高い時空間分解能をもつ神経活動の操作・記録法の開発と脳領域間ネットワーク解析への応用

大阪公立大学大学院医学研究科　講師　宮脇 寛行

1. はじめに

ヒトを含む動物の脳はさまざまな刺激を受容し、「場所や時間といった状況の認識」や「嫌悪感や快感などの情動」などの生体にとって意味のある情報の抽出が並列的に行われる。次に、これらの並列的に処理された情報が統合されることで、認知・意思決定・記憶などの高次機能が実現されている[1][2]。動物は経験を記憶し、それに基づいて同じ環境に置かれた場合であっても行動を変化させる。このことは、各脳領域での情報処理と脳領域横断的な情報統合のいずれか、あるいは両方が経験依存的に変化していることを示唆している[3]。

これまで、多くの研究では、場所情報や情動など特定の情報について「その情報を処理している脳領域はどこか」あるいは「その情報は脳においてどのように表現されているか」という点に注力して進められてきた。その結果、脳では同時に活動する比較的少数のニューロン集団であるセル・アンサンブルの活動として情報が表現されていることが明らかにされてきた[4][5]。さらに、経験に応じてそれぞれの脳領域に存在するセル・アンサンブルの構成が変化することも報告されている[6][7]。これらは、経験に応じて個々の脳領域での情報処理様式が変化することを示唆している。

その一方、単一の記憶に関するセル・アンサンブルは複数の脳領域に存在しており[8]、経験に応じて異なる脳領域に存在するセル・アンサンブル間の同期活動が変化することが明らかにされている[9][10]。このことは、経験依存的に脳領域横断的な高次情報の統合様式が変化することを示唆している。

このように、記憶プロセスに応じて、個々の脳領域内の局所ネットワークと脳領域横断的な広域ネットワークの両方が変化することが示唆されている。しかし、これら異なる解剖学的スケールの変化の間にどのような関係があるのかについては不明な点が多い。そこで本研究では、脳領域横断的な同期活動を解析することで、局所ネットワークの動態と広域ネットワークの動態の関連を明らかにすることを目指した。さらに、脳領域間の情報伝達に選択的に介入するための技術開発を行った。

2. 材料と方法

本研究ではラット脳からの神経活動の記録とその解析を行った。実験は大阪市立大学・大阪公立大学動物実験委員会の承認を受け、アメリカ国立衛生研究所ガイドラインに従って行った。

2.1. 自由行動下ラットからの電気生理学記録

自由に行動しているラットの神経活動の解析には、既報のデータ[10]を用いた。概略を示すと、イソフルラン麻酔下で大脳皮質前頭前野、扁桃体基底外側核、腹側海馬 CA1 領域へそれぞれ 64ch シリコン製微小電極を留置した。術後回復期を経て、電極からのシグナルを約 17 時間にわたって連続記録し、記録中に恐怖条件付け学習課題、記憶想起ならびに消去学習課題、消去学習の保持課題を行った（Fig. 1）。

