HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	記憶に関連する神経集団活動の動態［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	平野, 匡佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第15798号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92572
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kyosuke_Hirano_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士（臨床薬学）　氏　名　平野　匡佑

学 位 論 文 題 名

記憶に関連する神経集団活動の動態

【序論】

記憶は複数の神経細胞の活動パターンによって脳内で表現される。このことから、記憶の神経メカニズムを理解するため、さらには神経・精神疾患治療薬の作用機序を理解するためには、多数の神経細胞による神経集団活動を 1 細胞の解像度で明らかにする必要がある。本研究では第一に、ヒスタミン H_3 受容体(H_3R)拮抗薬・逆作動薬 Pitolisant が嗅周皮質（perirhinal cortex ： PRh）の神経集団活動をどのように調節するかを調べた。脳内のヒスタミンは記憶・学習に関与し、H_3R 拮抗薬・逆作動薬は PRh のヒスタミン放出を促進することで、記憶想起を回復させる。しかしヒスタミンや H_3R 受容体拮抗薬・逆作動薬が in vivo で神経活動をどのように調節するかについての理解は不十分だった。そこで、複数の神経細胞の活動を同時に取得できる Ca^{2+}イメージング法を用いて、Pitolisant 投与時の PRh 神経活動を in vivo で明らかにすることとした。第二に、内側膝状体（the medial geniculate body:MG）と外側扁桃体（lateral amygdala:LA）における神経集団活動が音と報酬の条件づけに伴ってどのように変化するかを調べた。MG 内、LA 内それぞれの神経集団活動は条件づけによって変化する。MG から LA への情報伝達が条件づけに関わることから、MG と LA の 2 領域における協調した神経集団活動の変化が条件づけに重要であると考えられるが、これまで技術的に検証することができなかった。そこで、MG と LA の多数の細胞から同時に活動を取得できる Ca^{2+}イメージング法を確立し、学習に関連する MG および LA での神経集団活動の関係性の変化を明らかにすることとした。

【方法と結果】

1.　H_3R 拮抗薬・逆作動薬 Pitolisant 投与時の PRh 神経集団活動の調節機構

蛍光カルシウムセンサーGCaMP6m を発現させるアデノ随伴ウイルス（AAV）をマウスの PRh に注入し、その上部に極細のレンズ（GRIN lens）を埋め込んだ。待機期間の後、生理食塩水および Pitolisant 投与前後の GCaMP6m の蛍光変化を取得した。得られた GCaMP6m の蛍光変化を神経活動に変換し、各薬物投与前後の神経細胞の活動変化を比較した。いずれかの薬物投与後に活動が上昇した細胞を Excited、活動が低下した細胞を Inhibited、薬物投与前後で活動に差が無かった細胞を Stable と定義してその存在比を各薬物投与時で比較した結果、その存在比に差が無かった。しかし、投与前後の各神経細胞の活動の変動をスコア化して比較した結果、Pitolisant 投与時は生理食塩水投与時と比較して Excited と Inhibited の活動の変動が大きかった。さらに神経活動を活動の頻度と 1 回あたりの活動の大きさに分けてそれぞれスコア化して比較した結果、Pitolisant 投与時は生理食塩水投与時と比較して Excited と Inhibited の活動の頻度が変動することが明らかになった。

記憶想起には神経細胞の同期的な活動が重要であることから、2 つの神経細胞の活動の類似度を算出できる相互相関関数を用いて、同期する神経細胞ペアを同定した。各薬物投与後に同期した神経細胞ペアの存在割合を比較した結果、Pitolisant 投与後の Excited において同

期する神経細胞ペアの割合が大きかった。

Pitolisant 投与によって PRh 神経集団活動が変化するかを明らかにするために、薬物投与前後の神経集団活動を機械学習によって判別した。Pitolisant 投与前後の神経集団活動は生理食塩水投与前後の活動と比較して精度良く判別できた。Excited、Inhibited、Stable それぞれの細胞集団群が判別に与える影響を明らかにするために、各神経細胞群を除いた場合の成績も比較したところ、Excited または Inhibited を除いた場合は判別の精度の差が消失した。しかし、Stable を除いた場合ではこのような現象は見られなかった。一連の結果から、Pitolisant は PRh 神経細胞全体の活動パターンを変化させ、一部の神経細胞の活動を上昇または低下させるとともに活動が上昇する神経細胞の同期を促進することが明らかになった。このようなメカニズムが記憶に関連する可能性が考えられる。

2. 連合学習における MG と LA の細胞集団活動の動態変化

聴覚情報を処理する MG と、情動の中枢である LA、それぞれの領域に GCaMP6m を発現させる AAV を注入し、それらの上部に GRIN lens を埋め込んだ。その後、CS1 と CS2、2 つの音をそれぞれ 2 秒間提示し、CS1 提示後に 10%スクロース水溶液（US1）を提示する音報酬条件づけを行い、条件づけ前後の神経活動を取得した。MG と LA は脳表面からの深さが異なるため、同時に焦点を合わせることができないが、電子式焦点調節レンズを用いて 2 つの焦点を高速で切り替えることで、2 領域の神経活動を擬似的に同時イメージングすることに成功した。

条件づけ前に各 CS または US1 を提示した結果、MG および LA の神経細胞は各刺激に対して様々な活動を示した。また、条件づけ前後の MG と LA の神経活動をそれぞれで比較した結果、CS1 提示時に活動が上昇または低下する神経細胞の存在割合は条件づけの前後で変化しないことが明らかになった。

条件づけ前後で各領域内および領域間の神経細胞の相関が変化するかどうかを明らかにするために、各神経細胞ペアの相関係数を算出してその分布を比較した。その結果、CS1 提示時の領域内および領域間神経細胞ペアの相関の分布は条件づけの前後で変化することが明らかになった。このような現象は CS2 提示時には確認されなかった。

条件づけを経ることで、各 CS 提示時の神経集団活動が変化するかを検証した。条件づけ前の神経集団活動を元に、条件づけ前後の神経集団活動がどちらの CS 提示時の活動かを機械学習により判別した。その結果、学習後の MG の神経集団活動の判別は学習前と比較して成績が低く、LA の場合も成績が低下する傾向が見られた。また、条件づけを経ることで、各 CS 提示時の全神経細胞ペアの相関が変化するかどうかも検証した。条件づけ前の全神経細胞ペアの相関を元に、条件づけ前後の全神経細胞ペアの相関がどちらの CS 提示時の相関かを機械学習で判別した。領域内神経細胞ペアの相関係数、領域間神経細胞ペア、いずれの場合においても学習後の相関係数の判別は学習前と比較して成績が低かった。一連の結果から、学習後は CS に対する神経集団の表現、全神経細胞ペアの相関が変化し、特に CS1 提示時の神経細胞ペアの相関の分布が変化することが明らかになった。このような領域内および領域間神経細胞の活動の変化が連合学習に重要である可能性が示唆される。

【総括】

本研究によって Pitolisant は PRh 神経集団活動を調節することが明らかになった。また、学習後は領域を跨いだ神経集団活動が変化することが明らかになった。以上のような細胞集団活動の変化が記憶のメカニズムに関与すると考えられる。