

平成 25 年度
学位論文（博士）

海馬歯状回顆粒細胞における
樹状突起分岐周辺の入力統合

玉川大学大学院脳情報研究科

上條 中庸

目次

第1章	序論	01
第2章	背景	04
2.1	海馬の解剖学的知見	04
2.2	海馬の回路	06
2.3	記憶の神経基盤	08
第3章	実験手法	10
3.1	先行研究	10
3.2	既存研究の問題点	11
3.3	研究目的	12
3.4	実験概要	12
第4章	材料と方法	13
4.1	実験概要	13
4.2	刺激方法	13
4.3	刺激プロトコル	14
4.4	記録方法	15
4.1	解析方法	15
4.6	実験	16

第 5 章 実験結果	17
5.1 加算 EPSP の空間依存性	17
5.2 加算 EPSP の時空間依存性	18
5.3 超線形的増加の分子メカニズム	19
第 6 章 考察	21
謝辞	33
参考文献	34

第1章 序論

動物は様々な環境に適応し生きている。その適応能力は単純な反射（reflex：適刺激に対して反応する典型的な運動パターン）や走性（taxis：外界刺激に対して一定の方向を持った行動）とは異なり、外界からの情報を過去の経験と照らし合わせ現在の状況や予測を照合し自ら行動する複雑なものであると考えられる。この能力を可能にしているものは「脳」である。動物は過去の情報を蓄え、外界からの情報と照合し、さらに現在の状況を把握しこれから起こるであろうことを予測判断して行動している。これらの現象は全て脳が司っていると考えられている。これらの活動の根底には記憶と学習の機能があり、特に高等哺乳類の記憶の形成には「海馬」と呼ばれる部位が重要な役割を担っている。

脳は多岐に渡る機能が備わっているが、情報の保持、つまり記憶は脳の機能の中でも最も重要なひとつである。もし、情報が保持出来ない状況下に陥ってしまった場合、ほとんどの動物は生き残ることは出来ないであろう。

上記したように選択的に必要な情報を保持できるとしても、全ての情報を記憶している訳ではない。記憶には色々な種類があり、その保存期間の長さによって分類される。感覚器官から入力された情報を短い時間保持するのが最も保存期間の短い感覚記憶である。さらにこの感覚記憶の膨大な情報の中から選別された情報だけが脳連合野へ送られる。ここでの記憶は短期記憶と呼ばれる。例えば、ある作業を行う際に必要な記憶でワーキングメモリーと呼ばれる記憶も含まれる。暗算などの計算をする時や電話番号を一時的に覚えておくような記憶のことである。さらに長期間保存される記憶は長期記憶と呼ばれ、この記憶は忘却しない限り一生涯残るものである。そして、長期記憶はその性質によって分類される。まず、言語で表現できるような宣言記憶（陳述記憶）と言語で表現できない非宣言記憶（非陳述記憶）がある。非陳述記憶は、自転車の乗り方で例えられるようにいわゆる身体で覚えるような手続き記憶である。一方、宣言記憶は大きく二つに分類され、意味記憶とエピソード記憶である。意味記憶は本で読んだり覚えたりするような知識に関する記憶であり、エピソード記

憶と呼ばれる日常で体験した思い出のような個人的経験の記憶である。短期記憶から長期記憶、特に宣言記憶・エピソード記憶へ移行する際には海馬が大きく寄与していると考えられている。

脳の構造をしてみると主に2種類の細胞から成り、神経細胞（neuron：ニューロン）と神経膠細胞（glial cell：グリア細胞）から構成されている。個々のニューロンは機能的に極性を持った形態をし、互いにシナプス（synapse）と呼ばれる結合によって数千～数万の複雑なネットワークを構成している。記憶に関わっていると考えられている海馬は、興奮性細胞の多くは顆粒細胞（granule cell）と錐体細胞（pyramidal cell）と呼ばれるニューロンのネットワークによって構成されている。脳の機能を知ろうとした際、これらのニューロンによるネットワークを調べることによって脳の機能の一部が明らかになるのではないかと考えられる。特にニューロン通しのつながりであるシナプスの可塑性が記憶を形成している可能性が有用であると考えられる。シナプスの可塑性はシナプス前部とシナプス後部の間でチャンネルが増減したり、神経伝達物質の量が増減することによって情報の伝達効率が変化し起こるとされている。また、シナプスでの可塑性は入力が多いような部分的なシナプスだけでなく、入力を受けている近位部分の樹状突起自体に可塑性が広がっていることもわかってきている。ここでニューロンについて見てみると、情報の入力部位である樹状突起（dendrite）のシナプスは1つの神経細胞につき数百～数万箇所もあるのに対しその出力は別の神経細胞に出力するかしないかの2通りしかない。このことはニューロンに入力された複数の情報は一つのニューロンで統合され、次の細胞に伝えられていることを意味する。このニューロンでの情報統合に関しては未だに解明されていないことも多い。しかし脳を理解するためには、ネットワークの構成単位であるニューロンが複数の情報をどのようなメカニズムで統合し、実際にどのように利用しているのか明らかにする必要がある。しかし、従来の研究では樹状突起単位や微細なシナプス単位での入力統合メカニズムに関して明確にはなっていなかった。近年、多光子顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いた手法の開発が発展し、樹状突起やシナプス単位の研究が可能になってきた。

本研究では、2光子・共焦点レーザー顕微鏡とUVレーザーを用いた高速アンケージング刺激装置と電気生理学的手法であるパッチクランプ法による記録を組み合わせることによって樹状突起上への入力の時空間情報処理についてのダイナミクスの解明することを可能にした。これまで樹状突起は単純に入力された情報を細胞体へ届けるためだけのものと考えられてきたが、最近の研究によると樹状突起自体で様々な処理がなされていることが報告されている(Branco and Häusser 2010)。例えば、海馬のCA1錐体細胞で一本の樹状突起が興奮性と抑制性の関係を直接処理しているようなことが報告されている(Hao et al. 2009)。また、樹状突起は受動的にシナプス入力を細胞体へ伝えるだけではなく、樹状突起スパイク(dendritic spike)と呼ばれるような能動的な情報の伝達も行われている(Sjostrom et al. 2008)。方向選択制を持つような網膜の神経節細胞(ganglion cell)では、入力を増大するような樹状突起のナトリウムスパイクが局所的に発生することが引き金になって細胞が発火することが報告されている(Oesch et al. 2005)。さらに樹状突起のみで可塑性が起こることも調べられている(Losonczy et al. 2008; Frick et al. 2004)。このように樹状突起だけでも情報処理がなされることが多数報告され、本研究もこれらの結果を支持するのに一役買うことができると考えられる。

第2章 背景

2.1 海馬の解剖学的知見

海馬 (hippocampus) は大脳側頭葉の内側部で側脳室下角底部に位置し、海馬体 (hippocampal formation) と呼ばれる大脳辺縁系の一部である。今から約 400 年前にイタリアのボローニャ大学の解剖学者 Giulio Cesare Aratio (1587) がギリシャ神話に登場する海神ポセイドンが跨る海馬の尾に形が似ていることから「海馬 (Hippocampus)」と名付けられた。またその湾曲した形状が雄羊の角に似ていることから「雄羊の角 (Cornu Arietis)」とも呼ばれた。また、フランスの解剖学者 René Croissant De Garengo (1742) が雄羊の頭をもち、巻いた角を持ったエジプトのアンモン神に擬えて「アンモン角 (Cornu Ammonis)」とも名付け、その名残からアメリカの神経科学者 Rafael Lorente de Nó (1934) が錐体細胞の領域を細胞の大きさと形から CA1~CA4 に分類した。

海馬の構造を図 2-1 に示した。海馬は細長い構造をしており、その軸の吻側は中隔核 (septum) から尾側は側頭葉へと伸びている。海馬の短軸方向は septotemporal 軸、長軸方向は transverse 軸と呼ばれる。transverse に沿って海馬を切り出すと金太郎飴のような構造が見られる。図の中央の下に見られるアルファベットの C を逆にしたように見られる場所は歯状回 (DG; dentate gyrus) である。歯状回の主要細胞は顆粒細胞 (GC; granule cell) であり、逆 C 型の内側から始まり長く C のような弧を描くように伸びている領域は CA である。CA4 から始まり CA3、CA1、海馬台 (subiculum) へ続くこの領域の主要細胞は錐体細胞 (pyramidal cell) から成る。それぞれのニューロンから伸びる樹状突起や軸索 (axon) は一定の走行をとり、海馬は断面でも明瞭な層構造を成している。海馬は嗅覚、視覚、聴覚、体性感覚などの大脳皮質からの外因性の入力や、縫線核 (raphe nuclei) や腹側被蓋野 (ventral tegmental area)、中隔核などから神経調節物質 (neuromodulator) の内因性の入力も受けている。このように海馬は全ての感覚情報と一部内因性の情報も送り込まれてくると考えられる。