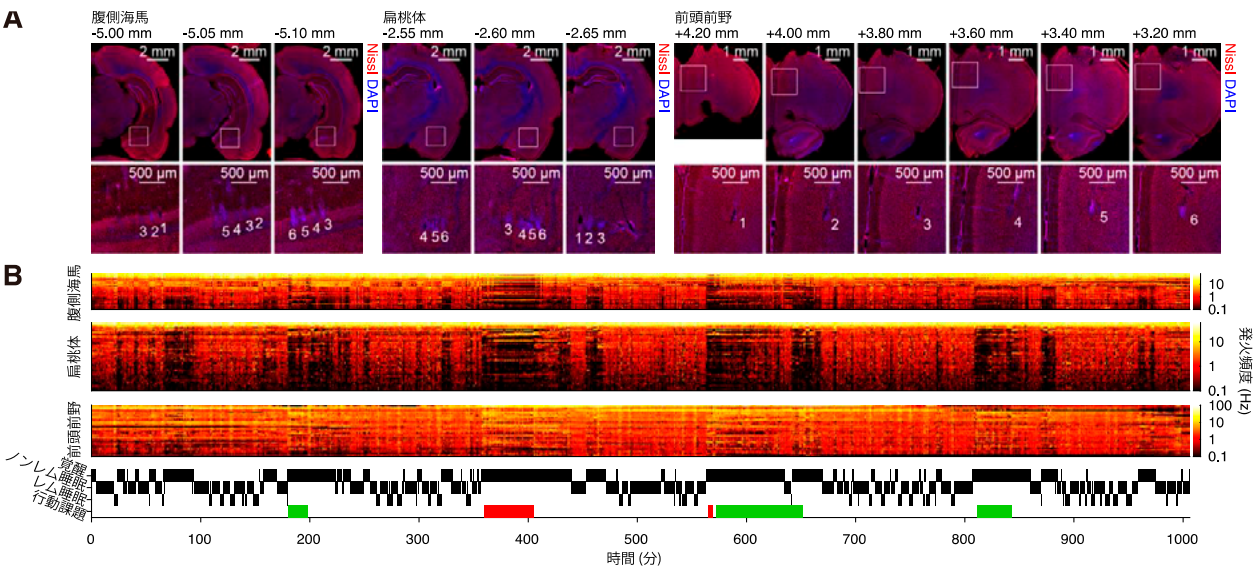

Fig. 1　3 領域同時・大規模電気生理学記録

（A）腹側海馬、扁桃体、前頭前野の記録電極の位置。（B）パネル A で示した電極から記録された神経活動（上）と、睡眠・覚醒状態の履歴（下）。行動課題を行っているタイミングを緑および赤の帯で示した。クリエイティブ・コモンズ・ライセンス 4.0(CC-BY)のもと、文献[10]より改変。

2.2. 麻酔下ラットからの電気生理学記録

イソフルラン麻酔下でアデノ随伴ウイルス・ベクター（AAV）を腹側海馬 CA1 領域に接種し、抑制性オプシンである JAWS[11]を発現させた。その後 3 ～ 4 週間の発現期間を経て、ウレタン麻酔下で赤色レーザーダイオードに光ファイバーをカップリングさせたものを貼り付けたシリコン製微小電極を腹側海馬ならびに前頭前野へと刺入し、自発発火の測定ならびに光刺激による自発発火の抑制を検証した。

2.3. データ解析

各脳領域におけるセル・アンサンブルの同定ならびにセル・アンサンブルの脳領域横断的な同期活動の検出については、公開済みの MATLAB スクリプト[10]を用いた。その他の解析については、カスタムメイドの Python スクリプトを用いて行った。

3. 結果と考察

3.1. 脳領域横断的な同期活動と各脳領域内の神経活動パターンの安定性の関係

まず、広域ネットワークの活動と、各脳領域内のセル・アンサンブルの動態との関連について、恐怖条件付け記憶の消去学習をモデルとして解析を行った。具体的には、腹側海馬・扁桃体・大脳皮質前頭前野について個別に、消去学習時に活動するセル・アンサンブルを同定した。さらに、恐怖条件付け学習時や消去記憶の想起時についても同様にセル・アンサンブルを同定し、これらの類似性をコサイン類似度の絶対値によって評価した。その結果、恐怖条件付け学習時から消去学習の想起課題まで保持されているセル・アンサンブルが存在する一方で、消去学習後に消失するものや、消去学習によって新たに出現するセル・アンサンブルも存在していた。このようなセル・アンサンブル動態の多様性は今回解析したすべ

