：RSC と類似した機能を持つ脳領域；4) PRC 6 層：ラットにおいて late-spiking な神経細胞が含まれると報告されている。各領域の神経細胞に対して、注入電流の実測値がそれぞれ  $98 \pm 5$  pA（gRSC 5 層）、 $124 \pm 10$  pA（ACC 2/3 層）、 $54 \pm 3$  pA（海馬 CA1）および  $85 \pm 5$  pA（PRC 6 層）であった（means  $\pm$  SEMs of 8, 9, 9 and 11 cells, respectively）。

4 つの脳領域は、いずれも gRSC 2/3 層神経細胞と正反対なプライミング効果を示すことが分かった（図 4、ただし PRC 6 層における 1 個の late-spiking 細胞を除いて）。つまり、これらの脳領域において、プライミング刺激として脱分

極電流を注入すると、神経細胞の発火タイミングが遅延される方向に変化した。以上の結果から、錐体細胞が先行的な刺激を受けると、自身の興奮性を低下させる方向に自己制御する（self-desensitize）現象が一般的であることが示唆されている。こうした自己抑制的な現象（autosuppression）は、神経細胞の過剰興奮を防ぐための負のフィードバック制御であると考えられる（Ha GE and E Cheong 2017）。また、gRSC 2/3 層神経細胞とは異なり、ほかの脳領域で見られた抑制的なプライミング効果は短時間しか持続せず、プライミング刺激後の 150 ms 以内ではほぼ観察されなくなった。従って、gRSC 2/3 層の神経細胞は独特な自己増感（self-sensitization）的なプライミング効果を示すことが明らかになった。

#### 海馬支脚の投射の予め活性化により、gRSC 2/3 層神経細胞が発火しやすくなる

これまでに、プライミング刺激として細胞体に電流を直接注入した。そこで、人工的に電気刺激を与えるのではなく、元々脳内にある神経投射を予め活性化させた場合も、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時に影響するかを検証した。gRSC 2/3 層に投射を送る上流脳領域として、背側の海馬支脚（Cembrowski MS et al. 2018; Yamawaki N, KA Corcoran, et al. 2019）および gRSC 5 層を選定した。前者が gRSC 2/3 層に長距離的投射を送るのに対して、後者が gRSC 2/3 層と皮質局所回路を形成している。また、前者が主に海馬から記憶に関わる情報、後者が皮質から感覚などに関わる情報をそれぞれ伝達するとされている。いずれかの脳領域に対してアデノ随伴ウイルス AAV5-CaMKII $\alpha$ -ChR2-EYFP を導入し（図

5A、D)、導入部位の興奮性神経細胞に ChR2 を発現させた。導入して 2-3 週間後に脳切片を作製し、gRSC 2/3 層における ChR2 発現を共焦点顕微鏡により観察した。海馬支脚にウイルスを導入した場合、gRSC 2/3 層において ChR2-EYFP のシグナルが観察された (図 5B-C)。これは海馬支脚から投射される神経線維の軸索終末であると考えられる。一方で、gRSC 5 層にウイルスを導入した場合、gRSC の 5 層および 1 層に ChR2-EYFP のシグナルが確認された (図 5E-F)。

gRSC 2/3 層神経細胞に対して、上述の神経投射を活性化させた場合のプライミング効果を調べた。光遺伝学の手法により、プライミング刺激として青色光のパルス照射 (2 ms) を用いて、ChR2 発現の神経終末を予め光活性化させた。青色光照射は顕微鏡の対物レンズ (40×) を通して行われ、それに続くテスト刺激との間隔を 500 ms または 1 s に設定した。光照射の強度を、約 5 mV の興奮性シナプス後電位 (EPSP) を誘発するように調節した。光照射の開始時刻から、誘発された EPSP の開始までの時間は、海馬支脚または gRSC 5 層からの投射を活性化した場合において、それぞれ  $3.9 \pm 0.5$  ms と  $3.6 \pm 0.6$  ms であった (mean  $\pm$  SEM of 6 cells each)。

プライミングなしのトライアルと比べて、海馬支脚からの投射を 500 ms の間隔で予め光活性化した場合、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時が有意に短縮された (図 6A-B)。つまり、海馬支脚からの投射神経の光活性化も、細胞体への電流注入と類似的なプライミング効果をもたらすことが分かった。光照射によるプライミング刺激と 200 ms の電流注入によるプライミング刺激を同じ細胞で交互に行い、そのプライミング効果を比較すると、前者の効果が有意に弱かった

(図 6C)。これは、細胞体に対して電流を直接注入したほうが、より大きくて持続した脱分極を引き起こしたからだと考えられる。

一方で、gRSC 5 層からの投射を光活性化した場合、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時が有意に延長され、抑制的なプライミング効果が観察された (図 6D-E)。しかし、GABA<sub>B</sub> 受容体アンタゴニストである CGP52432 を灌流した場合 (10  $\mu$ M)、促通的なプライミング効果が見られた (図 6F)。この現象について、海馬支脚や gRSC 5 層など上流脳領域からの興奮性シナプス入力、本来 gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時を短縮させる効果があるが、gRSC 5 層からの入力は通常の条件下で GABA<sub>B</sub> 受容体を介した抑制性の神経活動にマスクされていると推測される。また、刺激の間隔が 1 s の場合、プライミング刺激として海馬支脚の投射を活性化させた場合、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時が有意に変化しなかった (図 6B)。それに対して、CGP52432 の存在下で gRSC 5 層の投射を予め活性化させた場合、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時が有意に短縮された (図 6F)。これは、抑制性神経伝達を阻害した条件下で、空間的位置に近い 5 層の興奮性投射が、より強いプライミング効果をもたらすことを示唆している。

#### 海馬支脚の投射の予め活性化は、gRSC 2/3 層神経細胞の応答を促進する

光遺伝学的操作によるプライミング刺激は、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時以外に、細胞のシナプス応答をも調節するかを検証した。そのために、gRSC 2/3 層よりやや深層にある領域に同心円状の刺激電極を置き、神経細胞の外部から電気刺激を与えた (図 7A)。各細胞において、電気刺激 (50  $\mu$ s) の強度を、

約 40%の確率（20-60%の範囲）で活動電位を誘発するように調節した。つまり、同じ強度の電気刺激が発火あるいは EPSP をどちらか一方引き起こすことになる。電気刺激から発火が起こるまでの時間が  $4.3 \pm 0.6$  ms であり、そして発火の半値幅（half-width）が  $1.60 \pm 0.03$  ms（mean  $\pm$  SEM of 277 trials in 17 cells）であったことから、観測された発火は逆行性に（antidromically）誘発されたものではなく、シナプス伝達によるものであることが分かった。

プライミング刺激として海馬支脚からの投射を光活性化し、その 500 ms 後に刺激電極から電気刺激を与えた（図 7B）。こうしたプライミングありのトライアルを、電気刺激だけを行うプライミングなしのトライアルと交互に行い、gRSC 2/3 層神経細胞の発火確率（firing probability）を比較した。その結果、海馬支脚からの投射を予め光活性化した場合、細胞の発火確率が有意に高くなった（図 7B-C）。一方、gRSC 5 層にウイルスを導入したマウスから脳切片を作製し、同様なプロトコルを実施した結果、gRSC 2/3 層神経細胞の発火確率が有意に低下した（図 7D-E）。さらに、電気刺激の強度を低下させ、gRSC 2/3 層神経細胞において発火ではなく、5 mV ほどの EPSP を引き起こすように調節した。プライミング刺激の有無によって、EPSP の振幅が変化するかを調べた。プライミング刺激として海馬支脚からの投射を光活性化したトライアルでは、EPSP が増幅されたのに対して、gRSC 5 層からの投射を光活性化した場合、EPSP の振幅の低下が見られた（図 7F）。つまり、EPSP に関する結果は発火確率の変化に一致している。

### gRSC 2/3 層神経細胞におけるプライミング効果はプレシナプスに依存しない

これまでの実験において、EPSPを引き起こすために細胞外刺激電極を用いた。そこで、青色光照射および細胞外電極による二回の刺激は、gRSC 2/3 層神経細胞の同じプレシナプスを活性化した可能性がある。その場合、観察されたプライミング効果は、二発刺激促進 (paired-pulse facilitation; PPF) によって生じたものであったかもしれない。上記の可能性を排除するために、青色光のパルス照射を二回連続で行い、gRSC 2/3 層神経細胞において興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) の PPF が起こるかを計測した。光照射 (2 ms) の間隔を 100、250 または 500 ms に設定し、海馬支脚からの投射 (図 8A) あるいは gRSC 5 層 (図 8B) からの投射についてそれぞれ検証した。その結果、どちらの場合でも、間隔の拡大にともなって二発刺激抑圧 (paired-pulse depression; PPD) の傾向が見られた。特に間隔が 500 ms のとき、両方の場合では二回目の EPSC の振幅が一回目より有意に小さかった (図 8A 右、図 8B 右)。従って、同じプレシナプスの二回連続の光活性化は、PPF を誘発できないことが分かった。