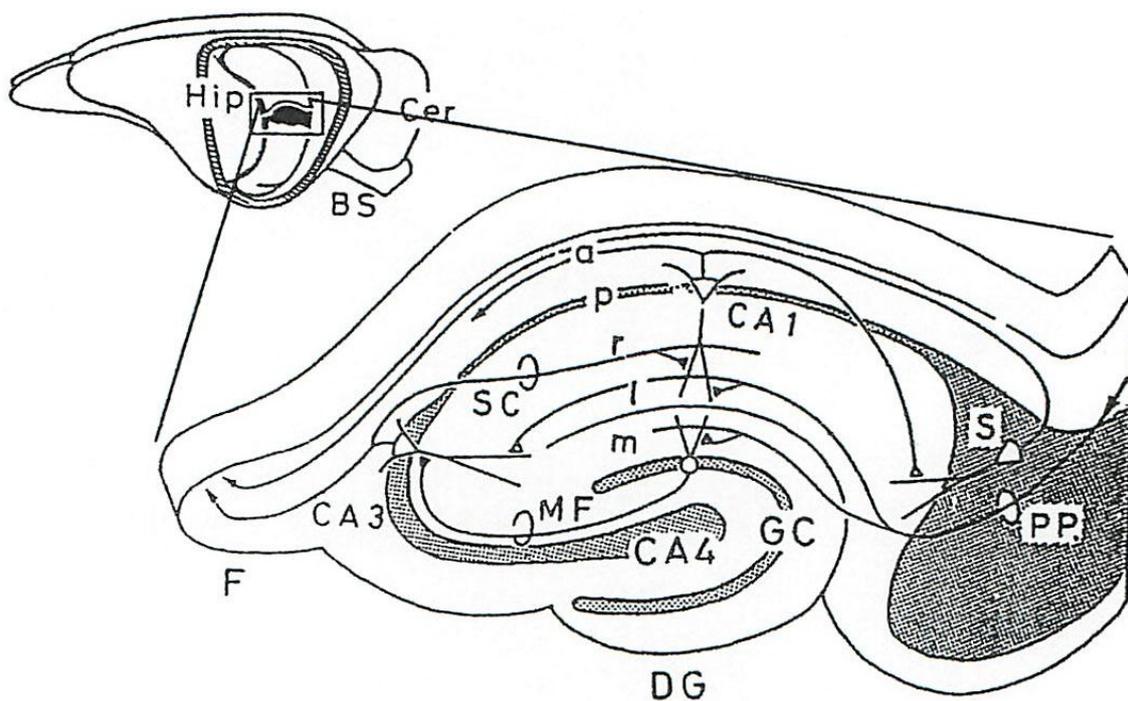


図 2-1 海馬模式図

Hip: hippocampus(海馬), Cer: cerebellum(小脳), BS: brain stem(脳幹), PP: perforant path(貫通枝), DG: dentate gyrus(齒状回), GC: granule cell(顆粒細胞), MF: mossy fiber(苔状線維), CA1~4: Cornu Ammonis(アンモン角), SC: schaffer collateral(シャフアー側枝), F: fimbria(海馬采), S: subiculum(海馬台), a: alveus(アルベウス層), p: pyramidale(錐体細胞層), r: radiatum(放線層), l: lacunosum(網状層), m: moleculare(分子層)

2.2 海馬の回路

海馬の神経回路は Ramon y Cajal の時代から知られているが、詳細は近年になってから解明された。外界からの種々の情報大脳皮質連合で処理された後、嗅内野(EC; entorhinal cortex)でまとめられ、嗅内野第II層から貫通線維(PP; perforant path)を介して歯状回分子層でシナプス結合する。顆粒細胞の主軸索である苔状繊維(MF; mossy fiber)は CA3 野の錐体細胞の樹状突起とシナプス結合しており、さらに歯状回を経由しなかった EC からの PP とも結合している。また、苔状線維の一部の入力は歯状回門 (dentate hilus) の苔状細胞 (MC; mossy cell) へ投射して顆粒細胞へ反回する。CA3 の出力はシャフアー側枝(SC; Schaffer Collateral)を通して CA1 に入力される。このとき CA3 の出力の一部は自身の樹状突起と結合しているためフィードバック回路を形成している。CA1 では CA3 からの入力の他に、嗅内野第III層から別の経路での入力を受けており (TA 経路; Temporo-Ammonic pathway) が存在する。CA1 の出力は海馬台を通して EC に戻る。EC では戻ってきた情報を大脳皮質へ投射するという回路になっている。海馬体の各部位を一方向へつなぐ特徴的な DG - CA3 - CA1 の回路が重要であるとして三シナプス性回路 (trisynaptic circuit) とよばれることもある(Andersen et al. 1971)。(図 2-2)

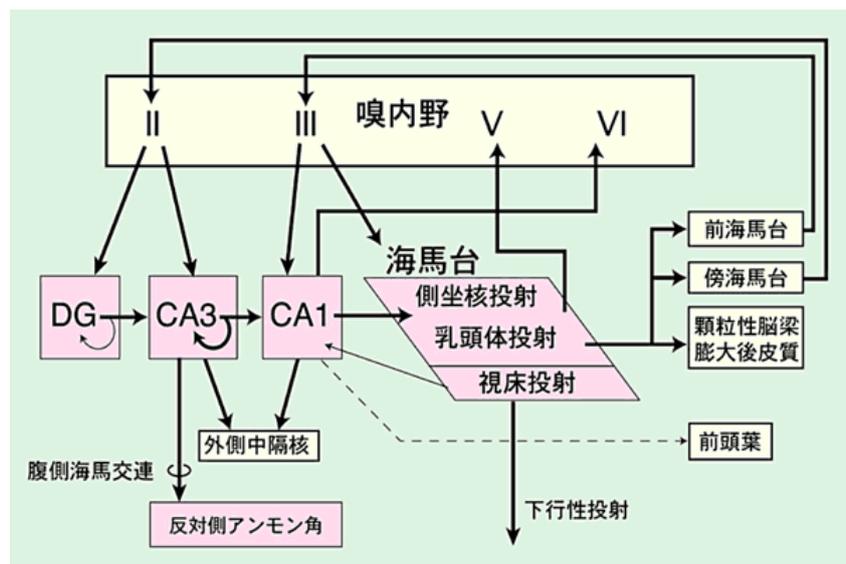


図 2-2 海馬の主な興奮性投射回路

海馬からの出力は主に3つあり、第1の出力はCA1から嗅内皮質深層や膨大後部皮質などへ、第2の出力は連合縦束 (longitudinal association bundle) を経由して知覚連合野や扁桃体、側坐核、そして一部は前頭前野に、第3の出力はCA1またはCA3から脳弓を経由して皮質下領域 (外側中隔、乳頭体、視床前核、視床下部) や前頭前野へと投射する。

2.3 記憶の神経基盤

記憶の固定をニューロンネットワークやニューロン単位で考える上で重要な考えがあり、それを可塑性 (plasticity) と呼ぶ。カナダの心理学者であった Donald Hebb は「細胞 A の軸索が細胞 B を発火させるのに十分近くにあり、繰り返すもしくは絶え間なくその発火に参加するとき、いくつかの成長過程または代謝変化が一方あるいは両方の細胞に起こり、細胞 B を発火させる細胞の 1 つとして細胞 A の効率が增加する。」という仮説をたてた(Hebb 1949)。この仮説に関する実験的な根拠は数多く存在し、前シナプスからの入力と後シナプス側の細胞の発火の樹状突起への逆伝搬である逆伝搬活動電位のタイミングによって可塑性が変化するスパイクタイミング依存性可塑性 (STDP: spike timing-dependent plasticity) がある(Bi and Poo 1998; Nishiyama et al. 2000; Tsukada et al. 2005; Dan and Poo 2006)。CA1 の培養細胞を使い EPSP 入力とスパイク発火が同時に起こるか EPSP の入力後に発火が起こる場合に長期増強 (LTP: long term potentiation)、発火後に EPSP の入力が入った場合には長期抑制 (LTD: long term depression) が起こることが報告されている(Bi and Poo 1998)。

可塑性はコントロール EPSP に対して刺激などの後の EPSP の増強や減弱を評価していることから分かるように、可塑性はシナプス伝達の長期的な変化によって引き起こされ、これこそが記憶の基と考えられる。よってシナプスの変化を調べることによって記憶の分子基盤を解明することができる。樹状突起内で新規のタンパク質合成が起きる可能性は古くから報告されている(Bodian 1965)。ラット海馬切片の実験で、CA1 シナプスへ強い刺激による持続的な L-LTP を引き起こした後に、その 1 時間後に同じニューロンの別のシナプスを弱く刺激してもそのシナプスで L-LTP が起きること、さらに E-LTP から L-LTP への移り変わりはタンパク質合成を介しシナプス入力特異的であることを示した。

これらの可塑性特に LTP はタンパク質合成非依存的であり、一過性の前期 LTP (E-LTP: early-LTP) と呼ばれる。覚醒中のラット歯状回顆粒細胞での *in vivo* での実験では、タンパク質合成阻害剤を与えて可塑性の実験を行うと LTP が 3~4 時間程度しか持たないことが報告されている(Krug et al. 1984)。タンパク質の合

成依存性の後期 (L-LTP: late-LTP) も知られており、短期記憶と長期記憶との類似性が注目されている(Frey and Morris 1997)。これらの結果から Frey と Morris は”synaptic tagging & capture model”を提唱した。E-LTP から L-LTP へ変換された長期に渡る伝達効率の変化の維持はタンパク質合成に依存せず、今日刺激に寄って誘導される既に合成された可塑性タンパク質と弱刺激によって形成されたシナプス活動のタグとの機能的な相互作用が長期伝達効率の維持を引き起こすという内容である。このモデルによく似た現象が動物行動レベルでも起こりうる可能性があることが報告されている(Moncada and Viola 2007)。

この様にニューロンの可塑性によって記憶は形成されると考えられるが、単純に入力が入っただけでは可塑性は起こらず、Hebb 則に従った様なことが起こらないと可塑性は起こらない。電気生理の実験では高頻度刺激であるテタヌス刺激 (100Hz, 100 発) などで可塑性を起こすことが可能であるが、生体内ではテタヌス刺激の様な入力は起こらない。実際の脳内では樹状突起に多数の入力が入った際に膜電位があがり、それがトリガーとなり細胞内情報伝達系が駆動し可塑性が起こることが確認されてきている。このトリガーは例えば、錐体細胞確認されているような樹状突起発火 (dendritic spike) などがある。このような樹状突起の入力特異性を調べることによって、記憶の神経基盤のメカニズムについて解明できる可能性がある。

本研究では、樹状突起の入力部位によって入力が異なり、さらにその入力ソースについても解明されつつある海馬の歯状回の顆粒細胞の樹状突起について研究を行った。

第3章 研究の目的

3.1 先行研究

歯状回顆粒細胞は海馬の三シナプス回路の入り口に位置している。顆粒細胞は主に EC を起源として PP を経由してシナプス入力を受ける(Amaral et al. 2007)。外側貫通枝は遠位樹状突起へ内側貫通枝は中位樹状突起へそれぞれ顆粒細胞分子層の外側 2/3 内で結合している(Wang and Lambert 2003; Nishimura-Akiyoshi et al. 2007; Hargreaves et al. 2005)。一方交連・連合線維の入力や MC からのポジティブフィードバックは分子層の内側 1/3 の近位樹状突起で結合している(Jackson and Scharfman 1996)。それ故、それぞれの樹状突起の位置によって情報処理は異なっていると考えられる。