ての領域において認められた。

哺乳類の睡眠はレム（REM: rapid eye movement）睡眠とノンレム睡眠という２つの状態に大別され、ノンレム睡眠中はセル・アンサンブルの脳領域横断的な同期活動が経験依存的に生じることが知られている[10]。そこで、各脳領域で消去学習中に同定されたセル・アンサンブルについて、ノンレム睡眠中に見られる脳領域横断的な同期活動を解析した。その結果、脳領域横断的に同期して活動するセル・アンサンブルのペアの数は学習前後で変化しないものの、同期活動を示すセル・アンサンブルのうち約４分の１において、学習前後で同期するパートナーが変化していることが明らかとなった。さらに、消去学習の想起時まで保持されていたセル・アンサンブルの割合は、脳領域横断的な同期活動に関与するアンサンブルのほうが関与しないものより高いことが判明した。

ノンレム睡眠中にはしばしばニューロン集団の同期した活動が生じ、これを反映して脳波上に高周波数オシレーションが観察される[12]。興味深いことに、脳領域横断的な同期活動に関与し消去学習の想起時まで保持されるセル・アンサンブルは、それ以外のセル・アンサンブルに比べて脳波の高周波数オシレーションの際に活動する頻度が高い傾向が認められた。睡眠時の高周波数オシレーションは睡眠による記憶の定着に関与すると考えられている[13][14]。このことを踏まえると、これらの結果は、脳波の高周波数オシレーションが生じる際の脳領域横断的なネットワークが、各脳領域のセル・アンサンブルを安定化させることで記憶の定着に寄与している可能性を示唆している。

3.2. ニューロンの睡眠状態選好性と広域ネットワーク活動の関係

前節でも述べた通り、哺乳類の睡眠はレム睡眠とノンレム睡眠という２つの状態に大別される。これら２つの睡眠状態ではニューロンの活動も異なっており、その結果として異なる脳波パターンが観察される。しかし、睡眠状態によるニューロンの活動変化が細胞間でどの程度まで多様であるのかは不明であった。そこでまず、海馬、扁桃体、前頭前野から記録された個々のニューロンについて、それぞれの細胞が睡眠状態に応じて発火活動をどのように変化させるかを解析した。その結果、いずれの脳領域においても半数以上のニューロンがレム睡眠の間により高い活動を示す一方で、20~30%程度のニューロンはノンレム睡眠中により高い活動を示すことが明らかとなった[15]。

次に、レム睡眠選好性ニューロンとノンレム睡眠選好性ニューロンそれぞれについて、高周波数オシレーションによる活動制御を比較した。その結果、高周波数オシレーションが生じる際のニューロン活動の増加率が異なることが明らかとなった[15]。さらに、高周波数オシレーションが生じている際の活動の同期性の強さを脳領域横断的なニューロン・ペアについて解析した結果、同じ睡眠状態選好性を示すニューロン同士のペアの方が、異なる睡眠状態選好性を示すニューロンのペアよりも強い同期性を示すことを見出した[15]。これらのことから、ニューロンの同期活動は睡眠状態による活動制御と関連しており、それぞれが部分的に交わりながらも異なるネットワークを形成していることが示唆される。

さらに興味深いことに、強い情動をともなう経験の際には上述の関係が一時的に逆転し、異なる睡眠選好性を示すニューロンのペアの方が同じ

睡眠選好性を示すニューロンのペアよりも強い同期性を示すことが観察された[15]。このことは、ゆるやかに分離されているネットワーク間の同期活動が一時的に増強されることが、記憶情報の獲得に重要な役割を担っている可能性を示唆している。

3.3. 広域ネットワーク活動への介入手法の開発

前節までに述べてきた結果はいずれも神経活動の観測に基づく相関関係をベースとした解析である。脳領域横断的な同期活動のもつ機能的意義をより明確に検証するためには、神経活動への介入、とくに脳領域横断的な広域ネットワークへの介入を行う必要がある。そこで、シリコン製多点電極を用いた電気生理学的記録と光遺伝学的手法による神経活動操作を組み合わせ、特定のタイミングで神経活動を選択的に抑制できる実験系を構築した。具体的には、まず AAV を用いて抑制性オプシンである JAWS[11]を腹側海馬に導入した（Fig. 2 A）。次に、シリコン製多点電極に光ファイバーを貼り付けることで記録部位への光照射を可能にした電極を腹側海馬に留置した。これにより、多数の神経細胞の活動の記録と操作を同時に行うことが可能となった（Fig. 2 B）。

