

氏 名 よしだ まさし
吉田 雅

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 371 号

学位授与年月日 令和 3 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

報酬と連合した構成刺激は局所電場電位の θ リズムに同期した
ラット脳梁膨大部後部皮質ニューロンの θ オシレーションを誘発する
(Configural cues associated with reward elicit theta oscillations of
rat retrosplenial cortical neurons phase-locked to LFP theta cycles)

論文審査委員

(主査) 教授 黒田 敏
(副査) 教授 井ノ口 馨
(副査) 教授 森 寿
(副査) 教授 中辻 裕司
(指導教員) 教授 山崎 光章

Configural cues associated with reward elicit theta oscillations of rat retrosplenial cortical neurons phase-locked to LFP theta cycles (報酬と連合した構成刺激は局所電場電位の θ リズムに同期したラット脳梁膨大部後部皮質ニューロンの θ オシレーションを誘発する)

【目的】

脳梁膨大部後部皮質 (RSC) は、視覚野、聴覚野、頭頂皮質、運動野、海馬傍回、前頭前野、および海馬体から入力を受け、単及び多感覚種入力ならびに種々の認知情報が収束する機能的ハブである。RSC は、臨床的には記憶障害を呈するアルツハイマー病の好発部位であり、神経心理学的研究により過去の体験を想起する種々の課題で RSC が賦活される、また記憶想起直前に脳波 θ オシレーションが RSC で誘発され、記憶想起が脳波 θ リズムと同期して起こることなどが報告されている。一方、動物を用いた行動学的研究により、RSC は刺激-刺激間の連合および条件刺激-強化刺激間の連合形成ならびにこれら遠隔記憶の想起に関与していることなどが示唆されている。本研究では、RSC における刺激-刺激間連合形成や遠隔記憶想起の神経機構をニューロンレベルで明らかにするため、ラットに要素感覚刺激(聴覚または視覚刺激)および構成感覚刺激(聴覚および視覚刺激の同時呈示)と報酬の連合課題を学習させ、課題遂行中のラット RSC ニューロンおよび局所電場電位 (local field potential, LFP) の応答性を解析した。

【方法】

5 匹の雄ラットを用いて、麻酔下で頭骨に歯科用セメントで頭部固定用ホルダーを埋め込んだ。手術回復後、ラット頭部を無痛的に脳定位固定装置に固定して、聴覚、または視覚条件刺激と報酬刺激 (ショ糖溶液) の連合課題を長期間 (1 ヶ月以上) 学習させた。聴覚条件刺激としては 2860Hz (Tone1) および 530Hz (Tone2) の 2 種類の純音を、視覚条件刺激としては左右の眼球それぞれの前方に設置した白色灯により、左右の眼に個別に光刺激 (Light1、Light2) を呈示した。これら個々の条件刺激 (要素条件刺激) は、それぞれ報酬、または無報酬と連合しており、要素条件刺激を同時呈示する構成条件刺激 (Tone1+Light1、Tone2+Light2) は、各要素条件刺激の報酬随伴性とは逆の報酬随伴性を伴っている。ラットは報酬または無報酬と連合した 6 つの条件刺激を識別し、報酬性条件刺激の後にチューブをなめると報酬を得ることができる。

課題学習後、タンゲステン微小電極を RSC に刺入して課題中のニューロン活動および LFP を同時記録した。ニューロン応答の解析では、各条件刺激に対する応答強度を解析した。また、RSC ニューロンのスパイク列のウエーブレット解析を行ない、条件刺激呈示中の θ オシレーションを解析した。さらに、RSC ニューロンが LFP の θ リズムに同期して発

火している可能性を検討するため、これらニューロンが発火した LFP θ リズムの相（角度：phase-locked angle）を解析した。一方、RSC における各条件刺激の再現を明らかにするため、多次元尺度分析（MDS）を用いて 6 つの条件刺激に対する RSC ニューロン集団の応答強度を解析した。MDS 空間における条件刺激間の識別性は、重判別分析を用いて解析した。全記録の終了後、脳切片を作製して染色し、記録部位を脳定位的に同定した。


【結果】

188 個の RSC ニューロンが条件刺激に応答し（条件刺激応答ニューロン）、このうち 53 個が報酬と連合した条件刺激により強く応答した（CS⁺選択応答ニューロン）。CS⁺選択応答ニューロンの MDS 解析では、1) 条件刺激が感覚種に関係なく報酬随伴性に基づいて大きく 2 グループに分かれる、さらに 2) 各条件刺激（Tone1、Light1、Tone2 + Light2、Tone2、Light2、および Tone1 + Light1）がそれぞれ有意に分離される、すなわち構成条件刺激（Tone1 + Light1 および Tone2 + Light2）と要素条件刺激（Tone1、Light1、Tone2、および Light2）が分離して再現されていることが明らかになった。ウェーブレット解析では、CS⁺選択応答ニューロンは無報酬性条件刺激と比較して報酬性条件刺激に対して、より強い θ オシレーションを示した。さらに、CS⁺選択応答ニューロンを含む条件刺激応答ニューロンと LFP θ リズムとの同期を解析した結果、LFP θ リズムの負電位相（180-360°）に同期して発火するニューロンが有意に多いことが判明した。以上の RSC ニューロンは、RSC 皮質の上層（第 2-3 層）および深層（第 4-5 層）に分布していた。