顆粒細胞は分子層の内側 1/3 に多くの分岐を持っているように海馬の錐体細胞とは形態学的に異なる(Amaral et al. 2007)。さらに、非常に強い電位減衰によって顆粒細胞の出力における個々のシナプスの貢献度は低い(Krueppel et al. 2011)。これまで樹状突起は単にシナプス入力を細胞体へ運んでいるだけだと考えられていたが、最近では樹状突起が基本的な単位として細胞体へ情報を伝えている可能性があることが報告されている(Branco and Häusser 2010)。例えば、樹状突起分枝の先端から細胞体へ方向（求心性）もしくは細胞体から先端方向（遠心性）の連続的なスパインの活性化は強い方向選択性を示す。そこでは顆粒細胞の細胞での応答は求心性方向入力の方が遠心性方向入力よりも大きくなり、さらにそれはN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA: N-methyl-D-aspartate)受容体に依存している(Branco et al. 2010)。方向選択性を伴った樹状突起入力は樹状突起における情報統合に重要な役割を担っている可能性がある。本研究室でも以前に CA1 錐体細胞における時空間的入力の非線形的統合についてレーザーアンケーシング刺激によって証明した(Yoneyama et al. 2011)。しかしながら、樹状突起だけではなく一つの樹状突起分岐も神経系において基本的な単位として働いている可能性がある。(Branco and Häusser 2010)。樹状突起に沿った強力

な電位減衰は非線形的な加算を調節しているため顆粒細胞の樹状突起のシナプス入力には線形性を示すことが知られている。しかしながら、顆粒細胞は多くの分枝をあり、異なる感覚情報を伴った特別な入力箇所があり(Hargreaves et al. 2005)、樹状突起分岐点を含めたシナプス入力統合の基本メカニズムや樹状突起に沿ったシナプス入力間の相互作用、そして樹状突起分枝への入力からの情報統合については未だ不明である。

3.2 既存研究の問題点

Branco et al (2010) らが唱えるように樹状突起が根本的な単位と考えられる。例えば、樹状突起では、局所的な樹状突起放出も知られている。樹状突起は神経ペプチド(Ludwig and Pittman 2003)、エンドカンノビノイドや脳由来神経栄養因子 (BDNF: Brain-derived neurotrophic factor) (Regehr et al. 2009)のような神経修飾物質を放出することができる。また、樹状突起特異的な可塑性が起こることも知られている(Frick et al. 2004; Hardie and Spruston 2009; Branco et al. 2008)。さらに、樹状突起上でのシナプス入力を受動的だけではなく、能動的にも計算処理をしている。しかし、電気生理実験から外側 PP 刺激と内側 PP 刺激の入力タイミングを変えた際の顆粒細胞の細胞体での応答は、入力順序に関わらず一定(線形加算)であった。さらに、2光子レーザー顕微鏡によるグルタミン酸アンケーシングの連続刺激の実験から、二股に分かれた分枝に刺激をした場合、細胞体での応答はやはり線形加算となった(Krueppel et al. 2011)。このような実験から歯状回顆粒細胞への入力は入力層間での相互作用がみられず、連続した情報が分枝へ入力されたとしてもその応答は単純に加算され細胞体へ伝わる可能性がある。また、CA1 での実験は樹状突起への多点刺激に関する報告も多数報告されているが、顆粒細胞で分岐点周辺での時空間的に異なる入力がどの様に変化するかについては報告がされていない。

3.3 研究目的

本研究では、顆粒細胞の分岐点周辺で起こる入力統合に着目して研究を行った。歯状回ではモダリティーの異なる情報が顆粒細胞の樹状突起の別々の部位に入力される事が解剖学的・機能的にも報告されている。空間情報は嗅内皮質第 II 層の内側部から内側貫通枝 (MPP: medial PP) を通り顆粒細胞の樹状突起中位部(MD: medial dendrite)、非空間情報は嗅内皮質第 II 層から外側貫通枝(LPP: lateral PP)を経由して顆粒細胞の外側部(LD: lateral dendrite)へ投射している (Hargreaves et al. 2005)。そして、顆粒細胞の近位部 (PD: proximal dendrite) では顆粒細胞の発火からの情報が苔状繊維を経由して歯状回門 (dentate hilus) の苔状細胞 (mossy cell) から戻ってくる事が報告されている(Jackson and Scharfman 1996)。本研究は、以上のような知見から歯状回顆粒細胞の樹状突起の分岐点周辺に着目して時空間的に異なる入力がどのように統合されているのかを調べる為に高速アンケーシング刺激を使用して実験を行った。

3.4 実験概要

高速アンケーシングレーザーを使用し、樹状突起分岐点周辺の 2 つの樹状突起入力による EPSP 加算の線形性について評価するために時空間的に異なる刺激を施した。具体的には、分岐点をまたぐようにして樹状突起に沿った入力と 2 本の分枝への入力を距離とタイミングを変えつつ施し、その時の応答を計測し評価した。また、その時の分子メカニズムを調べるために薬理実験を行った。

第4章 材料と方法

本実験に関わる全ての操作は玉川大学実験動物委員会の許可もとで行われた。
許可番号：H14-8

4.1 実験概要

海馬急性スライスには Wister ラット(P18 - 22)を使用した。ラットはフォーレン (Abbott Japan) によって麻酔をかけ、麻酔下で全脳を取り出し処理を行った。スライス標本は正中線から 30° ~ 40° ずらして切り出し、背側海馬の短軸切片 $300\mu\text{m}$ の厚さで作成した。スライス標本は pH7.3 で 95%の O_2 と 5%の CO_2 の混合ガスでバブリングしながら冷やした人口脳脊髄液 (ACSF: artificial cerebrospinal fluid) (124 NaCl , 3KCl , $1.25 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, 22 NaHCO_3 , 2 MgSO_4 , $2.5 \text{ CaCl}_2(\text{mM})$) 中で切り出し、回復のために 1 時間以上 $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の ACSF 中でバブリングした。実験の際は標本をチャンバーへと移し、室温で実験を行った。記録中抑制細胞の影響を抑えるために GABA_A 受容体の遮断薬であるピクロトキシン (Sigma-Sldrich) $25\mu\text{M}$ を予め ACSF に加えた。

4.2 刺激方法

刺激は共焦点レーザー顕微鏡をカスタマイズした高速アンケーシングシステム (Carl Zeiss 社) を用いて行った。この装置はガルバノミラーを用いて多点の高速なアンケーシング刺激が可能な装置である。アンケーシング時の照射の半径は約 1 ms で、数十 μm 程度の距離であれば刺激ポイント間の移動は 1 ms 以内以下の性能を持っている(Kojima 2006)。ホールセルパッチクランプ法を用いて予め内液に Alexa fluor 488 (Molecular Probe 社) を $100\mu\text{M}$ 加えパッチクランプ後に 10 分拡散させた。樹状突起はアルゴンレーザー (488nm) を使用し共焦点レーザー顕微鏡で視覚化した。刺激を行う前に ACSF 中に最終濃度が $125\mu\text{M}$ とな

るように MNI-caged glutamate (Tocris 社) を加えた。可視化した樹状突起上の刺激ポイントに、照射時間 1ms の条件で UV レーザーを照射しアンケーシングによって誘起される 1 発の gluEPSP は全て閾値以下で、その時のピーク値が 1.5-2.5mV となるようにレーザーの出力強度を設定した。照射 1ms のアンケーシングによって活性化されるグルタミン酸は生理条件下での前シナプスからシナプス間隙に放出さえるグルタミン酸の量とほぼ同量である。刺激間隔 (τ) はレーザー照射開始時間から次のレーザー照射時間までの時間である。高速アンケーシングシステムの限界によって $\tau = 0$ ms では刺激ポイント間の移動時間の遅延が 0.5-1 ms かかる。その他の刺激間隔の値ではこのような遅延は生じない。加えて、海馬歯状回では、樹状突起の位置に関わらず 1 つのスパインでの gluEPSP は変わらず、NMDA 受容体の遮断薬である 2-アミノ-5-ホスホ吉草酸 (AP5: D-2-amino-5-phosphovaleric acid) や電位依存性カルシウムチャネルの遮断薬の Ni^{2+} の添加によっても遅延時間は変わらないことが報告されている (Krueppel et al. 2011)。

4.3 刺激プロトコル

樹状突起における加算 EPSP の時空間特性を調べるために、刺激位置は樹状突起に沿ったものと娘分枝へ刺激を施した (Fig 4-1A)。まず、分岐点から先端方向への距離 d_1 、 d_2 ($d_1 = d_2$; 5, 10, 20, 30 μm) にある分枝の site1 と site2 へ 2 つの刺激 S_1 と S_2 を施した (Fig 4-1B)。次に、先頭樹状突起 (apical dendrite) の分岐点から距離 d_3 (d_3 ; 5, 10 μm) に位置する site3 へ刺激 S_3 を入力した。2 刺激 S_{ij} は入力間隔 τ (0, 5, 10 ms) で S_i を刺激し、その後 S_j を刺激したことを示している (Fig 4-1C)。娘分枝 S_1 (又は S_2) と親分枝 (S_3) のペア刺激は今後 *Line* 刺激 S_{13} と S_{23} として示す。 S_{13} と S_{23} は先端から細胞体方向への刺激を表していて、これを IN 方向と定義する。逆方向 (細胞体から先端方向) の S_{31} と S_{32} は OUT 方向として定義する。他のペア刺激である S_{12} と S_{21} (Fig 4-1D 右) は今後 *Branch* 刺激として示す。 S_1 と S_2 は S_{12} の EPSP のピーク値が S_{21} のそれよりも大きくなるように定義した ($d_1, d_2 = 10 \mu\text{m}$, $\tau = 5$ ms)。ペア刺激によって誘起された加算 EPSP

における非線形性の測定結果の例を Fig 4-1E に示した。下の軌跡において、非線形性は実測（重畳）EPSP（Measured EPSP）と S1 と S2 の単発刺激（上の 2 本の軌跡）を単純加算した EPSP（EPSP linear sum）（下の軌跡）のピーク値の比率によって計算した。

4.4 記録方法

海馬歯状回顆粒細胞の細胞体へパッチクランプし記録を行った。記録電極は Sutter Instrument 社のプレーンによって自作し、電極抵抗が 7~10M Ω になるようにした。パッチ内液には以下が含まれている(mM)142 K-glucuronate, 10 HEPES, 10 NaCl, 2 MgATP, 0.2 Na₂GTP, 0.5 EGTA, and 10 MgCl₂ (KOH によって pH 7.2 調整)。視覚化するため、Alexa Fluor 488 を最終濃度が 100 μ M になるようにパッチ内液に予め充填してからパッチクランプを施した。レーザーアンケーシングの前に MNI-caged glutamate (チャンバー内での最終濃度が 125 μ M, Tocris 社) を ACSF 中に加えた。また、記録中抑制細胞の影響を抑えるために GABA_A 受容体の遮断薬であるピクトキシシン (Sigma-Sldrich) 25 μ M を予め ACSF 中に加えた。通常の記録は全てホールセルパッチクランプの電流固定モードで行った。後ほど詳細を記すが、薬理実験では遮断薬は全て ACSF 中に加えた。パッチクランプのアンプは HEKA 社の EPC-7 を使用した。記録にはパッチクランプをした際の静止膜電位が -60mV 以下のものを使用し、静止膜電位は電流注入をして -80mV になるようにした。通常応答は専用ソフトを使用し PC 上で 5kHz のハイパスフィルターをかけ、サンプリングレート 48kHz でデジタル化した (Molecular Devices 社 CLAMPEX ver. 9.2.0.11)。