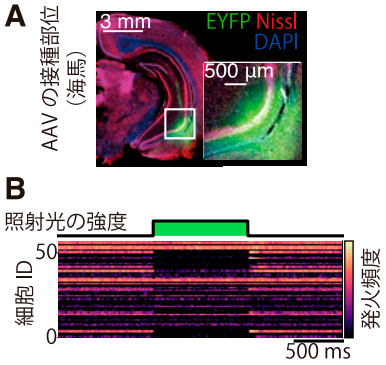

Fig. 2 神経活動への介入とその結果の実測（A）AAV を用い腹側海馬に JAWS を導入した例。（B）パネル A で示した個体において、光照射による自発発火抑制の例。

今回の検証は麻酔下動物を用いたものであるが、同様の手法は自由に行動している動物にも適用可能である。この手法を、これまで確立してきた自由行動動物からの大規模電気生理学記録と組み合わせることで、脳領域横断的な同期活動と広域ネットワーク変化の関係をより詳細に検討できると考えられる。

4. 結論と展望

本研究により、広域ネットワークの活動が個々の脳領域の局所ネットワークの活動に影響している可能性が明らかとなった。また、個々のニューロンの睡眠選好性の違いが広域ネットワーク活動にも影響している可能性を示唆する結果も得られた。これらは、解剖学的に異なるスケールの活動が互いに影響し合うことで、脳の複雑な情報処理が実現されていることを示唆している。

また、特定の脳領域の活動を特定のタイミングで制御し、その神経活動への影響を直接計測する手法を確立することにも成功した。今後は、この手法を用いることで、異なる解剖学的スケールの間にある相関関係を崩し、その影響を評価することによって広域ネットワークと局所ネットワークの動態がどのように制御され、脳機能が実現されているのかを明らかにしていきたい。

5. 参考文献

[1] Mesulam, M.M.;From sensation to cognition. Brain, **121**, (1998), 1013-1052.

[2] Miller, E.K. & Cohen, J.D.;An integrative theory of prefrontal cortex function. Annu. Rev. Neurosci., **24**, (2001), 167-202.

[3] Buonomano, D.V. & Merzenich, M.M.; Cortical plasticity: from synapses to maps. Annu. Rev. Neurosci., **21**, (1998), 149-186.

[4] Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K. & Tonegawa, S.;Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. Nature, **484**, (2012), 381-385.

[5] Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S. & Redondo, R.;Memory Engram Cells Have Come of Age. Neuron, **87**, (2015), 918-931.

[6] Maboudi, K., Giri, B., Miyawaki, H., Kemere, C. & Diba, K.;Retuning of hippocampal representations during sleep. Nature, **629**, (2024), 630-638.

[7] Ghandour, K., Ohkawa, N., Fung, C.C.A., Asai, H., Saitoh, Y., Takekawa, T., Okubo-Suzuki, R., Soya, S., Nishizono, H., Matsuo, M., Osanai, M., Sato, M., Ohkura, M., Nakai, J., Hayashi, Y., Sakurai, T., Kitamura, T., Fukai, T. & Inokuchi, K.;Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram. Nat. Commun., **10**, (2019), 2637.

[8] Roy, D.S., Park, Y.G., Kim, M.E., Zhang, Y., Ogawa, S.K., DiNapoli, N., Gu, X., Cho, J.H., Choi, H., Kamentsky, L., Martin, J., Mosto, O., Aida, T., Chung, K. & Tonegawa, S.;Brain-wide mapping reveals that engrams for a single memory are distributed across multiple brain regions. Nat. Commun., **13**, (2022), 1799.

