

氏名 かねど あでる あぶでる らまん がんどうる
Khaled Adel Abd El-Rahman Ghandour

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富生命博甲第 106 号

学位授与年月日 平成 31 年 3 月 26 日

専攻名 認知・情動脳科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

学位論文題目 Orchestrated Ensemble Activities Constitute a
Hippocampal Memory Engram
(アンサンブル活動の編成によって海馬記憶痕跡は構成される)

論文審査委員
(主査) 教授 西条 寿夫
(副査) 教授 田村 了以
(副査) 教授 鈴木 道雄
(副査) 教授 黒田 敏

指導教員 教授 井ノ口 馨

【学位論文内容の要旨】

〔目的〕

The brain is capable of storing and recalling memories through a set of cells, termed engram cells, which are activated during experience. Activity in these cells corresponds to a specific event, ensuring recovery of that particular experience. However, it is unclear how these cells are organized to form the engram, mainly because of technical limitations that have made it difficult to identify both engram and non-engram cells during in vivo recording/imaging.

〔方法並びに成績〕

Here, we show that contextual memory in the hippocampus is represented as distinct subsets of synchronous activity (defined by Ca^{2+} transients) that comprise several ensembles of engram cells. In contrast to non-engram cells, these ensembles maintain their activity not only during learning but also during post-learning sleep and retrieval sessions. We developed an imaging system with a miniature head-mounted fluorescent microscope with which we identified engram cells using the photoconvertible fluorescent protein Kikume Green Red (KikGR) and the c-fos-tet-tag system. We observed neuronal activity in the CA1 hippocampal area via Ca^{2+} influx and G-CaMP7. Engram cells exhibited repetitive activity, characterized by remarkable synchrony, upon exposure to a novel context. Population vector distance (PVD) analysis revealed that the activity pattern of engram cells was stable not only during learning but also across sleep and retrieval sessions. Furthermore, non-negative matrix factorization (NMF) analysis detected several engram-cell ensembles comprising collectively active neurons whose activities were repeated during encoding, sleep (NREM and REM), and re-exposure sessions; however, they were weaker in a different context.

〔総括〕

These findings demonstrate that contextual memory in the hippocampus is represented as distinct subsets of synchronous activity (defined by Ca^{2+} transients) that comprise several ensembles in engram cells. In contrast to non-engram cells, these ensembles maintain their activity not only during learning but also during post-learning sleep and retrieval sessions and suggest that subgroups of ensembles represent distinct pieces of information, which are

then orchestrated to form the entire contextual memory.

【論文審査の結果の要旨】

〔目的〕

脳において、記憶は学習時に活性化されるエンGRAM細胞と呼ばれる一群の神経細胞に保存される。これらエンGRAM細胞の活動は、記憶に関連した特定のイベントに対応しているとともに、イベント経験の想起と相関することが、神経活動の指標(活動マーカー)の観察により明らかにされている。また、光遺伝学を利用したエンGRAM細胞の人為的な活性化や活動抑制により、実際に記憶の想起を誘導したり阻害することが可能である。これらのことから、記憶の痕跡であるエンGRAM細胞は、イベント体験中の時間窓内に同期的に活動した神経細胞集団(セル・アンサンブル)であり、これらのセル・アンサンブル活動が記憶の固定化や想起に関与することが示唆される。しかし、技術的障壁によりエンGRAM細胞に特有の活動をリアルタイムで観察する方法が無かったため、この仮説を実際に観察することで検証することはこれまで不可能であった。Ghandour 君は、これらの活動様式をエンGRAM細胞集団とそれ以外の細胞集団とを区別して学習時や学習後、そして記憶想起時にわたり観察できるシステムを構築し、実際のエンGRAM細胞集団における記憶情報の脳内での表現様式を検討した。