【総括】

本研究では、刺激-刺激間連合形成および θ オシレーションに基づいた遠隔記憶の想起における RSC の役割を明らかにするため、ラット RSC におけるニューロン活動および局所電場電位を同時記録し、要素および構成条件刺激-報酬連合課題に対する応答性を解析した。その結果、RSC ニューロン応答の MDS 解析から、構成条件刺激とその構成要素である各要素条件刺激が識別的に再現されていることが明らかになり、RSC では刺激-刺激間連合により構成条件刺激が、その構成要素である要素条件刺激とは異なる刺激として再現されていることが示唆された。さらに、RSC ニューロンは LFP θ リズムの負電位相に同期して発火することが判明した。一方、計算論的研究より記憶想起が LFP θ サイクルの負電位相で起こることや動物を用いた行動学的研究により RSC 破壊により遠隔記憶想起が障害されること等が報告されており、本研究結果より遠隔記憶の想起過程では、遠隔記憶を担う RSC ニューロンが LFP θ リズムに同期して活動することが示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	吉田 雅
論文審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教 授	黒田 敏	
	(副査) 教 授	井ノ口 馨	
	(副査) 教 授	森 寿	
(副査) 教 授	中辻 裕司		
指 導 教 員	山崎 光章		
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本文の場合は英訳を付記すること。)		(判定)	
Configural cues associated with reward elicit theta oscillations of rat retrosplenial cortical neurons phase-locked to LFP theta cycles (報酬と連合した構成刺激は局所電場電位のθリズムに同期したラット脳梁膨大部後部皮質ニューロンのθオシレーションを誘発する)		合 格	
(論文審査の要旨)			
<p>【目的】 脳梁膨大部後部皮質 (retrosplenial cortex; RSC) は、視覚野、聴覚野、頭頂葉皮質、運動野、海馬傍回、前頭前野、海馬から入力を受けて、単および多感覚種入力と種々の認知情報が収束する機能的ハブと考えられている。RSCはアルツハイマー病の好発部位であり、神経心理学的研究によって過去の体験を想起する種々の課題でRSCが賦活化されることが知られている。また、記憶想起直前に脳波θオシレーションがRSCで誘発されて、記憶想起が脳波θリズムと同期して発生することも報告されている。一方、動物を用いた行動学的研究では、RSCは刺激—刺激間の連合、条件刺激—強化刺激間の連合形成、そしてこれらの遠隔記憶の想起に関与していることが示唆されている。したがって、本研究ではRSCにおける刺激—刺激間の連合形成や遠隔記憶想起の神経機構をニューロンレベルで明らかにすることを目的に、ラットに要素感覚刺激 (聴覚または視覚刺激) および構成感覚刺激 (両刺激の同時呈示) と報酬の連合課題を学習させて、課題遂行中のラットRSCニューロンおよび局所電場電位 (local field potential; LFP) の応答性を解析した。</p> <p>【方法】 雄ラット5匹を用いて、麻酔下で頭骨に歯科用セメントで頭部固定用ホルダーを埋め込んだ。手術からの回復後、ラット頭部を無痛的に脳定位固定装置に固定して聴覚または視覚条件刺激と報酬刺激 (ショ糖溶液) の連合課題を1ヶ月以上の長期間学習させた。聴覚条件刺激としての2種の純音を、視覚条件刺激として左右の眼球それぞれの前方に設置した白色灯より個別に光刺激を呈示した。これら個々の条件刺激 (要</p>			

素条件刺激) はそれぞれ報酬または無報酬と連合しており、要素条件刺激を同時呈示する構成条件刺激は各要素条件刺激の報酬随伴性とは逆の報酬随伴性を伴っている。ラットはこれら6種の条件刺激を識別し、報酬制条件刺激ののちにチューブを舐めると報酬を得ることができる。課題学習後、微小電極をRSCに定位的に刺入して課題中のニューロン活動およびLFPを同時記録した。ニューロン応答では各条件刺激に対する応答強度を解析し、そのスパイク列のウェーブレット解析により条件刺激呈示中の θ オシレーションを解析した。また、RSCニューロンが発火したLFP θ リズムの相 (phase-locked angle) を解析した。多次元尺度分析 (MDS) を用いて6つの条件刺激に対するRSCニューロン集団の応答強度を重判別分析により解析した。最後に脳切片を染色して記録部位を同定した。

【結果】

計188個のRSCニューロンが条件刺激に応答し、このうち53個が報酬と連合した条件刺激により強く応答した (CS+選択応答ニューロン)。これらのニューロンのMDS解析によって (1) 条件刺激が感覚種に関係なく報酬随伴性に基づいて大きく2グループに分かれる、(2) 構成条件刺激と要素条件刺激がそれぞれ有意に分類されることが判明した。ウェーブレット解析によって、CS+選択応答ニューロンは報酬性条件刺激に対して、より強い θ オシレーションを示した。さらに条件刺激応答ニューロンとLFP θ リズムとの同期を解析した結果、LFP θ リズムの負電位相に同期して発火するニューロンが有意に多かった。以上のRSCニューロンはRSC皮質の上層 (第2-3層)、深層 (第4-5層) に分布していた。

【総括】

吉田 雅氏は今回の研究を通して、RSCでは刺激—刺激間連合により構成条件刺激がその構成要素である要素条件刺激とは異なる刺激として再現されていることを明らかにした。さらに、RSCニューロンは LFP θ リズムの負電位相に同期することを明らかにした。本研究の結果によって、遠隔記憶の想起過程では遠隔記憶を担うRSCニューロンが LFP θ リズムに同期して活動することが強く示唆された。本研究は、RSCがさまざまなタイプの遠隔記憶の想起する過程を初めて明らかにした点で新規性が高く、その神経機構の一端を明らかにした点で学術的重要性が高いと判断した。

以上より、本審査会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。