[9] Mizuseki, K. & Miyawaki, H.;Fast network oscillations during non-REM sleep support memory consolidation. Neurosci. Res., **189**, (2023), 3-12.

[10] Miyawaki, H. & Mizuseki, K.;De novo inter-regional coactivations of preconfigured local ensembles support memory. Nat. Commun., **13**, (2022), 1272.

[11] Chuong, A.S., Miri, M.L., Busskamp, V., Matthews, G.A., Acker, L.C., Sorensen, A.T., Young, A., Klapoetke, N.C., Henninger, M.A., Kodandaramaiah, S.B., Ogawa, M., Ramanlal, S.B., Bandler, R.C., Allen, B.D., Forest, C.R., Chow, B.Y., Han, X., Lin, Y., Tye, K.M., Roska, B., Cardin, J.A. & Boyden, E.S.;Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. Nat. Neurosci., **17**, (2014), 1123-1129.

[12] Buzsáki, G.;Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. Hippocampus, **25**, (2015), 1073-1188.

[13] Klinzing, J.G., Niethard, N. & Born, J.;Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. Nat. Neurosci., **22**, (2019), 1598-1610.

[14] Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsáki, G. & Zugaro, M.B.;Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. Nat. Neurosci., **12**, (2009), 1222-1223.

[15] Kajiya, R., Miyawaki, H., Nakahara, H. & Mizuseki, K.;Firing Activities of REM- and NREM-Preferring Neurons Are Differently Modulated by Fast Network Oscillations and Behavior in the Hippocampus, Prelimbic Cortex, and Amygdala. eNeuro, **12**, (2025), 10.1523/ENEURO.0575-24.2025.

6. その他成果発表等

- Miyawaki H. “Neuronal activity patterns during sleep shape those in subsequent wakefulness” APPW2025, Makuhari, Japan, Mar. 18th, 2025.

- Kajiya R., Miyawaki H. & Mizuseki K. “NREM- and REM-preferring cells in the limbic system and prelimbic cortex are differently modulated by fast network oscillations and behaviors.” The 47th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Fukuoka, Japan, Jul 26th, 2024.
- Miyawaki H. & Mizuseki K. “Inter-regional coactivation during fast network oscillations stabilizes local ensembles during sleep following fear extinction learning.” The 47th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Fukuoka, Japan, Jul 25th, 2024.
- Kajiya R., Miyawaki H. & Mizuseki K. “Neural activity dynamics of NREM- and REM-preferring cells in the limbic system and prelimbic cortex.”, The 48th Annual Meeting of Japanese Society of Sleep Research, Yokohama, Japan, Jul 18th, 2024.
- Kajiya, R., Miyawaki, H., Nakahara, H. & Mizuseki, K.;Firing Activities of REM- and NREM-Preferring Neurons Are Differently Modulated by Fast Network Oscillations and Behavior in the Hippocampus, Prelimbic Cortex, and Amygdala. eNeuro, **12**, (2025), 10.1523/ENEURO.0575-24.2025.

7. 謝辞

本研究は大阪公立大学大学院医学研究科神経生理学教室（水関研究室）で行われました。本研究の推進にあたり、ご指導ご鞭撻をいただいた水関健司教授に深く感謝いたします。睡眠状態選好性の解析についてご尽力いただいた鍛治谷里咲大学院生に深く感謝いたします。事務作業をはじめ多岐にわたりご支援いただいた荒巻知子研究補助員に感謝いたします。また、折りに触れ議論いただき、研究推進を支えていただいた水関研究室のメンバー各位に感謝いたします。本研究は島津科学技術振興財団の助成金を受けて行われました。温かいご支援をいただいた島津科学技術振興財団ならびに関係各位に深く感謝いたします。