4.5 解析方法

全てのデータは 1kHz のローパスフィルターをかけた (Molecular Devices 社 Clampfit ver. 9.2.0.11)。一つの神経細胞での記録は全て 5 発の応答を平均したもの

を1つの応答として使用した。刺激前50ms間をベースラインとして、その際の静止膜電位を0mVとした。樹状突起EPSPの加算の非線形性を評価するために measured EPSP と EPSP linear sum の比率を計算した (Fig 5-1E)。評価には T テストと ANOVA を使用した (有意差: $P < 0.05$)。

4.6 実験

実験1: 加算 EPSP の空間依存性

同時2入力によって誘起された加算EPSPにおける線形性と非線形性の空間依存性を調べるために、*Line* 刺激 (S_{13} と S_{23}) と *Branch* 刺激 (S_{12} , S_{21}) を同じ入力間隔 ($\tau = 0$ ms) で同じ距離 ($d_1, d_2 = 5, 10, 20, 30 \mu\text{m}$; $d_3 = 5, 10 \mu\text{m}$) で施した。さらに、優位に非線形性が確認された加算EPSPの細胞体から分岐点までの距離依存性についても調べた。

実験2: 加算 EPSP の時空間依存性

加算EPSPにおける線形性若しくは非線形性の時空間依存性を調べるために *Line* 刺激 (*IN*: S_{13} , S_{23} と *OUT*: S_{31} , S_{32}) と *Branch* 刺激 ($\tau = 0, 5, 10$ ms) を異なる刺激タイミングで同じ距離で調べた ($d_1, d_2 = 5, 10 \mu\text{m}$ と $d_3 = 5, 10 \mu\text{m}$)。

実験3: 分子メカニズム (薬理実験)

樹状突起における加算EPSPの非線形性の分子メカニズムを調べるために2つの遮断薬を ACSF に加えた。ひとつは NMDA 受容体のアンタゴニストである DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (DL-AP5, 100 μM , Sigma-Aldrich 社)、もうひとつは電位依存性カルシウムチャネルのブロッカーである NiCl_2 (50 μM , 関東化学) である。

第5章 結果

5.1 加算 EPSP の空間依存性

樹状突起への同時2入力によって引き起こされる加算 EPSP の非線形性の有無を定義するために、刺激間隔 ($\tau = 0$ ms) で分岐点から等距離にある位置 ($d_1, d_2 = 5, 10, 20, 30 \mu\text{m}$ and $d_3 = 5, 10 \mu\text{m}$) で *Line* 刺激 (S_{13}, S_{23}) と *Branch* 刺激 (S_{12}, S_{21}) を刺激した。初めに、図 5.1 (2) で分岐点から等距離にある $d_1 = d_2 = d_3 = 10\mu\text{m}$ 、 $\tau = 0$ ms で刺激をした際の measured EPSP と EPSP linear sum を比較した。図 5.2A では、それぞれの *Line* 刺激で入力・出力間での線形性を示した。図 5.2B は分岐点からのそれぞれの距離での入力・出力関係の線形性が示されている。結果から分岐点から先端方向へ刺激位置をずらして行っても入力・出力間で有意差は認められなかった (Student's t-test, $P < 0.05$; $d_1, d_2, d_3 = 5 \mu\text{m}$, $S_{13}: 1.11 \pm 0.08$ ($n = 7$), $S_{23}: 1.08 \pm 0.10$ ($n = 7$); $d_1, d_2, d_3 = 10 \mu\text{m}$, $S_{13}: 1.04 \pm 0.04$ ($n = 5$), $S_{23}: 1.03 \pm 0.04$ ($n = 5$); $d_1, d_2, d_3 = 20 \mu\text{m}$, $S_{13}: 0.97 \pm 0.02$ ($n = 8$), $S_{23}: 0.97 \pm 0.05$ ($n = 7$))。図 5.3 は *Branch* 刺激の同時刺激 ($\tau = 0$ ms) で等距離 ($d_1, d_2 = 5, 10, 20, 30 \mu\text{m}$) へ刺激を与えた際の入力・出力関係を示している。図 5.3A では、分岐点から刺激位置までの距離が $10 \mu\text{m}$ における *Branch* 刺激で、入力の大きさに関わらずほとんどの measured EPSP が予測される EPSP linear sum よりも大きくなっていった。図 5.3B はそれぞれの距離における入力・出力関係のまとめたデータを示している。有意差のある非線形性は $5 \mu\text{m}$ と $10 \mu\text{m}$ で確認された (Student's t-test, $P < 0.05$; $d_1, d_2 = 5, 1.24 \pm 0.06$ ($n = 7$) $P < 0.01$; $d_1, d_2 = 10 \mu\text{m}$, 1.26 ± 0.03 ($n = 69$))。 $20 \mu\text{m}$ と $30 \mu\text{m}$ での刺激では有意差は見られなかった ($d_1, d_2 = 20 \mu\text{m}$, 1.09 ± 0.03 ($n = 26$); $d_1, d_2 = 30 \mu\text{m}$, 1.02 ± 0.04 ($n = 7$))。距離による非線形性の違いを比較すると、 $5 \mu\text{m}$ と $30 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ と $20 \mu\text{m}$ 、そして $10 \mu\text{m}$ と $30 \mu\text{m}$ の間に有意差がみられた (ANOVA, $P < 0.05$)。それ故、距離が離れるに連れて超線形性は徐々に減少している。

さらに図 6.3 では *Branch* 刺激 (S_{12} ; $d_1 = d_2 = 10 \mu\text{m}$) 細胞体から分岐点までの

距離である d_3 における非線形性の距離依存性が示されている。少なくとも $100 \mu\text{m}$ 以下に存在する分岐点周辺では、全ての加算 EPSP は有意な非線形性を持っていた。

5.2 加算 EPSP の時空間依存性

加算 EPSP における線形性または非線形性の時空間依存性を定義するために、異なる刺激間隔 ($\tau = 0, 5, 10 \text{ ms}$) で分岐点から等距離にある位置 ($d_1, d_2 = 5, 10 \mu\text{m}$ と $d_3 = 5, 10 \mu\text{m}$) における *Line* 刺激 (*IN*: S_{13}, S_{23} と *OUT*: S_{31}, S_{32}) と *Branch* 刺激 (S_{12}, S_{21}) を実行した。

異なる刺激間隔異なる刺激間隔 ($\tau = 0$ と 10 ms) で同じ距離に ($d_1, d_2, d_3 = 10 \mu\text{m}$) における *Line* 刺激の結果が図 5.4 へ示されている。

上記したように、刺激箇所 *Line* 刺激の S_1 と S_2 である site1 と site2 は S_{13} の加算 EPSP が S_{23} の加算 EPSP よりも大きくなるように定義した。 S_{13} と S_{23} ($\tau = 0, 10 \text{ ms}$; $d_1, d_2 = 5, 10, 20 \mu\text{m}$) の増加率間に有意差はないが、 S_1 と S_2 は $\tau = 10 \text{ ms}$ の時の加算 EPSP が $S_{12} > S_{21}$ となるように定義した。

IN 方向における $\tau = 0$ or 10 ms の両条件下で S_{13} と S_{23} によって誘起される加算 EPSP の非線形は確認できなかった (S_{13} : 1.05 ± 0.03 ($n = 23$); S_{31} : 1.04 ± 0.04 ($n = 23$); S_{23} : 0.97 ± 0.03 ($n = 23$); S_{32} : 1.03 ± 0.04 ($n = 23$))。 *OUT* 方向における S_{31} と S_{32} の刺激では、 $\tau = 10 \text{ ms}$ の時には非線形は確認されなかったが、 $\tau = 0 \text{ ms}$ の時に非線形性が確認された。ここで、*OUT* 方向における *Line* 刺激である S_{31} と S_{32} は線形下の EPSP 加算を示した (S_{13} : 1.03 ± 0.03 ($n = 22$); S_{31} : 0.89 ± 0.07 ($n = 4$); S_{23} : 1.03 ± 0.03 ($n = 22$); S_{32} : 0.86 ± 0.08 ($n = 4$); t-test, $P < 0.05$)。

異なる刺激間隔 ($\tau = 0, 5, 10 \text{ ms}$) で等距離 ($d_1, d_2 = 5, 10 \mu\text{m}$) での *Branch* 刺激の結果は図 5.5 に示した。 S_1 と S_2 の site 1 と site 2 の位置は $\tau = 5 \text{ ms}$ の際の S_{12} によって誘起される加算 EPSP が S_{21} によって誘起されるそれよりも大きくなるような場合に定義した。 S_{12} と S_{21} の measured EPSP 間で有意差が確認された (Fig. 6A, $P < 0.05$, $d_1, d_2 = 5 \mu\text{m}$)。 $\tau = 0 \text{ ms}$ の時の距離が $5 \mu\text{m}$ と $10 \mu\text{m}$ 両方の場合に

において増加率に有意差が見られたが、一方で、 $\tau = 5$ ms と 10 ms の際には有意差は見られなかった (図 6.5A、図 6.5B) ($d_1, d_2 = 5$ μm : $\tau = 0$ ms, $S_{12,21}$: 1.22 ± 0.05 ($n = 7$); $\tau = 5$ ms, $S_{12}(\text{large})$: 1.06 ± 0.08 ($n = 7$), $S_{21}(\text{small})$: 0.84 ± 0.07 ($n = 7$); $\tau = 10$ ms, $S_{12}(\text{large})$: 0.99 ± 0.06 ($n = 7$), $S_{21}(\text{small})$: 0.98 ± 0.04 ($n = 7$); $d_1, d_2 = 10$ μm : $\tau = 0$ ms, $S_{12,21}$: 1.19 ± 0.03 ($n = 14$); $\tau = 5$ ms, $S_{12}(\text{large})$: 1.04 ± 0.04 ($n = 13$), $S_{21}(\text{small})$: 0.97 ± 0.05 ($n = 13$); $\tau = 10$ ms, $S_{12}(\text{large})$: 1.03 ± 0.05 ($n = 13$), $S_{21}(\text{small})$: 1.04 ± 0.04 ($n = 13$))。興味深いことに、 $\tau = 5$ ms で $d_1 = d_2 = 5$ μm の Branch 刺激の場合にのみ S_{12} と S_{21} の measured EPSP の増加率に有意差が見られた (図 5.6A) ($P < 0.05$)。 $\tau = 5$ ms で $d_1 = d_2 = 5$ μm の Branch 刺激では優位な増加率の違いが見られたが、 S_{12} と S_{21} 共に有意な非線形はみられない。この結果は、5 μm と 10 μm の両方で距離での重畳 EPSP は $\tau = 0$ ms のみで誘起されたことを示す。