### 海馬支脚の投射の活性化は *in vivo* でも gRSC 2/3 層神経細胞の興奮性を高める

以上より、gRSC 2/3 層神経細胞において、海馬支脚からの投射の予め活性化は、細胞のほかのシナプス入力に対する応答性を高めたことが示唆された。生体内においても、gRSC 2/3 層の神経細胞が同様な興奮性調節を受けるかについて検証した。マウスの gRSC 2/3 層神経細胞から *in vivo* パッチクランプ記録を行

い、gRSC 2/3 層神経細胞の自発的シナプス活動を計測した（図 9A）。背側海馬支脚に AAV5-CaMKII $\alpha$ -ChR2-EYFP が導入されたマウスを用いて、2-3 週間のウイルス発現期間の後にマウスをウレタン麻酔し、ウイルスの導入部位に光ファイバーを埋め込んだ（図 9B）。gRSC にアプローチするために、ガラス電極を斜めに挿入し、記録細胞を 0 pA に電流固定（current clamp）した。平均記録時間が  $748 \pm 97$  s（mean  $\pm$  SEM of 5 cells）であり、膜電位と入力抵抗がそれぞれ  $-74.4 \pm 3.5$  mV と  $266.9 \pm 31.2$  M $\Omega$ （mean  $\pm$  SEM of 5 cells）であった。光ファイバーを通して、100 ms の青色光照射を 5 s ごとに与えた。光照射が gRSC 2/3 層の神経細胞において膜電位の一過的上昇を引き起こし、またこの膜電位の上昇は光照射を繰り返しても安定して観察された（図 9D）。膜電位の上昇は振幅が  $22.7 \pm 0.3$  mV、曲線下面積（area under the curve; AUC）が  $1.75 \pm 0.50$  mV $\cdot$ s であった（mean  $\pm$  SEM of 380 trials in 5 cells）。また、光刺激の開始時刻から誘発された EPSP のピークまでの平均時間が  $65.7 \pm 1.4$  ms であった（mean  $\pm$  SEM of 380 trials in 5 cells）。

海馬支脚に対する光照射の前後において、gRSC 2/3 層神経細胞で記録された膜電位から同じ長さの期間（700 ms）を抽出し、膜電位の AUC を計算した。光照射の前（ベースライン）と比べて、照射の直後では膜電位の AUC が有意に大きくなった（図 9E）。このことから、生体内においても、海馬支脚からの投射の活性化は、gRSC 2/3 層の神経細胞を興奮状態に向かわせることが示唆された。

## 4. 考察

これまでに、gRSC 2/3 層神経細胞のほとんどが late-spiking という発火特性を持ち、発火までの潜時がシナプス入力統合に参与すると考えられてきた (Kurotani T et al. 2013; Nixima K et al. 2013; Nixima K et al. 2017)。しかし、こうした比較的に長い発火潜時が調節を受けるか、またどのように調節されるかは不明であった。本研究では電気生理学的手法を用いて、gRSC 2/3 層の神経細胞における独特なプライミング効果を見出した。gRSC 2/3 層神経細胞に先行的な脱分極電流を注入すると（プライミング刺激）、最初の発火までの潜時が短縮される現象が観察された。一方で、同じプロトコルによりほかの 4 つの脳領域について検証したところ、いずれの脳領域も gRSC 2/3 層と正反対なプライミング効果を示し、プライミング刺激により発火のタイミングが遅延された結果となった。

一般的には、神経細胞がフィードバック抑制を介して、恒常的あるいは適応的に機能している。その代表例の一つとして発火率の順応（spike-frequency adaptation）が挙げられ、一定の電流を神経細胞に注入し続けると、細胞の発火率が時間経過に伴って徐々に減少していく現象を指している。この現象はカルシウム依存性のカリウムチャネルや塩素チャネルによって生じるとされ、神経細胞がこのプロセスに基づいて、より強いシナプス入力に選択的に応答し、ほかの細胞から受け取る情報をフィルターできると推測されている (Ha GE and E Cheong 2017)。gRSC 5 層、ACC 2/3 層、海馬 CA1 野および PRC 6 層の神経細胞は自身の興奮性を低下させる方向に自己制御し、上述と類似的な順応性を示し



た。それに対して、gRSC 2/3 層の神経細胞が自己増感的という例外的な特性を持っている。gRSC 2/3 層神経細胞では paired-pulse 刺激に対して PPF が生じなかったため、本研究で観察された促進的なプライミング効果はプレシナプスではなく、ポストシナプスのメカニズムに依存する可能性が高い。

一つの可能な機構として、カルシウム依存性イオンチャネルの関与が考えられる。例えば、脱分極と細胞内カルシウム濃度に制御される BK (big potassium) チャネルや、海馬および皮質で発現し、塩素イオンの細胞内流入を調節する ANO2 (anoctamin 2) チャネルなどが挙げられる (Huang WC et al. 2012; Vocke K et al. 2013)。これらのイオンチャネルは、spike-frequency adaptation の調節に関わっている。ほかの脳領域における regular-spiking な神経細胞よりも、gRSC 2/3 層神経細胞では spike-frequency adaptation の度合いがはるかに低かったため (Kurotani T et al. 2013)、gRSC 2/3 層神経細胞において BK チャネルや ANO2 チャネルの発現レベルも低い可能性が示唆されている。従って、ほかの神経細胞とは異なり、gRSC 2/3 層の late-spiking な神経細胞は先行的な脱分極によって興奮性が低下されない性質を示している。さらに、上記のイオンチャネル以外に、いくつかの種類の電位依存性のカリウムチャネル (例えば Kv1.1、Kv1.4、Kv4.3 など) が gRSC 2/3 層神経細胞において発現量が多く、発火タイミングの調節に関わると知られている (Kurotani T et al. 2013)。Kv チャネルにも種類によって、繰り返した脱分極刺激を感知すると応答が変わっていくものがある (Rezazadeh S et al. 2007)。そのため、gRSC 2/3 層神経細胞において発現レベルが高い Kv チャネルが、プライミング刺激により活性化の度合いが変わる可能

性がある。これらのチャネルがカリウムイオンの細胞外への流出を制御することで、細胞の興奮性および発火潜時に影響すると考えられる。

本研究では光遺伝学的操作を取り入れ、上流の脳領域である海馬支脚からの投射が、gRSC 2/3 層の神経細胞を興奮性上昇の方向に制御する一方、gRSC 5 層からの投射が gRSC 2/3 層神経細胞の興奮性を逆な方向に調節することを明らかにした。過去の報告により、海馬支脚からの投射が vGlut1（小胞型グルタミン酸輸送体 1）あるいは vGlut2 発現の bursty な錐体細胞を介して、gRSC 2/3 層神経細胞の細胞体を直接興奮させることが知られている（Yamawaki N, KA Corcoran et al. 2019）。本研究における細胞体への電流注入も、bursty な細胞による入力に類似したものとなっている。また、海馬支脚からの神経終末に対する光照射は、gRSC 2/3 層神経細胞において発火を誘発しなかったが、gRSC 2/3 層神経細胞の興奮性を高めた作用が認められた。

gRSC 5 層からの投射を光活性化した場合、gRSC 2/3 層神経細胞において EPSP を引き起こしたが、その直後に細胞の応答を促進できなかった。そこで、GABA<sub>B</sub> 受容体を拮抗薬により阻害すると、促進的なプライミング効果が観察されるようになった。大脳皮質では、GABA<sub>B</sub> 受容体を介したフィードフォワード抑制が広く存在し、皮質の微小神経回路の働きを調節している（Isaacson JS and M Scanziani 2011）。従って、一つの可能性として、gRSC 5 層の神経細胞も抑制性の介在ニューロン（interneuron）をリクルートし、GABA<sub>B</sub> 受容体を介したフィードフォワード抑制により、本来の促進的なプライミング効果がマスクされている可能性がある。それを裏付ける知見として、gRSC 2/3 層の late-spiking な