〔方法〕

Thy1-G-CaMP7 トランスジェニックマウスは、神経活動の指標である細胞内 Ca^{2+} 濃度に応じ蛍光強度が変化する Ca^{2+} 指示タンパク質である G-CaMP7 が海馬神経細胞に発現しており、c-fos-tTA トランスジェニックマウス内では、学習時に活動したエンGRAM細胞に TRE 配列下流に組み込んだ遺伝子の発現を誘導できる。本研究では、神経活動の観察のための Ca^{2+} イメージングとエンGRAM細胞の標的化を同時に行うため、TRE-KikGR レンチウイルスを海馬へ導入した Thy1-G-CaMP7 x c-fos-tTA ダブルトランスジェニックマウスを作製し、G-CaMP と KikGR の蛍光を小型蛍光顕微鏡 nVista を用いて自由行動下で観察した。海馬依存的なエピソード記憶形成のため、マウスを新規空間に 6 分間曝露した。神経細胞の活動は、新規空間学習時、学習後睡眠時、および記憶想起時の Ca^{2+} イメージングで観察した。エンGRAM細胞は、エピソード体験時に出現した KikGR による緑蛍光を nVista で記録することにより同定し、その後 UV 照射によりこの緑蛍光を nVista の検出範囲外の赤蛍光に変化させた。これにより G-CaMP 蛍光と混在する KikGR の緑蛍光を消失させ、nVista による Ca^{2+} イメージングを可能にした。また、学習後睡眠時のデータは、同時記録した脳波と筋電図を用いて NREM 睡眠と REM 睡眠に分けて解析した。得られた Ca^{2+} イメージングデータは、エンGRAM細胞集団とそれ以外の細胞集団(非エンGRAM細胞集団)に分けて、population vector distance (PVD)および non-negative matrix factorization (NMF)による数理解析を行い、エンGRAM細胞集団に特有の活動様式の抽出を試みた。

〔結果〕

新規空間学習中の活動様式を解析したところ、エンGRAM細胞集団はそれ以外の細胞集団（非エンGRAM細胞集団）と比べ、有意に頻繁に繰り返し活動していることが明らかとなった。PVD解析では、エンGRAM細胞集団は非エンGRAM細胞集団と比べ、学習中のみならず、学習後睡眠時から翌日の記憶想起時にかけて、細胞集団全体としての活動パターンを有意に安定して維持していることが示された。しかし、学習時と異なる文脈（空間）への曝露ではエンGRAM細胞集団と非エンGRAM細胞集団間の有意差が消失した。これらことから、これらエンGRAM細胞集団の活動は、特定文脈の学習からその後の想起までの特定記憶の処理過程に特異的な活動であることが判明した。さらに、NMF解析により、同期的に活動する細胞亜集団（サブ・アンサンブル）の活動を解析した結果、エンGRAM細胞集団では、非エンGRAM細胞集団と比較して、学習時、学習後のNREMならびにREM睡眠時、および記憶想起時にかけて一貫して出現するサブ・アンサンブル活動の出現頻度が有意に高いことが明らかになった。

〔総括〕

本研究でGhandour君は、これまで技術的に困難であった「実際に記憶を獲得することが明らかとなっているエンGRAM細胞に特有の活動を観察するシステム」という、世界的に見てもユニークな技術の構築に成功した。さらにこのシステムを利用して、エンGRAM細胞に特徴的な様々な活動様式を抽出することに成功した。特筆すべきは、1つの記憶情報が、脳内でエンGRAM細胞集団の中の活動の同期性で規定される複数のサブ・アンサンブル活動によって構成されている点と、その活動が、学習後の睡眠時から想起時にかけても観察されるという点である。これらの結果は、学習時に出現した複数のサブ・アンサンブル活動が、記憶の各コンポーネントをそれぞれ符号化しており、さらに睡眠時に再活動することにより記憶の固定化に寄与していることを示唆している。また、これらサブ・アンサンブルが学習時の特定空間で再活動することが記憶の想起を反映していることが示唆された。これらのことから、エンGRAM細胞の活動様式を明らかにしたGhandour君の研究は、記憶情報の脳内での時間的表現を解析する手法を開発した点できわめて新規性が高く、かつ、記憶エンGRAMが構築される原理を明らかにしたことは医学においてきわめて高い重要性を持つと評価された。また、このようなサブ・アンサンブル活動と認知機能との相関を調べることにより、認知症の診断にも寄与する可能性があることから、臨床的意義も高いと評価された。以上から、本審査委員会は本論文をきわめて価値の高いものであると評価し、博士（医学）の学位に充分値するものと判定した。