5.3 超線形的増加の分子メカニズム

Branch 刺激の加算 EPSP の超線形的増加した加算 EPSP の基礎的分子メカニズムを決定するために、2 種類のチャネル遮断薬である AP-5 と Ni^{2+} がバスアプリケーションされた環境下で非線形を計測した。実験は $\tau = 0$ ms で $d_1 = d_2 = 10$ and 20 μm の条件下で行った。図 5.7A は標準化した EPSP の時間変化を表している (ダークグレイ: measured EPSP, ライトグレイ: EPSP linear summation)。チャネルブロッカブロッカーの投与下で、コントロールの EPSP linear sum を基準として EPSP の軌跡を標準化した。図 5.7B は $d_1 = d_2 = 10$ μm の場合での薬理効果のまとめを示している。ACSF に DL-AP5 を加えるにあたって、平均ピーク値の大きさは若干小さくなったが、measured EPSP の超線形性は観察され、コントロール条件下比べて有意差は見られなかった。一方で、 Ni^{2+} 投与下ではコントロール条件と比べ超線形性の優位な減少が見られ (ANOVA, $P < 0.05$)、 Ni^{2+} と DL-AP5 の両方の投与下では、より大きな優位な減少が見られた (ANOVA, $P < 0.01$) ($d_1, d_2 = 10$ μm : control: 1.24 ± 0.03 ($n = 47$); AP5: 1.21 ± 0.04 ($n = 8$); Ni^{2+} : 1.04 ± 0.03 ($n = 9$); Ni^{2+} +AP5: 1.01 ± 0.02 ($n = 5$))。しかしながら、 $d_1 = d_2 = 20$ μm の場合、いず

れの遮断薬の投与下でも有意差は見られなかった ($d_1, d_2 = 20 \mu\text{m}$: control: 1.08 ± 0.03 ($n = 26$); AP5: 1.04 ± 0.05 ($n = 5$); Ni^{2+} : 0.91 ± 0.09 ($n = 8$); Ni^{2+} +AP5: 0.96 ± 0.05 ($n = 4$)) (Fig. 5.7C)。

第6章 考察

6.1 まとめ

本研究では、樹状突起における時空間入力の統合を調べるために、歯状回顆粒細胞の樹状突起へ高速アンケーシングシステムを使用して、2種類のペア刺激 (*Line* 刺激と *Branch* 刺激) を施した。

まず初めに、2入力の同時刺激によって誘起した加算 EPSP における非線形性を評価した。*Line* 刺激を時間間隔 $\tau = 0$ ms で分岐点から同じ距離 ($d_1 = d_2 = d_3$; 5, 10, 20 μm) へ施した場合、分岐点から先端方向への距離を増やしても入力・出力関係に有意差は見られなかった (図 6.2)。これらの結果から遠位樹状突起から細胞体へ沿った方向への閾値以下の連続入力によって誘起された加算 EPSP は線形であった。これは過去に報告された二光子グルタミン酸アンケーシングの結果と一致しており、顆粒細胞 (Krueppel et al. 2011) と皮質の錐体細胞 (Hargreaves et al. 2005; Jackson and Scharfman 1996) でも研究されている。一方で、*Branch* 刺激を時間間隔 $\tau = 0$ ms で分岐点から同じ距離 ($d_1 = d_2 = d_3$; 5, 10, 20, 30 μm) へ施した場合、5 μm と 10 μm の刺激距離では有意差が見られ、この非線形性は距離を離していくと徐々に小さくなった (図 6.3)。これらの結果は分岐点からの分枝 10 μm 以内での入力の EPSP 統合は同時に分岐に入力が入ると増強されることが増強されることが示された。その入力統合は分岐点近傍によって増強された。Krueppel et al. (2011) らは二光子アンケーシング刺激による2本の樹状突起への入力の EPSP 統合は顆粒細胞では線形であることが報告した。Branco と Häusser (2011) もまた皮質第5層におけるコンパートメント区画での加算 EPSP の線形性を報告している。これらの報告はコンパートメント区分での樹状突起統合は線形であることを強調している。しかしながら、彼らの刺激位置は分岐点から 20 μm 以上離れており、よりスパースで、そして我々の研究よりもより遠くを刺激していた。我々の結果は分岐点を跨いだ樹状突起統合は近い距離と娘樹状突起への同時入力の両方が必要である可能性がある。それ故、樹状突起

のコンパートメント区分での分岐点近傍への同時もしくは振動した入力による非線形的な樹状突加算 EPSP は線形加算を増強する可能性がある。加えて、分岐点と細胞体間の距離 d_s での非線形性の距離依存性は Branch 刺激で計測された (図 6.4)。加算 EPSP における優位な非線形性が観察された。細胞体から分岐点までの距離が少なくとも $100 \mu\text{m}$ 以下では増強された割合の非線形性が確認された。歯状回顆粒細胞における樹状突起分岐点は近位樹状突起と中位樹状突起では広く分布しており、遠位部ではスパースであることが報告されている (Claiborne et al. 1990)。よって、その結果から加算 EPSP ブーストは交差交連入力、そして嗅内皮質から遠位・中位樹状突起への入力などの様々な情報処理を行っている可能性が考えられる。約 $180 \mu\text{m}$ 離れた点でのデータは樹状突起の太さや分岐点の数などの制限によってひとつだけ得られた。

二番目にこの研究では、加算 EPSP の線形性または非線形性の時空間依存性を調べるために異なる刺激間隔と異なる距離にペア刺激を施した。Line 刺激をした際に、 $\tau = 0 \text{ ms}$ での IN 方向と OUT 方向両方での加算 EPSP は非線形性を示した (図 6.5)。しかし、 $\tau = 0 \text{ ms}$ の Line 刺激の OUT 方向での加算 EPSP は線形下であった。Branco et al. (2010, Suppl. Fig. 8) では、シナプス活性の順序選択制について報告されている、ここでは皮質錐体細胞は IN 方向の加算 EPSP は OUT 方向のそれよりも大きくなることが報告されている (Branco et al. 2010)。加算 EPSP の順序は我々と同じであったが、刺激間隔 ($\tau = 0 \text{ ms}$) は我々ようではなく、彼らの OUT 方向の加算 EPSP は超線形的であった。彼らの結果との違いは我々 (距離幅: $10\text{--}40 \mu\text{m}$, 2 刺激) よりもより広域を刺激し (距離幅: $97 \pm 20 \mu\text{m}$ (mean \pm SD), 8–10 刺激)、我々の歯状回顆粒細胞とは違って皮質錐体細胞で実験を行ったことが大きいと考えられる。我々の研究におけるペア刺激の効果は IN 方向の加算 EPSP で増加率に差がなかったため NMDA チャネルではなかった。なので、我々の刺激は連続する NMDA チャネルの活性によって誘起される誘起される累積 EPSP を引き起こさなかった。一方で、Branco ら (2010) は IN 方向、OUT 方向共に順序だったシナプス活性での NMDA チャネル活性による非線形性が示した。結果として、NMDA チャネルの活性が加算 EPSP を押し上げ、IN 方向と OUT

方向の *Line* 刺激による加算 EPSP の順序を保つことを可能にしている。

次に、異なる刺激タイミングの Branch 刺激が施された (図 6.6)。上記したように、Branch 刺激の S_{12} と S_{21} の measured EPSP 間の有意差があるので S_{12} と S_{21} は $\tau = 5$ ms の入力・出力の増加率によって決定した (図 6.6A)。この違いは娘樹状突起のサイズの不均等さによる可能性がある (Rall 1962; Kubota et al. 2011)。その結果は 5 と 10 μm の距離での重畳 EPSP において $\tau = 0$ ms でのみ誘発された。このことは、いくつかの分枝間で大きな入力統合するためには同時性が必要であることを示す。言い換えると、分枝への入力は同時に分岐樹状突起に届いた場合のみに統合されるのである。

樹状突起における EPSP の非線形加算の基本的な分子メカニズムを明らかにするために、2 種類のアнтаゴニストを ACSF 中へ加えた。超線形性は主に電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに依存し、NMDA チャンネルの影響は僅かだった。この樹状突起に沿った多点入力の方向性の結果との違いはひとつには NMDA 受容体であった (Branco et al. 2010)。考えられる可能性として、我々の実験の非線形の Ca^{2+} チャンネルの活性化であり、クランプしていた膜電位が低かった (-80 mV) ことがあげられる。歯状回顆粒細胞の樹状突起全体に Ca^{2+} チャンネルは分布している。さらに、それらのチャンネルは低いレベルで活性化する (McRory et al. 2001; Aradi and Holmes 1999)。 Ca^{2+} チャンネルが分岐点周辺に同時入力による増強された EPSP に影響されることはあり得る。

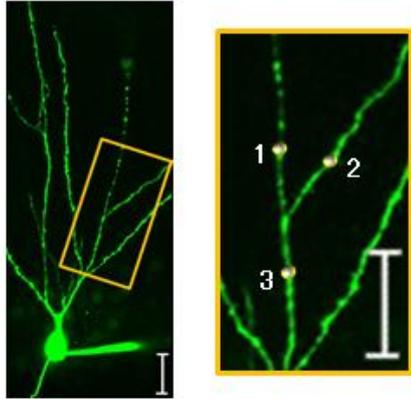
顆粒細胞の樹状突起は海馬錐体細胞の樹状突起とは形態学的も受動的電気特性も異なる (Amaral et al. 2007; Jaffe and Carnevale 1999; London and Häusser 2005; Schmidt-Hieber et al. 2007)。特に、シナプス入力統合から発火をさせにくくするような細胞内での強い電位減衰が存在している (Krueppel et al. 2011)。顆粒細胞からの出力である苔状線維は海馬門から CA3 へ投射している。一方で、海馬門内では苔状細胞へのほとんどのシナプス入力は顆粒細胞から受け、苔状細胞の軸索の 90% 以上が内分子層の顆粒細胞へ向かっている (Aradi and Holmes 1999;