神経細胞が近傍の高頻度発火の介在ニューロン（fast-spiking interneurons）から抑制性入力を頻繁に受け取ることが報告されている（Brennan EKW et al. 2020）。これは、gRSC 2/3 層の神経細胞がフィードフォワード抑制を主に含む抑制性優位（inhibition-dominated）な微小神経回路に関与していることを示唆すると考えられる。もう一つの可能性として、GABA<sub>B</sub> 受容体による持続的な背景活動（background activity）はフィードフォワード抑制と関係なく、gRSC 5 層からの投射のプライミング効果をマスクしているかもしれない。本研究の結果に基づいて、海馬支脚からの興奮性投射が gRSC 2/3 層神経細胞の細胞体に直接ターゲットするのに対して、gRSC 5 層からの興奮性入力 gRSC 2/3 層細胞の 1 層に伸びる樹状突起を介して、2/3 層細胞の活動を調節する可能性がある。つまり、これらの二通りの投射が異なる経路で gRSC 2/3 層神経細胞に作用する。そのため、それぞれの入力が伝わる過程において、GABA<sub>B</sub> 受容体に基づく樹状突起抑制（dendritic inhibition）の影響を、異なる程度で受け取っている可能性が考えられる（Tamás G et al. 2003）。

海馬支脚は解剖学的に海馬とつながっており、海馬から gRSC までの中継として役立っている。海馬において鋭波リップルが発生するとき、gRSC 2/3 層の神経活動が増幅されるが（Nitzan N and S McKenzie 2019; Nitzan N et al. 2020）、5 層の神経細胞が海馬から抑制性の投射を受け（Yamawaki N, X Li, et al. 2019）、鋭波リップルにより活動が低下する傾向を示すと報告されている（Opalka AN et al. 2020）。gRSC 2/3 層における抑制性細胞も鋭波リップルに伴った神経活動を示すが（Nitzan N et al. 2020; Opalka AN et al. 2020）、その活動によって gRSC 2/3

層神経細胞が抑制されるということを示す知見はなかった。一方で、gRSC 2/3 層神経細胞が鋭波リップルに応じて、ユニット活動が急激に増大することが示されている (Nitzan N et al. 2020)。鋭波リップル中、海馬では細胞集団が同期的な発火を示すため、海馬支脚にも同期活動が生じると考えられる。これは、本研究における海馬支脚の光活性化に似たプロセスである。その結果を踏まえて、海馬で発生する鋭波リップルにより、gRSC 2/3 層神経細胞の応答性が増大されていく可能性がある。gRSC が脳内において「ハブ」として機能しているため、海馬で鋭波リップルが生じると、gRSC を介した情報伝達を促進する可能性がある。また、鋭波リップルが複数回連続で発生し、数百 ms 以上持続する場合も多い (Davidson TJ et al. 2009)。gRSC 2/3 層神経細胞がその独特な性質によって、持続した鋭波リップルに対して高い感度で応答することで、海馬-皮質間の情報伝達、そして記憶の固定に重要な役割を果たすことが可能になると考えられる。

## 5. 図

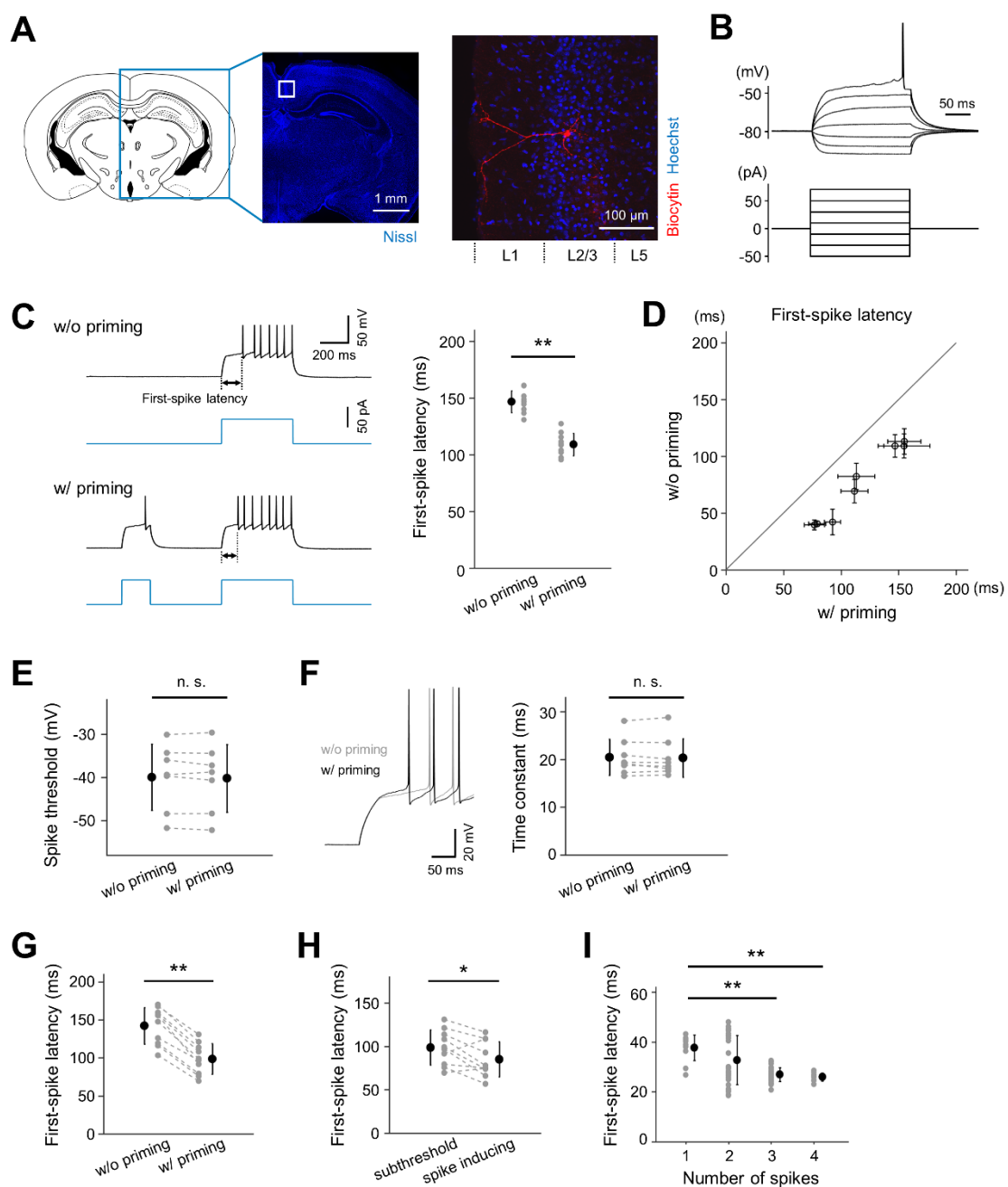


図1 脱分極電流の予め注入は gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時を短縮させる

A. (左) RSC を含むマウス脳の冠状断面の概略図、および Nissl 染色後の蛍光顕微鏡画像。白い枠は記録領域 (gRSC) を示す。(右) 記録細胞の代表写真。

記録された gRSC 2/3 層神経細胞を biocytin に基づいて可視化した。

B. 記録細胞に -50 pA から +70 pA の 200 ms 長の矩形電流を 20 pA 刻みで注入し（下段）、膜電位応答の代表例を示した（上段）。gRSC 2/3 層神経細胞は、電流注入の開始から発火が生じるまで、比較的に長い潜時を示した。

C. （左上）テスト刺激の電流注入に対する gRSC 2/3 層神経細胞の膜電位応答（プライミングなしのトライアル、w/o priming）。発火潜時が約 150 ms になるように電流の強度を調節した。（左下）同じ神経細胞において、テスト刺激のほかに、同じ強度の短い脱分極電流を予め注入したときの膜電位応答（プライミングありのトライアル、w/ priming）。（右）二種のトライアルを交互に複数回行い、細胞の発火潜時を比較した。プライミング刺激の存在下で、発火潜時が有意に短縮された。ここで示した例では、それぞれのトライアルを 10 回ずつ行った。Data presented as the mean  $\pm$  SD,  $**P = 8.5 \times 10^{-8}$ ,  $t_{18} = 8.61$ , Student's  $t$ -test.

D. C のプロトコルを複数の gRSC 2/3 層神経細胞において実施し、細胞ごとに発火潜時の mean  $\pm$  SD を示した。Data summarized from 8–10 trials each from 8 neurons in 3 mice.  $P = 2.3 \times 10^{-7}$ ,  $t_7 = 19.5$ , paired  $t$ -test for the average latencies.