Buckmaster et al. 1992; Buckmaster et al. 1996)。それ故、歯状回顆粒細胞と歯状回門苔状細胞はポジティブフィードバックの回路を持つような回帰結合があり、「回帰興奮性」の形式として考えられている(Jackson and Scharfman 1996)。さらに、歯状回門苔状細胞は歯状回顆粒細胞の興奮性を制御する可能性があることが報告されている(Jinde et al. 2013)。なので、本研究で見つかった近位樹状突起での非線形性も苔状細胞からのポジティブフィードバックを促進し、顆粒細胞への入力統合をサポートする可能性がある。

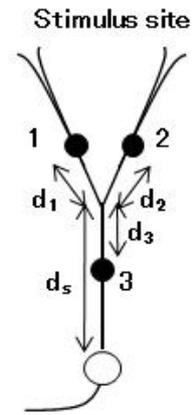
分子層中位部への樹状突起の入力は内側嗅内皮質第 II 層を起源とし、MPP を通り入力している(Nishimura-Akiyoshi et al. 2007)。内側嗅内皮質の主な細胞である星状細胞は閾値以下で持続的なりズミカルな電位振動をシータ周期幅で作出す(Alonso and Klink 1993; Tahvildari and Alonso 2005)。よって本研究における中位樹状突起への分岐同時で誘発される入力による非線形性は、強い電位減衰を持つ樹状突起において振動入力の同相性を促進していて、同時検出器 (coincident detector) として動いている可能性がある。加えて、空間情報は中位樹状突起へ運ばれている(Fyhn et al. 2004; Hayman and Jeffery 2008)。今回の場合では、分岐点周辺の入力相性の非線形性は空間情報を高めている可能性が考えられる。一方で、非空間情報は遠位樹状突起に伝わっており(Hargreaves et al. 2005; Yoganarasimha et al. 2011)、ここでの入力相性の非線形性は非空間情報も増強している可能性がある。

分岐点周辺へのシナプス入力の EPSP 加算和における非線形性は NMDA チャネルへの入力増強のような直接的で強い影響は持たない(Branco and Häusser 2011)。しかし、我々の非線形性に関する発見は樹状突起での情報統合や符号化に分岐点周辺の増強が重要であることを示唆していると考えられる。我々は、この非線形性がポジティブフィードバックや振動入力の同時検出器としてシナプス入力統合に関して重要な働きを果たしていると考えている。

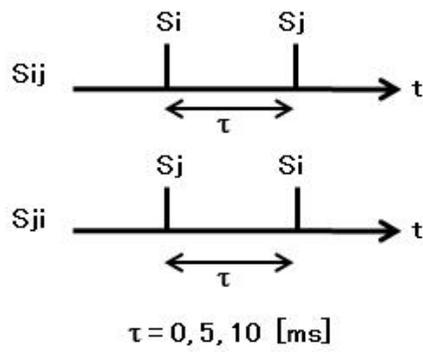
A



B



C



D

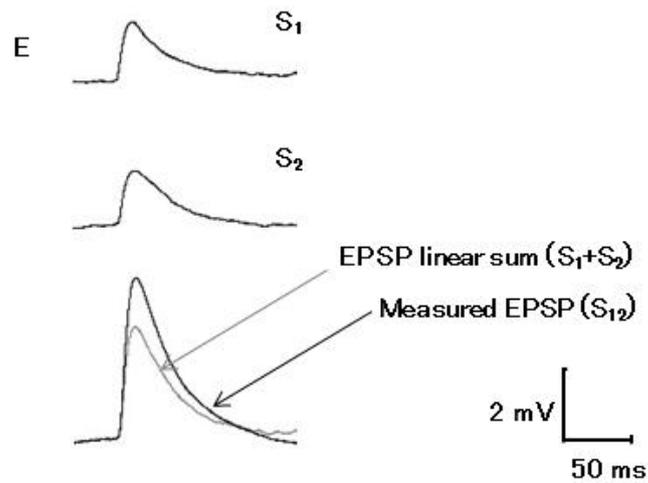
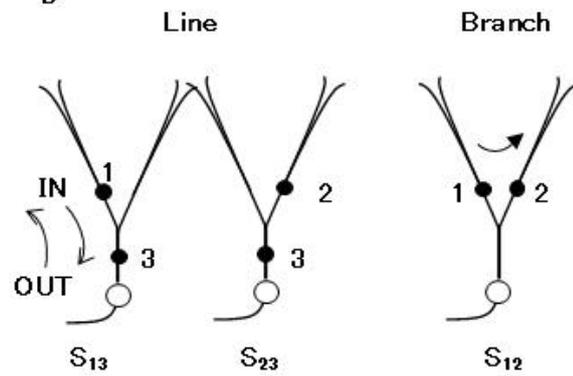


Fig. 4.1 Experimental method and measurement

(A) Left: example imaging of a dentate granule cell filled with Alexa Fluor 488. Rectangular box indicates dendrites selected for experiment. Right: selected dendrites with three glutamate uncaging spots (1, 2, and 3), which are expanded in the rectangular box on the left. Stimulus spots S_1 and S_2 are divided on two daughter dendrites. Scale bar: 10 μm . (B) Locations of three stimulus sites (1, 2, and 3) around a dendritic branching point. d_1 , d_2 , d_3 : distance from branching point to stimulus site. d_s : distance from soma to branching point. (C) Pairing stimulation. S_i , S_j : single stimulation to sites i , j ($i, j = 1, 2, 3$). S_{ji} : pairing stimulation consisting of S_i preceding S_j with interval time $\tau = 0, 5, 10$ ms). (D) Two types of pairing stimulation. Left: *Line* stimulations S_{13} and S_{23} consisting of a stimulus to site 1 or 2 and stimulation S_3 to site 3. S_{13} and S_{23} with S_1 or S_2 preceding S_3 are referred to as being in the “*IN*” direction. S_{31} and S_{32} with S_3 preceding S_1 or S_2 are referred to as being in the “*OUT*” direction. Left: *Branch* stimulation S_{12} and S_{21} consisting of stimuli to sites 1 and 2. (E) The measurement of the nonlinearity in the EPSP summation induced by pairing stimulation. Upper and middle traces: EPSP time course for a single stimulation S_i and S_j . Lower traces: measured EPSP for pairing stimulation (bold trace) and linear summation of EPSP time course for S_1 and S_2 stimulations (gray trace).

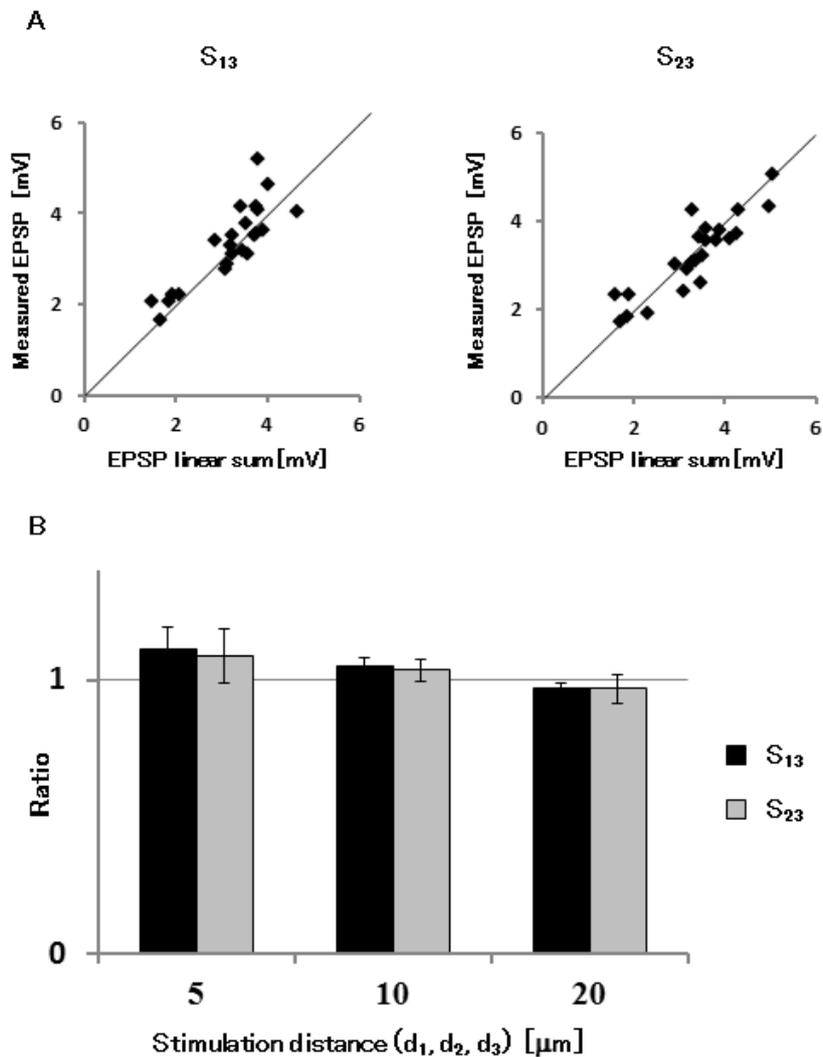


Fig. 5.2 Spatial dependence of EPSP summation in *Line* stimulation

EPSP summations induced by coincident applications of pairing inputs on dendrites of *Line* stimulations (S_{13} , S_{23}). (A) Input-output relation between the measured EPSP and the EPSP linear summation are plotted for when the pairing stimulus S_{12} and S_{23} was applied with the time interval $\tau = 0$ ms and at the same distance of 10 μm from branching point to stimulation site ($d_1 = d_2 = d_3$). (B) The ratio of the measured EPSP and the EPSP linear summation was calculated as the input-output relation by *Line* stimulations (S_{13} , S_{23}) with the time interval $\tau = 0$ ms and at the same distances from the branching point ($d_1, d_2, d_3 = 5, 10, 20 \mu\text{m}$). There was no significant nonlinear summation of EPSP. Maximum distance from soma to branching point was approximately 180 μm . Values in (B) are given as mean \pm SE.

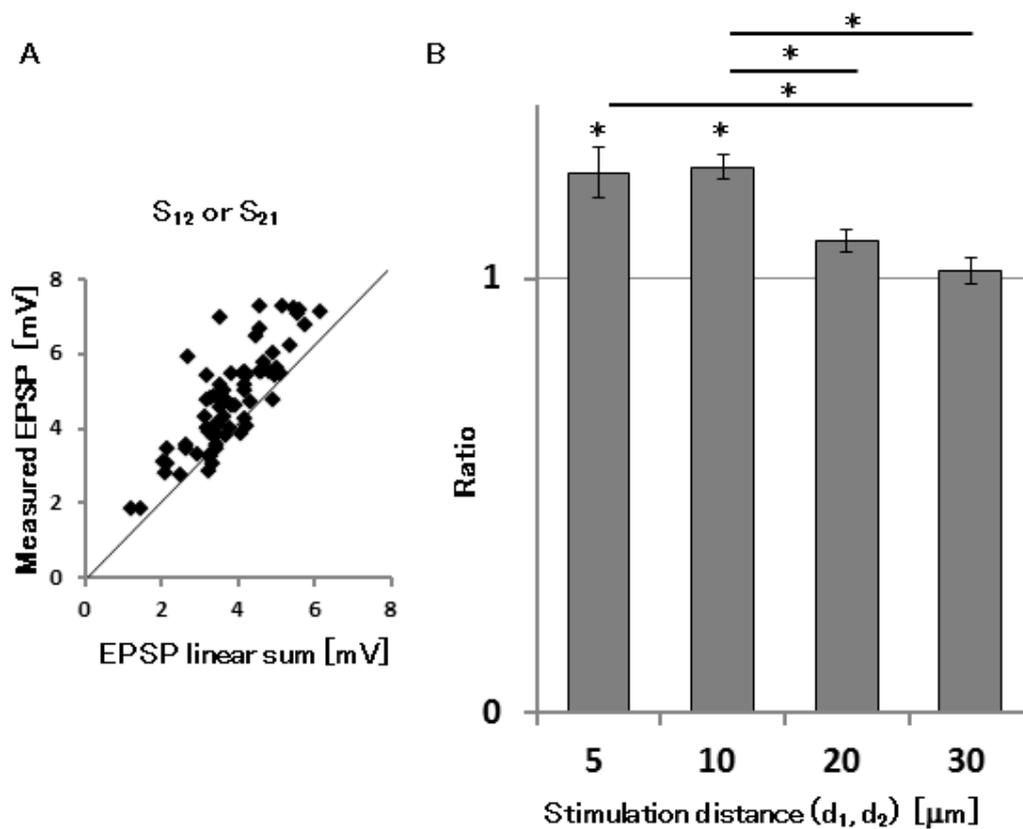


Fig. 5.3 Spatial dependence of EPSP summation in *Branch* stimulation

EPSP summations induced by coincident applications of pairing inputs on dendrites of *Branch* stimulations (S_{12} or S_{21}). (A) Input-output relation between the measured EPSP and the EPSP linear summation are plotted for when the pairing stimulus $S_{12}(= S_{21})$ was applied with the time interval $\tau = 0$ ms and at the same 10 μm distance from branching point to stimulation site ($d_1 = d_2$). (B) The ratio of the measured EPSP and the EPSP linear summation was calculated as the input-output relation by *Branch* stimulations $S_{12}(= S_{21})$ with the time interval $\tau = 0$ ms and at the same distances from the branching point ($d_1, d_2 = 5, 10, 20, 30 \mu\text{m}$). Significant nonlinearity was found for 5 and 10 μm distances (ANOVA, $P < 0.05$), and the supralinearity gradually decreased with increasing distance. Maximum distance from soma to branching point was approximately 180 μm . Values in (B) are given as mean \pm SE.

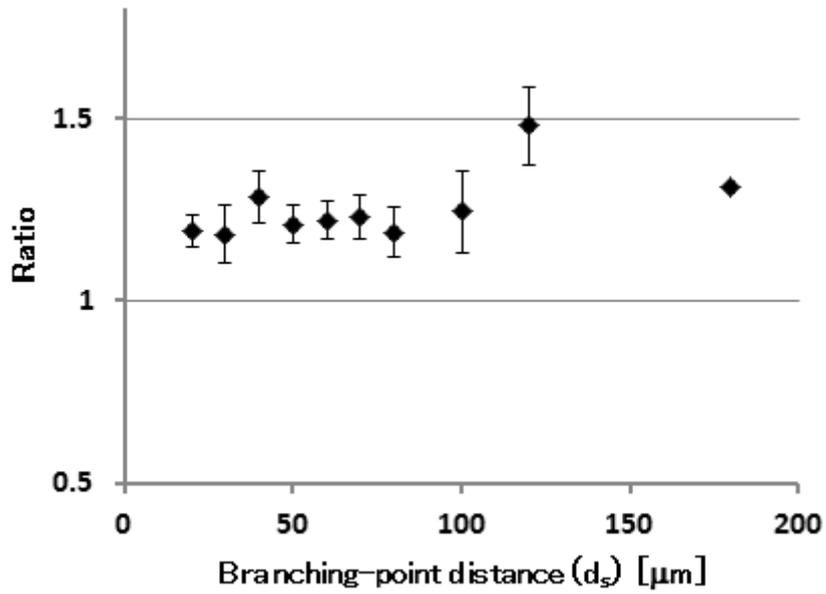


Fig. 5.4 EPSP summation dependence on distance from the soma to the branching point in *Branch* stimulation

The dependence of the nonlinearity on the distance d_s from soma to branching point was measured for *Branch* stimulation S_{12} ($d_1 = d_2 = 10\mu\text{m}$). Significant nonlinearity in EPSP summation is apparent. Regardless of the stimulus site distance from the soma, supralinearity was confirmed. The increasing ratios presenting nonlinearity stabilized at less than 100 μm distance from soma to branching point. Values are given as mean \pm SE.

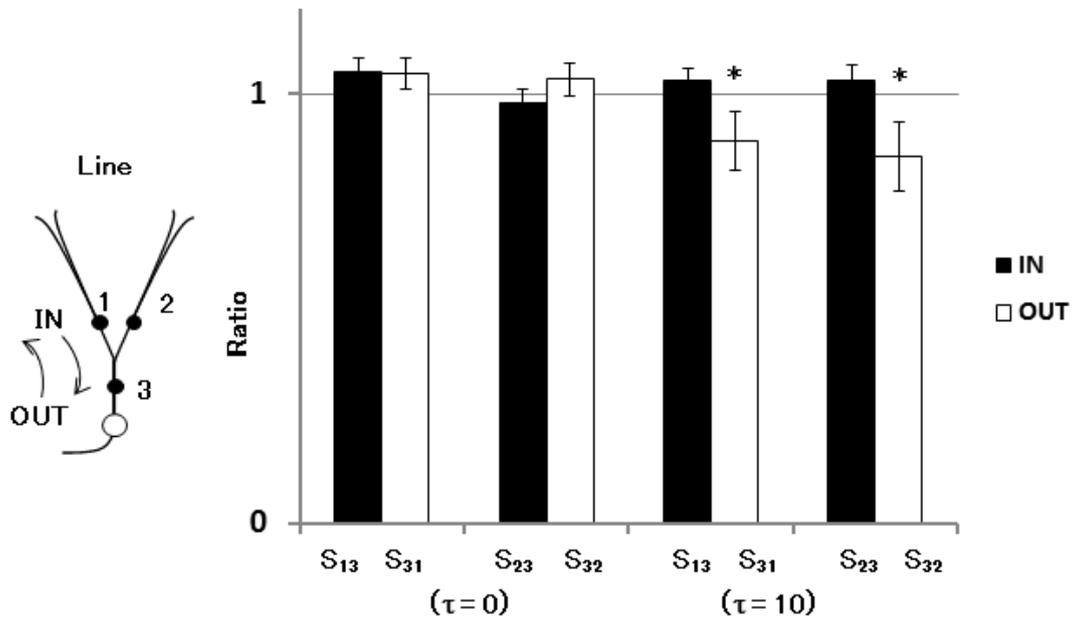


Fig. 5.5 Spatiotemporal dependence of EPSP summation in *Line* stimulation

Line stimulations (IN: S_{13} , S_{23} and OUT: S_{31} , S_{32}) were applied at different timings ($\tau = 0, 10$ ms) and at the same distances ($d_1, d_2, d_3 = 10 \mu\text{m}$). The stimulus sites 1 and 2 for S_1 and S_2 in the *Line* stimulation were decided as such when the superposed EPSP elicited by S_{13} was larger than that by S_{23} . There was significant nonlinearity in the EPSP summation at $\tau = 10$ ms, but not 0 ms, where *Line* stimulus S_{31} and S_{32} in the OUT direction showed sub-linear EPSP summation. Values are given as mean \pm SE.

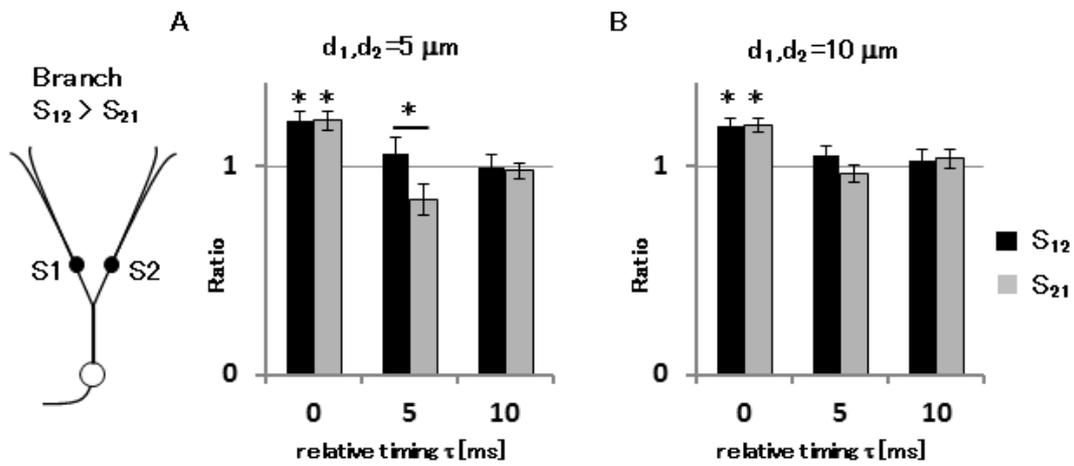


Fig. 5.6 Spatiotemporal dependence of EPSP summation in *Branch* stimulation

Branch stimulations (S_{12} , S_{21}) were applied at different timings ($\tau = 0, 5, 10$ ms) and at the same distances ($d_1, d_2 = 5, 10 \mu\text{m}$). The stimulus sites 1 and 2 for S_1 and S_2 in the *Line* stimulation were decided as such when the superposed EPSP elicited by S_{12} was larger than that by S_{21} at $\tau = 5$ ms and $d_1, d_2 = 5 \mu\text{m}$. There was a significant difference between the measured EPSPs for S_{12} and S_{21} . Results show supra-linearity of the ratio only at $\tau = 0$ ms for both 5 and 10 μm distances. There was no nonlinearity at $\tau = 5$ and 10 ms. Values in (A) and (B) are given as mean \pm SE.