E. gRSC 2/3 層神経細胞において、プライミングなしおよびありのトライアルにおける発火閾値の比較。発火閾値の時刻を判断するために、膜電位の二次導関数における正のピークの最大値を用いた。発火閾値には有意差が見られなかった。Data summarized from 8–10 trials each from 7 neurons in 3 mice.  $P = 0.41$ ,  $t_6 = 0.895$ , paired  $t$ -test.

F. （左）プライミングなしおよびありのトライアルにおいて、テスト刺激の

注入電流に対する膜電位応答の比較。プライミングなしの場合を灰色、ありの場合を黒のトレースで示した。脱分極の初期段階ではトレースがオーバーラップした。（右）二種のトライアルにおける時定数  $\tau$  の比較。Data summarized from 8 neurons in 3 mice (8–10 trials per cell).  $P = 0.59$ ,  $t_7 = 0.572$ , paired  $t$ -test.

G. プライミング刺激の注入電流の強度を調節し、発火を誘発しないように低下させた (subthreshold priming)。この場合でも、テスト刺激に対して発火潜時はプライミング刺激の存在下で有意に短縮された。Data summarized from 10 neurons in 3 mice (4–11 trials per cell).  $**P = 2.2 \times 10^{-7}$ ,  $t_9 = 13.9$ , paired  $t$ -test.

H. Subthreshold priming あるいは発火誘発のプライミング刺激を行った場合、テスト刺激に対する発火潜時を比較した。Data summarized from 10 neurons in 3 mice (4–11 trials per cell).  $*P = 2.2 \times 10^{-2}$ ,  $t_9 = 2.76$ , paired  $t$ -test.

I. 同じ強度の電流注入が異なる発火数を引き起こした場合、発火数ごとにその後の発火潜時をまとめて示した。プライミング刺激に対して発火数が多いほど、テスト刺激に対して発火潜時が短縮される傾向が見られた。Data summarized from 9 neurons in 3 mice (10 trials per cell).  $n = 11, 32, 37$ , and 10 trials for groups with 1, 2, 3, and 4 spikes, respectively.  $P$  values were determined by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test.  $**P = 1.5 \times 10^{-3}$  for group 1 versus 3;  $**P = 3.0 \times 10^{-3}$  for group 1 versus 4.  $P = 3.1 \times 10^{-4}$  as determined by the Kruskal-Wallis test.

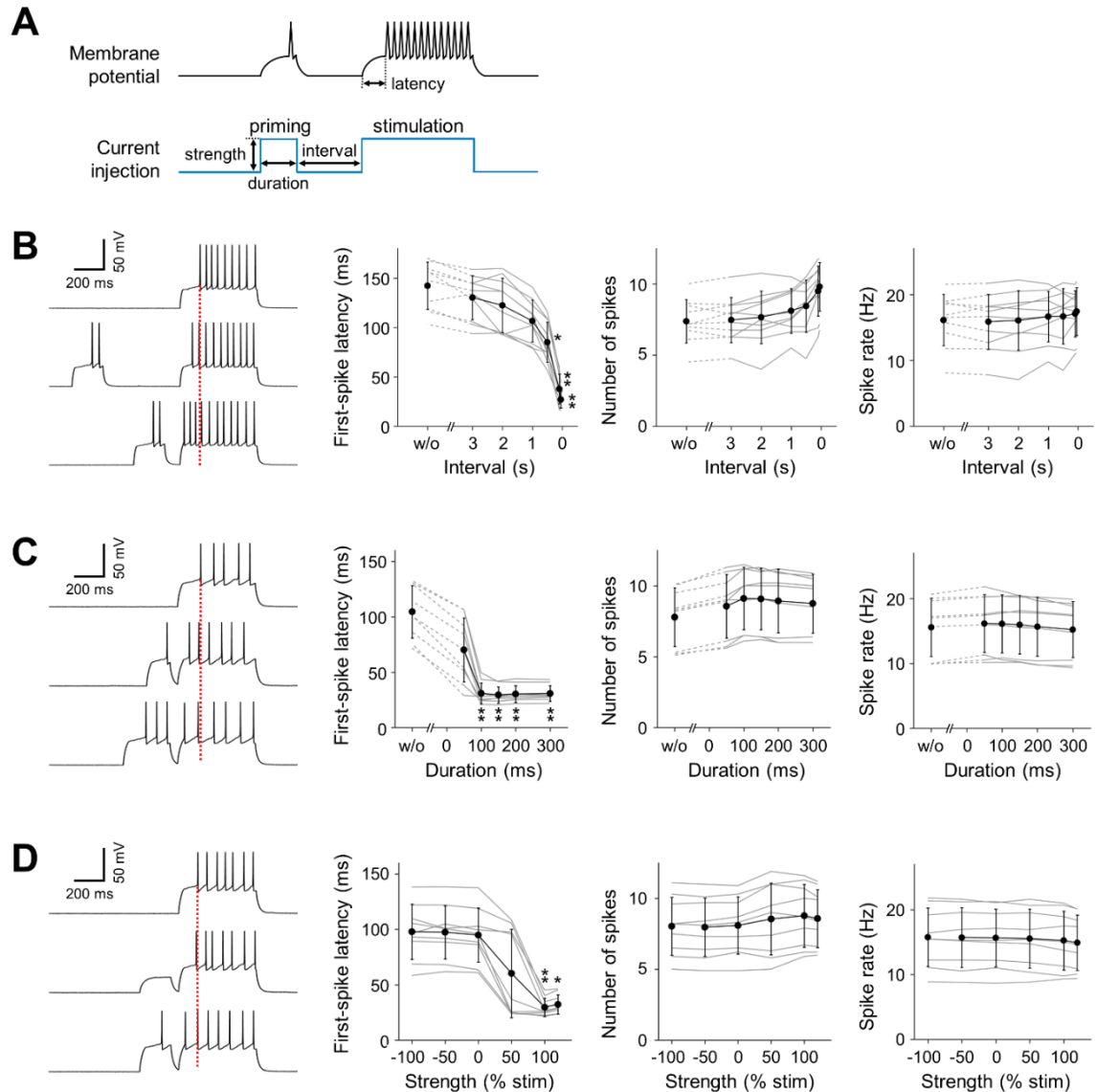


図2 gRSC 2/3 層神経細胞におけるプライミング効果の特性

A. 検証した 3 つのパラメータを示す概要図。一つのトライアルでは、神経細胞にテスト刺激（「stimulation」）を与える直前に、プライミング刺激として短い脱分極電流を予め注入した（「priming」）。特に指定のない限り、「間隔（interval）」、「持続時間（duration）」および「強度（strength）」の 3 つのパラメータを、それぞれ 50 ms、200 ms および 100% に設定した。各細胞における



注入電流の強度を、プライミング刺激によって 1 回の発火を誘発するように、それぞれ最適な値に調節した。

B. (左) プライミング刺激とテスト刺激との間隔を一連の値に設定した場合、gRSC 2/3 層神経細胞の膜応答の代表トレース。(左中) テスト刺激に対して、細胞が最初の発火を示すまでの潜時。(右中) テスト刺激期間中の細胞の発火数。(右) 細胞の発火率。Data presented as the mean  $\pm$  SD of 10 cells from 3 mice (4–11 trials per cell). The Kruskal-Wallis test was followed by Dunn's *post hoc* test.  $P = 9.7 \times 10^{-10}$  (middle left),  $1.3 \times 10^{-2}$  (middle right) and 0.97 (right), as determined by the Kruskal-Wallis test. The results of Dunn's test compared to the control (w/o priming trials) are indicated above the data points.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .

C-D. B と同様な解析を、プライミング刺激の持続時間 (C) あるいは強度 (D) を一連の値に設定した場合に行った。Data presented as the mean  $\pm$  SD of 9 cells from 4 mice (10 trials per cell).  $P = 1.6 \times 10^{-5}$  (middle left), 0.43 (middle right) and 0.84 (right) in (C);  $P = 6.2 \times 10^{-6}$  (middle left), 0.93 (middle right) and 0.99 (right) in (D). The results of Dunn's test compared to the control (in (C), w/o priming trials; in (D), trials with the priming current strength = 0) are indicated above the data points.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .

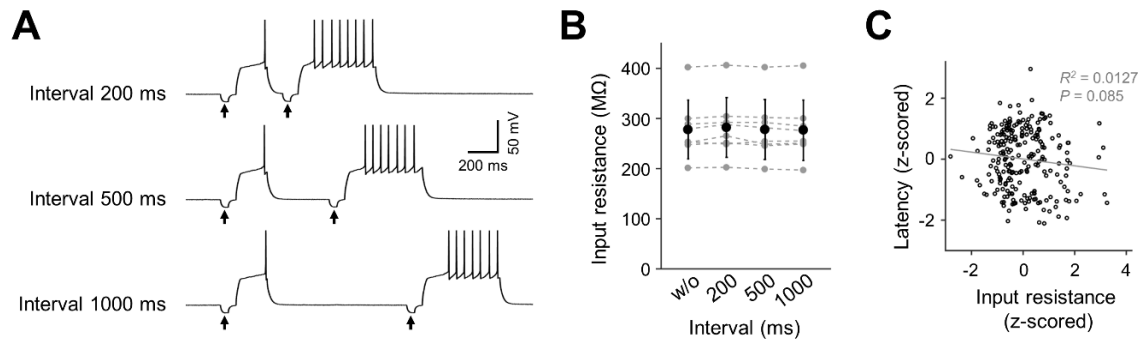


図3 プライミング刺激は gRSC 2/3 層神経細胞の膜抵抗に影響しない

A. プライミング刺激とテスト刺激との間隔が異なるとき（200、500 または 1000 ms）の膜電位応答の代表トレース。各脱分極電流を注入する 50 ms 直前、短い過分極電流（-50 pA, 持続時間が 50 ms）を注入し（黒い矢印）、細胞の膜抵抗を計測した。

B. プライミング刺激前の膜抵抗（w/o）と、それぞれの間隔の後に計測された膜抵抗を比較した。  $n = 8$  cells (4–6 trials in each interval for each cell).  $P$  values determined by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test.  $P = 0.96$ , as determined by the Kruskal-Wallis test.

C. 異なる間隔の後に計測された膜抵抗と、それに続く発火潜時をプロットした。膜抵抗と発火潜時との間で有意な相関が見られなかった。  $n = 8$  cells. The data were z-standardized with 24–36 data points from each cell.

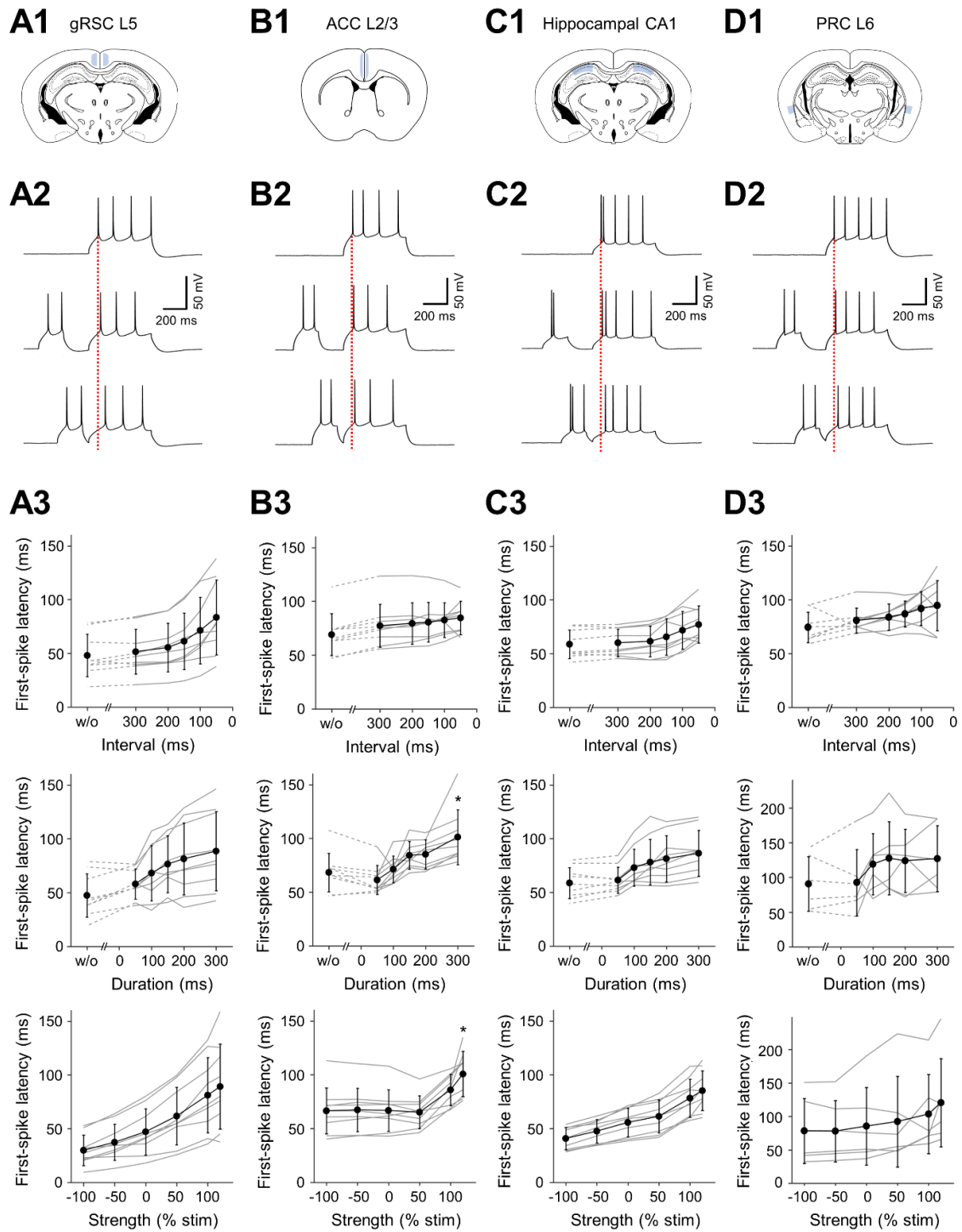


図4 様々な脳領域におけるプライミング効果の検証

A. gRSC 5 層の神経細胞において、発火潜時を様々な条件下で計測した。A1, 記録領域の位置を示す脳断面図。A2, プライミングなしのトライアル（上）お

よび刺激との間隔が 200 ms（中）、50 ms（下）のトライアルに対して、同じ記録細胞の応答の代表トレースを示した。赤い点線はプライミングなしのトライアルにおける最初の発火のタイミングを示す。A3, 二回の刺激の間隔（左）、プライミング刺激の持続時間（中）および強度（右）を一連の値に設定した場合、テスト刺激に対する gRSC 5 層神経細胞の発火潜時をプロットした。Data presented as the mean  $\pm$  SD of 9 cells from 6 mice (10 trials per cell). The Kruskal-Wallis test was followed by Dunn's *post hoc* test. The results of Dunn's test compared to the control (w/o priming trials) are indicated above the data points.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . The  $P$  values determined by the Kruskal-Wallis test were 0.11 (top),  $4.4 \times 10^{-2}$  (middle), and  $3.3 \times 10^{-4}$  (bottom).

B-D. A と同様なプロトコルを前帯状皮質（ACC）の 2/3 層（B）、海馬 CA1 野（C）および嗅周皮質（PRC）の 6 層（D）に対して実施し、各条件下における神経細胞の発火潜時をプロットした。Data presented as the mean  $\pm$  SD of 9 cells from 6 mice (10 trials per cell) in B and C. In B3, the  $P$  values determined by the Kruskal-Wallis test were 0.27 (top),  $1.2 \times 10^{-4}$  (middle), and  $9.1 \times 10^{-4}$  (bottom); in C3, the  $P$  values were 0.12 (top),  $2.2 \times 10^{-2}$  (middle) and  $7.3 \times 10^{-4}$  (bottom). In D, the data are presented as the mean  $\pm$  SD of 8 cells from 3 mice (top) or 6 cells from 2 mice (middle, bottom) (10 trials per cell). The  $P$  values were 0.15 (top), 0.42 (middle), and 0.58 (bottom) in D3.

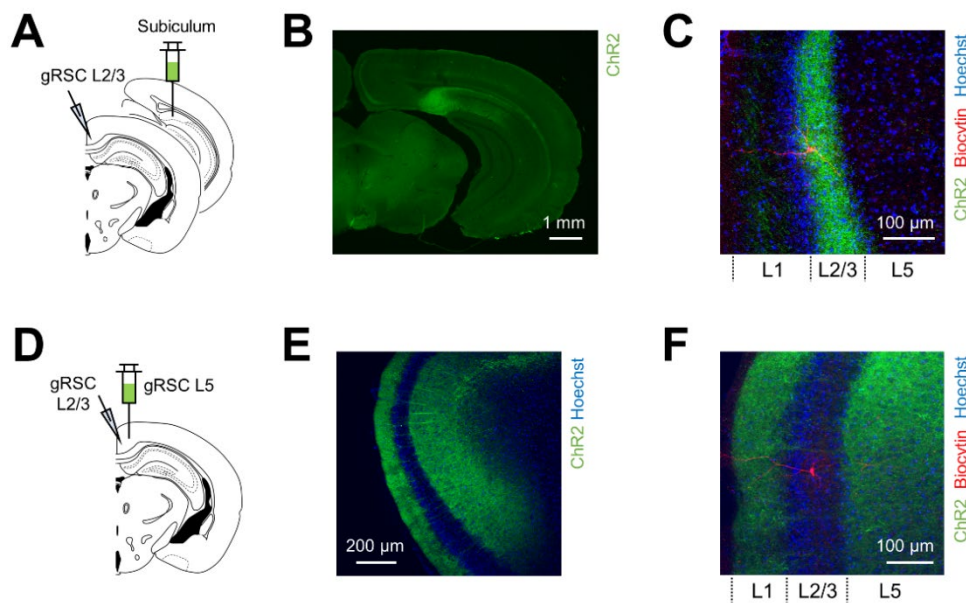


図5 上流脳領域（海馬支脚および gRSC 5 層）へのアデノ随伴ウイルスの導入、および gRSC 2/3 層神経細胞からのパッチクランプ記録

A. アデノ随伴ウイルス AAV5-CaMKII-ChR2-EYFP の導入部位（背側海馬支脚）およびパッチクランプ記録の位置（gRSC 2/3 層）を示す模式図。

B. ウイルス導入後、海馬支脚における ChR2-EYFP シグナルの代表写真。

C. gRSC における ChR2 発現の共焦点写真。gRSC 2/3 層に ChR2-EYFP シグナルが観察され（緑）、海馬支脚からの興奮性投射は gRSC 2/3 層に神経終末を持つことを示す。記録が行われた gRSC 2/3 層神経細胞は biocytin に基づいて可視化し（赤）、細胞核全般を Hoechst 33342 により染色した（青）。

D-F. A-C と同様。ただし、ウイルスの導入は gRSC 5 層に対して行った。この場合、gRSC では ChR2-EYFP シグナルが 5 層および 1 層に観察された。

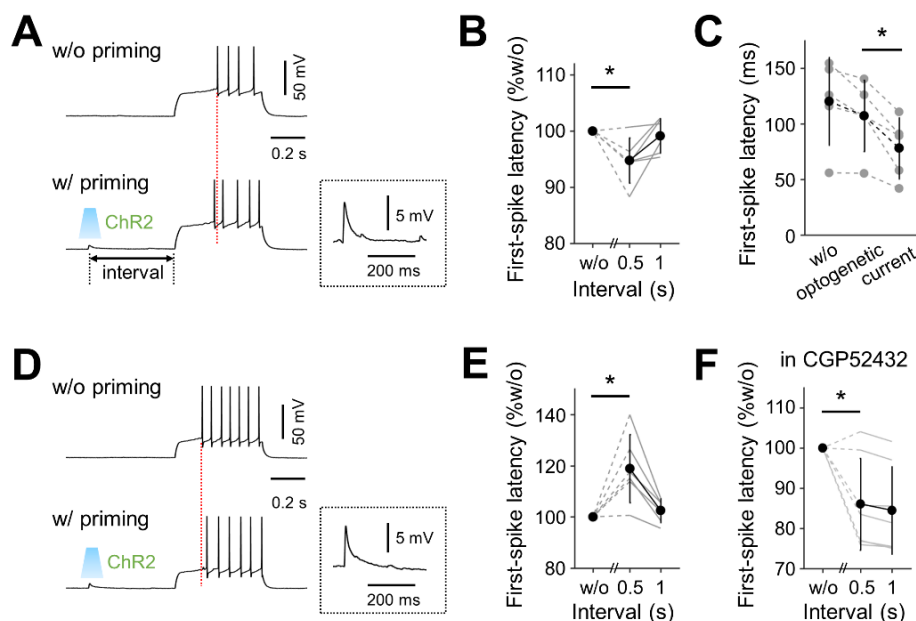


図6 プライミング刺激として海馬支脚あるいはgRSC 5層からの投射を光活性化すると、gRSC 2/3層神経細胞の発火潜時が調節される

A. プライミング刺激として2 msの青色光照射を用いて、海馬支脚から投射されるChR2発現の神経終末を予め光活性化させた。gRSC 2/3層神経細胞からパッチクランプ記録を行い、プライミングなしのトライアル（上）と、光照射によるプライミングを行ったトライアル（下）の代表トレースをそれぞれ示した。このトレースでは、光照射とテスト刺激との間隔が500 msである。光照射に誘発されたEPSPを拡大図で示した。

B. テスト刺激に対するgRSC 2/3層神経細胞の発火潜時を、プライミングなしの場合と、プライミング刺激とテスト刺激との間隔が500 msあるいは1 sの場合で計測した。各細胞において以上の三種のトライアルを交替で複数回を行い、プライミングなしの場合の平均潜時を100%とした。 $n = 6$  cells from 5 mice, 10–

14 trials for each interval.  $*P = 0.0241$ ,  $t_5 = -3.1971$ , paired  $t$ -test.

C. 発火潜時をプライミングなし (w/o)、光照射によるプライミング (optogenetic)、および電流注入 (持続時間 = 200 ms) によるプライミング (current) の場合で比較した。  $n = 5$  cells from 3 mice. Each type of priming was performed 4–8 trials for each cell.  $*P = 0.0104$ ,  $t_4 = 4.55$ , paired  $t$ -test.

D-E. A-B と同様。ただし、ウイルスの導入部位が gRSC 5 層であった。光照射とテスト刺激との間隔が 500 ms であるとき、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時がプライミングによって有意に延長された。  $n = 6$  cells from 4 mice in E, 6-10 trials for each interval.  $*P = 0.0174$ ,  $t_5 = 3.4938$ , paired  $t$ -test.

F. E と同様な実験を、GABA<sub>B</sub> 受容体アンタゴニストである CGP52432 を 10  $\mu$ M で灌流しながら行った。  $n = 7$  cells from 5 mice, 10-11 trials for each interval.  $*P = 1.8 \times 10^{-2}$ ,  $t_6 = -3.23$ , paired  $t$ -test.

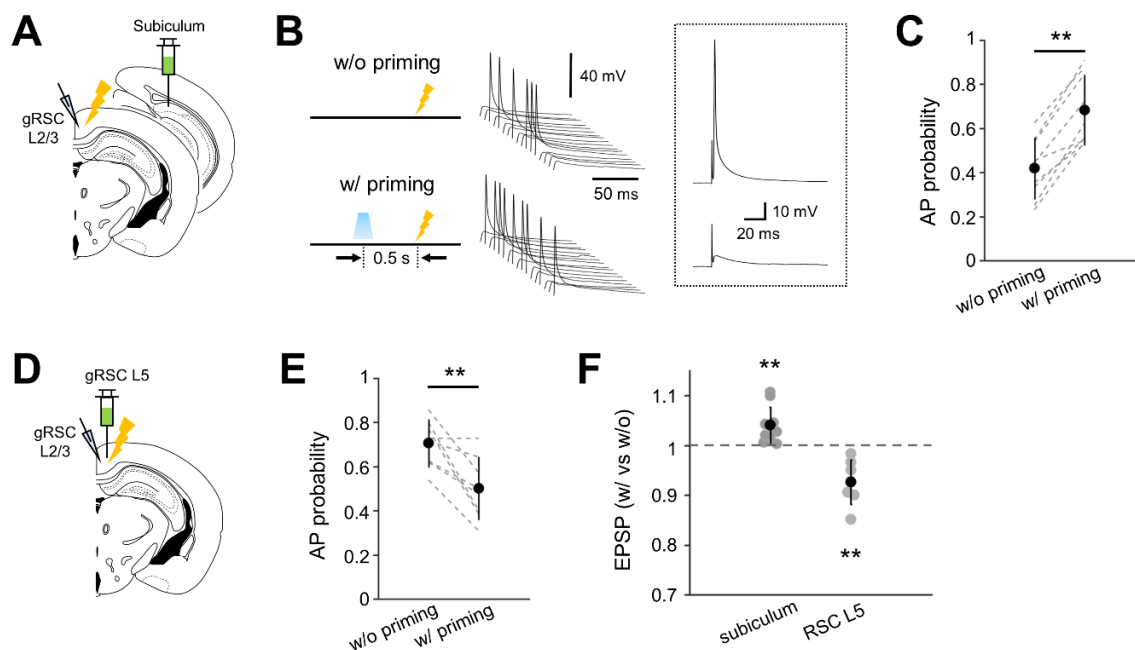


図 7 プライミング刺激として海馬支脚からの投射を光活性化すると、gRSC 2/3 層神経細胞の発火確率と EPSP 振幅が上昇する

A. AAV5-CaMKII-ChR2-EYFP の導入部位（背側海馬支脚）、パッチクランプ記録の位置（gRSC 2/3 層）および細胞外刺激電極の位置（gRSC 2/3 層よりやや深層）を示す模式図。

B. （左）プライミングなし（上段）とプライミングあり（下段）のトライアルを説明する模式図。プライミングありのトライアルでは、2 ms の光照射を行って 500 ms 後に、テスト刺激として、細胞外刺激電極によって電気刺激を与えた。（右）それぞれのトライアルを同じ記録細胞で交互に行った際、電気刺激に対する細胞の応答の代表例（17 トライアルずつ）。挿入図では、同じ強度の電気刺激に対して、細胞が活動電位を示すとき（上段）および EPSP のみを示すとき（下段）の代表トレースを示した。



C. 二種のトライアルにおいて、記録された gRSC 2/3 層神経細胞の発火確率を比較した。Data summarized from 11–18 w/o and w/ priming trials for 9 cells in 7 mice.

$**P = 2.3 \times 10^{-5}$ ,  $t_8 = 8.71$ , paired *t*-test.

D-E. A、Cと同様。ただし、ウイルスの導入部位がgRSC 5層であった。 $n = 10$ –21 trials for 8 cells from 6 mice.  $**P = 5.2 \times 10^{-3}$ ,  $t_7 = 3.99$ , paired *t*-test.

F. gRSC 2/3 層神経細胞において EPSP のみを引き起こすように、電気刺激の強度を低下させた。プライミング刺激として海馬支脚あるいはgRSC 5層からの投射を光活性化させ、プライミングなしの場合に対する EPSP 振幅の相対比を示した。Data obtained from 10 and 7 neurons in 8 and 5 mice injected with AAV into the subiculum and the gRSC L5, respectively (10–15 and 8–12 trials each). The error bars represent the SDs.  $**P < 0.001$  *versus* 1, bootstrap test for means.

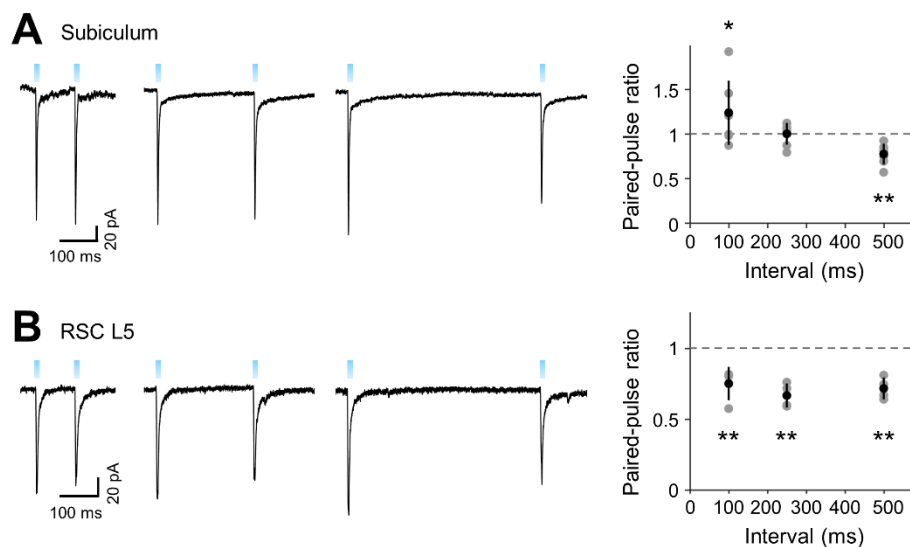


図 8 光照射の二発刺激 (paired-pulse) がシナプスの促通 (facilitation) を誘発しない

A. (左) 海馬支脚に AAV5-CaMKII-ChR2-EYFP を導入したマウスから作製された脳切片を用いて、二発の青色光のパルス照射を 100、250 または 500 ms の間隔で与えた。gRSC 2/3 層神経細胞からパッチクランプ記録を行い、光照射による EPSC を計測した。(右) 各間隔のトライアルから得た paired pulse ratio をプロットした。n = 7 cells in 4 mice. \* $P = 0.011$  versus 1 for 100 ms,  $P = 0.47$  for 250 ms and \*\* $P < 0.001$  for 500 ms, bootstrap test for means.

B. A と同様。ただし、ウイルスを gRSC 5 層に導入したマウスから脳切片を作製した。n = 4 cells in 2 mice. \*\* $P < 0.001$  for 100, 250, and 500 ms.

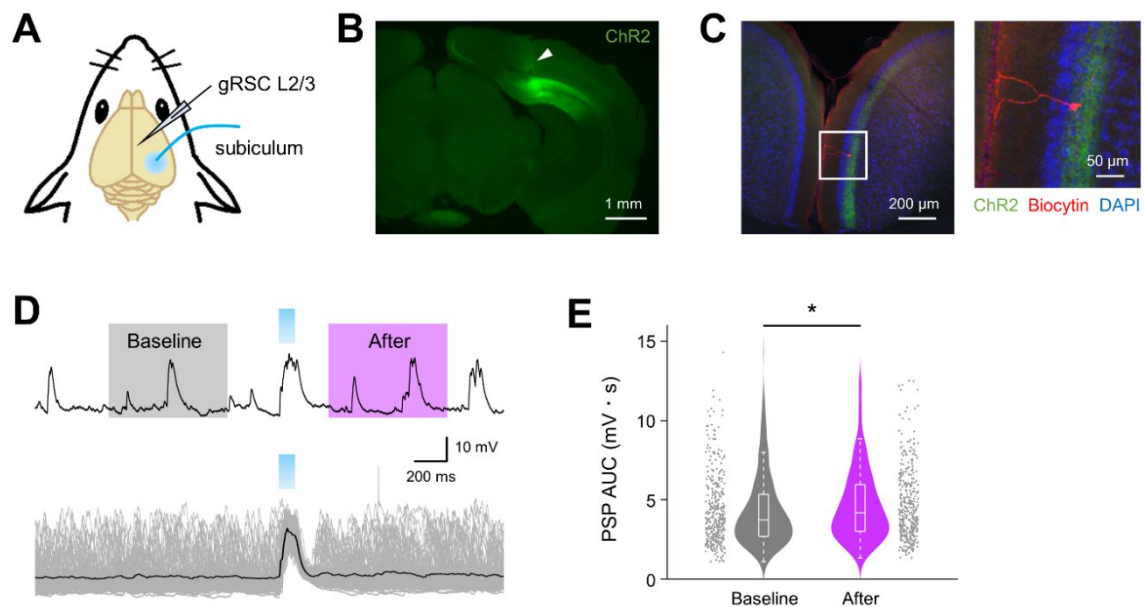


図 9 海馬支脚の投射の活性化は、*in vivo* で gRSC 2/3 層神経細胞のシナプス後電位を高める

A. *In vivo* 実験の模式図。マウスの海馬支脚に AAV5-CaMKII-ChR2-EYFP を導入し、実験時に光ファイバーを導入部位に埋め込んで青色光照射を与えた。その同時に gRSC 2/3 層の神経細胞からパッチクランプ記録を行った。

B. 海馬支脚を含む脳切片における ChR2-EYFP のシグナル（緑）および光ファイバーの痕跡（白い矢じり）を示した共焦点写真。

C. B と同じマウスにおいて、記録細胞を biocytin に基づいて可視化し、その共焦点写真（左）および拡大図（右）を示した。細胞核全般を DAPI により染色した（青）。

D. （上段）gRSC 2/3 層神経細胞の膜電位が、海馬支脚に対する青色光照射（100 ms）により一過的に上昇し、その代表トレースを示した。光照射の前後からそれぞれ 700 ms の期間を抽出し、シナプス後電位（PSP）の曲線下面積

(AUC) を計測した。照射の開始時刻に対して、-1.0 s から-0.3 s までを **baseline**、+0.3 s から+1.0 s までを **after** とした。（下段）青色光照射を複数回行った際、一つの gRSC 2/3 神経細胞から記録された膜電位変化（計 120 回）。各回の膜電位を灰色、全体の平均膜電位を黒色で示した。

E. 光照射の前後における AUC の比較。  $n = 380$  trials from 5 cells (5–135 trials each) in 5 mice.  $*P = 3.4 \times 10^{-2}$ ,  $t_{758} = 2.12$ , Student's  $t$ -test.

## 6. 参考文献

- Alexander AS, Nitz DA. 2015. Retrosplenial cortex maps the conjunction of internal and external spaces. *Nat Neurosci.* 18:1143-1151.
- Alexander AS, Nitz DA. 2017. Spatially Periodic Activation Patterns of Retrosplenial Cortex Encode Route Sub-spaces and Distance Traveled. *Curr Biol.* 27:1551-1560.e1554.
- Brennan EKW, Sudhakar SK, Jedrasiak-Cape I, John TT, Ahmed OJ. 2020. Hyperexcitable Neurons Enable Precise and Persistent Information Encoding in the Superficial Retrosplenial Cortex. *Cell Rep.* 30:1598-1612.e1598.
- Cembrowski MS, Phillips MG, DiLisio SF, Shields BC, Winnubst J, Chandrashekar J, Bas E, Spruston N. 2018. Dissociable Structural and Functional Hippocampal Outputs via Distinct Subiculum Cell Classes. *Cell.* 173:1280-1292.e1218.
- Chase SM, Young ED. 2007. First-spike latency information in single neurons increases when referenced to population onset. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:5175-5180.
- Chen LL, Lin LH, Green EJ, Barnes CA, McNaughton BL. 1994. Head-direction cells in the rat posterior cortex. I. Anatomical distribution and behavioral modulation. *Exp Brain Res.* 101:8-23.
- Corcoran KA, Donnan MD, Tronson NC, Guzmán YF, Gao C, Jovasevic V, Guedea AL, Radulovic J. 2011. NMDA receptors in retrosplenial cortex are necessary for retrieval of recent and remote context fear memory. *J Neurosci.* 31:11655-11659.
- Czajkowski R, Jayaprakash B, Wiltgen B, Rogerson T, Guzman-Karlsson MC, Barth AL, Trachtenberg JT, Silva AJ. 2014. Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:8661-8666.
- Davidson TJ, Kloosterman F, Wilson MA. 2009. Hippocampal replay of extended experience. *Neuron.* 63:497-507.
- Funayama K, Minamisawa G, Matsumoto N, Ban H, Chan AW, Matsuki N, Murphy TH, Ikegaya Y. 2015. Neocortical rebound depolarization enhances visual perception. *PLoS Biol.* 13:e1002231.
- Gautrais J, Thorpe S. 1998. Rate coding versus temporal order coding: a theoretical

approach. *Biosystems*. 48:57-65.

Ha GE, Cheong E. 2017. Spike Frequency Adaptation in Neurons of the Central Nervous System. *Exp Neurobiol*. 26:179-185.

Hattori R, Danskin B, Babic Z, Mlynaryk N, Komiyama T. 2019. Area-Specificity and Plasticity of History-Dependent Value Coding During Learning. *Cell*. 177:1858-1872.e1815.

Huang WC, Xiao S, Huang F, Harfe BD, Jan YN, Jan LY. 2012. Calcium-activated chloride channels (CaCCs) regulate action potential and synaptic response in hippocampal neurons. *Neuron*. 74:179-192.

Isaacson JS, Scanziani M. 2011. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*. 72:231-243.

Ishikawa D, Matsumoto N, Sakaguchi T, Matsuki N, Ikegaya Y. 2014. Operant conditioning of synaptic and spiking activity patterns in single hippocampal neurons. *J Neurosci*. 34:5044-5053.

Keene CS, Bucci DJ. 2008. Contributions of the retrosplenial and posterior parietal cortices to cue-specific and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*. 122:89-97.

Kurotani T, Miyashita T, Wintzer M, Konishi T, Sakai K, Ichinohe N, Rockland KS. 2013. Pyramidal neurons in the superficial layers of rat retrosplenial cortex exhibit a late-spiking firing property. *Brain Struct Funct*. 218:239-254.

Mao D, Kandler S, McNaughton BL, Bonin V. 2017. Sparse orthogonal population representation of spatial context in the retrosplenial cortex. *Nat Commun*. 8:243.

Nitzan N, McKenzie S, Beed P, English DF, Oldani S, Tukker JJ, Buzsáki G, Schmitz D. 2020. Propagation of hippocampal ripples to the neocortex by way of a subiculum-retrosplenial pathway. *Nat Commun*. 11:1947.

Nixima K, Okanoya K, Ichinohe N, Kurotani T. 2017. Fast voltage-sensitive dye imaging of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat granular retrosplenial cortex. *J Neurophysiol*. 118:1784-1799.

Nixima K, Okanoya K, Kurotani T. 2013. Current source-density analysis of intracortical

circuit in the granular retrosplenial cortex of rats: a possible role in stimulus time buffering. *Neurosci Res.* 76:52-57.

Opalka AN, Huang WQ, Liu J, Liang H, Wang DV. 2020. Hippocampal Ripple Coordinates Retrosplenial Inhibitory Neurons during Slow-Wave Sleep. *Cell Rep.* 30:432-441.e433.

Rezazadeh S, Kurata HT, Claydon TW, Kehl SJ, Fedida D. 2007. An activation gating switch in Kv1.2 is localized to a threonine residue in the S2-S3 linker. *Biophys J.* 93:4173-4186.

Tamás G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J. 2003. Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science.* 299:1902-1905.

Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA. 2009. What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci.* 10:792-802.

Vann SD, Kristina Wilton LA, Muir JL, Aggleton JP. 2003. Testing the importance of the caudal retrosplenial cortex for spatial memory in rats. *Behav Brain Res.* 140:107-118.

Vocke K, Dauner K, Hahn A, Ulbrich A, Broecker J, Keller S, Frings S, Möhrle F. 2013. Calmodulin-dependent activation and inactivation of anoctamin calcium-gated chloride channels. *J Gen Physiol.* 142:381-404.

Yamawaki N, Corcoran KA, Guedea AL, Shepherd GMG, Radulovic J. 2019. Differential Contributions of Glutamatergic Hippocampal→Retrosplenial Cortical Projections to the Formation and Persistence of Context Memories. *Cereb Cortex.* 29:2728-2736.

Yamawaki N, Li X, Lambot L, Ren LY, Radulovic J, Shepherd GMG. 2019. Long-range inhibitory intersection of a retrosplenial thalamocortical circuit by apical tuft-targeting CA1 neurons. *Nat Neurosci.* 22:618-626.

## 7. 謝辞

本研究を行うにあたり、いつも親身にご指導・ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の池谷裕二 教授に、心よりお礼申し上げます。学部 4 年生として研究室に配属されて以来、研究において多くのことを教えてくれて、またいつも温かく励ましてくださいました。池谷先生に出会って、薬作で 6 年間の学生生活を過ごしたことは、とても幸運でした。

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、佐々木拓哉 特任准教授、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 准教授に心より感謝致します。

本研究を行うにあたり、*in vivo* 実験のデータを集めていただきました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 野口朝子さんに心より御礼を申し上げます。

池谷グループとして、本研究をあらゆる面からサポートしていただき、また多くの助言をいただきました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室卒業生 乗本裕明、坂口哲也、宮脇健行、阿部麗実、岩寄諭嗣、岡田真実、岡本和樹、牧野健一、大内彩子、渡邊裕亮 各氏に心より御礼を申し上げます。特にパ



ツチクランプ法を習得していた際、岡本さんから多くのご指導や励ましの言葉を頂き、大変感謝しております。

池谷グループとして、本研究をあらゆる面からサポートしていただき、また多くの助言を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 野口朝子、八幡洋輔、佐藤元重、佐藤由宇、鹿島哲彦、宗宮聡、水野博之 各氏に心より御礼を申し上げます。後輩の皆さまの更なるご活躍を心よりお祈り申し上げます。

日々共に過ごし、支えてくれた東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室の同期、先輩、後輩の皆様に心より御礼を申し上げます。席が隣の周至文さんがよく話し相手をしてくださり、研究に関して多くの助言を賜りました。大変ありがとうございました。

最後に、研究生活に理解を示し、私を支え続けてくれた大切な家族と友人に謹んで感謝の意を表します。コロナという大変な時期、家族と会えない日々が続きますが、いつも温かく見守ってくれて本当にありがとうございました。

以上のすべての方々に、謹んで感謝の意を表し、本博士論文の結びといたします。