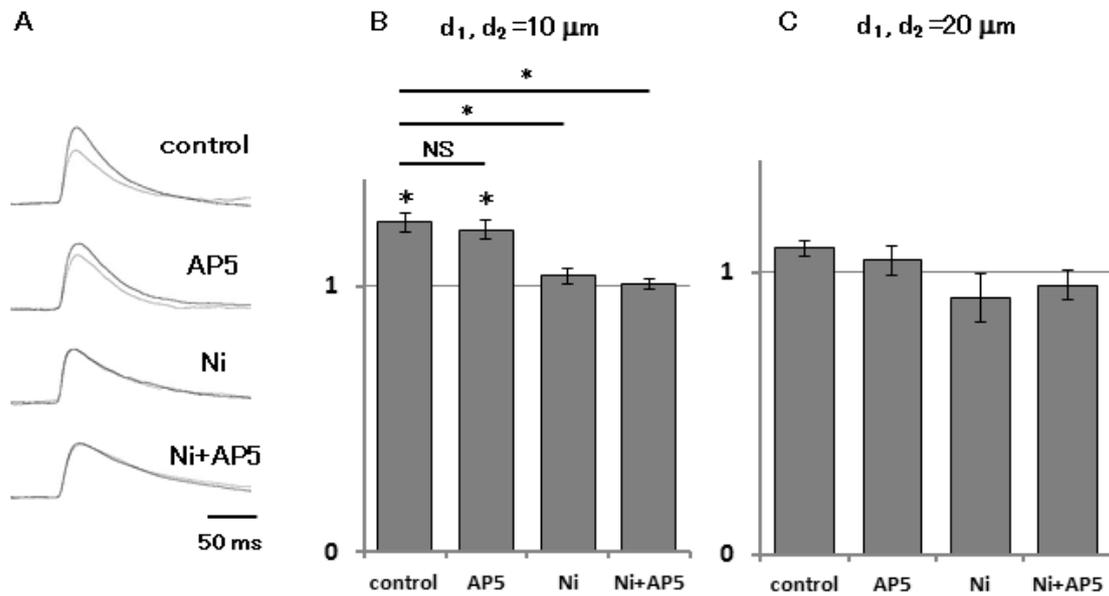


Fig. 5.7 Molecular mechanisms of supralinear amplification

The supralinear amplification of EPSP summation in *Branch* stimulations ($d_1, d_2 = 10$ or $20 \mu\text{m}$, $\tau = 0$ ms) was measured in bath application of channel blockers (DL-AP5, Ni^{2+}). (A) Standardized EPSP time courses (dark gray: measured EPSP, light gray: EPSP linear summation). (B) Significant difference with the control condition at $10 \mu\text{m}$ distance (ANOVA, $P < 0.05$). There was also greater significant difference in the presence of both Ni^{2+} and DL-AP5 (ANOVA, $P < 0.01$). (C) No significant differences (d_1, d_2) in any of the application conditions. Values in (B) and (C) are given as mean \pm SE.

謝辞

本研究を進めるにあたり、非常に多くの方々にお世話になりましたことをここに改めて感謝したいと思います。まず、実験方法や方針など、熱心にご指導して下さった指導教官である相原 威 教授に深く感謝いたします。相原教授には実験や論文に関すること以外にも本学入学から大変お世話になりました。そして、本研究を進めるに当って高速アンケートングシステムを導入し、実験に関するアドバイスや論文執筆に関して的確なアドバイスを頂いた玉川大学の塚田 稔 名誉教授にも深く感謝いたします。高速アンケートングシステムを使用するに当って使用許可を頂き、本学の脳科学研究所での動物実験に関して大変お世話になりました磯村 宜和 教授にも感謝申し上げます。合わせて磯村研究室の木村 梨絵さん、斉木 愛希子さん、大野 幸子さんにも感謝いたします。また実験装置の使用法、実験技術、論文執筆について多くのアドバイスを下さいました川崎医療福祉大学の福島 康弘さんにも深く感謝申し上げます。実験技術や薬理に関するご意見を頂いた山形大学の藤井 聡 教授、山崎 良彦 准教授、藤原 浩樹さんにもあわせて感謝いたします。また、解析方法や論文執筆に関してアドバイスをしてくださった大阪大学工学研究科 高橋 英之さん、共に研究室メンバーと特に実験を一緒に行い、論文の共著者でもある脳情報研究科博士課程後期の早川 博章さんへ感謝を送りたいと思います。

そして、本論文執筆にあたりご尽力くださったニューヨーク大学の西山 誠先生に感謝の意を表し、また、ご冥福をお祈りします。

最後に本論文を作成にあたって日頃からご支援を頂いた玉川大学脳科学研究所の皆様、同じく玉川大学学術研究所のスタッフの皆様にも大変感謝しております。

本研究は、玉川大学グローバル COE プログラム、及び文部省科研費(19200014, 20500278)からの援助を受けて行われた。

参考文献

- Alonso A, Klink R (1993) Differential electroresponsiveness of stellate and pyramidal-like cells of medial entorhinal cortex layer II. *Journal of neurophysiology* 70 (1):128-143
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research* 163:3-22. doi:10.1016/S0079-6123(07)63001-5
- Andersen P, Bliss TV, Skrede KK (1971) Lamellar organization of hippocampal pathways. *Experimental brain research* 13 (2):222-238
- Aradi I, Holmes WR (1999) Role of multiple calcium and calcium-dependent conductances in regulation of hippocampal dentate granule cell excitability. *Journal of computational neuroscience* 6 (3):215-235
- Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (24):10464-10472
- Bodian D (1965) A Suggestive Relationship of Nerve Cell Rna with Specific Synaptic Sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 53:418-425
- Branco T, Clark BA, Häusser M (2010) Dendritic discrimination of temporal input sequences in cortical neurons. *Science* 329 (5999):1671-1675. doi:10.1126/science.1189664
- Branco T, Häusser M (2010) The single dendritic branch as a fundamental functional unit in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 20 (4):494-502. doi:10.1016/j.conb.2010.07.009
- Branco T, Häusser M (2011) Synaptic integration gradients in single cortical pyramidal cell dendrites. *Neuron* 69 (5):885-892. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.006
- Branco T, Staras K, Darcy KJ, Goda Y (2008) Local dendritic activity sets release probability at hippocampal synapses. *Neuron* 59 (3):475-485. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.006
- Buckmaster PS, Strowbridge BW, Kunkel DD, Schmiede DL, Schwartzkroin PA (1992) Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat

- hippocampal slice. *Hippocampus* 2 (4):349-362. doi:10.1002/hipo.450020403
- Buckmaster PS, Wenzel HJ, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1996) Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *The Journal of comparative neurology* 366 (2):271-292
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1990) Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 302 (2):206-219. doi:10.1002/cne.903020203
- Dan Y, Poo MM (2006) Spike timing-dependent plasticity: from synapse to perception. *Physiological reviews* 86 (3):1033-1048. doi:10.1152/physrev.00030.2005
- Frey U, Morris RG (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385 (6616):533-536. doi:10.1038/385533a0
- Frick A, Magee J, Johnston D (2004) LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nature neuroscience* 7 (2):126-135. doi:10.1038/nn1178
- Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305 (5688):1258-1264. doi:10.1126/science.1099901
- Hao J, Wang XD, Dan Y, Poo MM, Zhang XH (2009) An arithmetic rule for spatial summation of excitatory and inhibitory inputs in pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51):21906-21911. doi:10.1073/pnas.0912022106
- Hardie J, Spruston N (2009) Synaptic depolarization is more effective than back-propagating action potentials during induction of associative long-term potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (10):3233-3241. doi:10.1523/jneurosci.6000-08.2009
- Hargreaves EL, Rao G, Lee I, Knierim JJ (2005) Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science* 308 (5729):1792-1794. doi:10.1126/science.1110449
- Hayman RM, Jeffery KJ (2008) How heterogeneous place cell responding arises from homogeneous grids--a contextual gating hypothesis. *Hippocampus* 18 (12):1301-1313. doi:10.1002/hipo.20513
- Hebb DO (1949) *The Organization of Behavior*. Wiley,

- Jackson MB, Scharfman HE (1996) Positive feedback from hilar mossy cells to granule cells in the dentate gyrus revealed by voltage-sensitive dye and microelectrode recording. *Journal of neurophysiology* 76 (1):601-616
- Jaffe DB, Carnevale NT (1999) Passive normalization of synaptic integration influenced by dendritic architecture. *Journal of neurophysiology* 82 (6):3268-3285
- Jinde S, Zsiros V, Nakazawa K (2013) Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell excitability. *Frontiers in neural circuits* 7:14. doi:10.3389/fncir.2013.00014
- Kojima H, Simburger, E., Boucsein, C., Maruo, T., Tsukada, M., Okabe, S., Aertsen, Ad. (2006) Development of a system for patterned rapid photolysis and 2-photon confocal microscopy. *IEEE Circuit and Device (Laser and Electro-optical Society) Magazine* 22 (6):66-74
- Krueppel R, Remy S, Beck H (2011) Dendritic integration in hippocampal dentate granule cells. *Neuron* 71 (3):512-528. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.043
- Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain research bulletin* 13 (1):39-42
- Kubota Y, Karube F, Nomura M, Gullledge AT, Mochizuki A, Schertel A, Kawaguchi Y (2011) Conserved properties of dendritic trees in four cortical interneuron subtypes. *Scientific reports* 1:89. doi:10.1038/srep00089
- London M, Häusser M (2005) Dendritic computation. *Annual review of neuroscience* 28:503-532. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135703
- Losonczy A, Makara JK, Magee JC (2008) Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452 (7186):436-441. doi:10.1038/nature06725
- Ludwig M, Pittman QJ (2003) Talking back: dendritic neurotransmitter release. *Trends in neurosciences* 26 (5):255-261. doi:10.1016/S0166-2236(03)00072-9
- McRory JE, Santi CM, Hamming KS, Mezeyova J, Sutton KG, Baillie DL, Stea A, Snutch TP (2001) Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 276 (6):3999-4011. doi:10.1074/jbc.M008215200
- Moncada D, Viola H (2007) Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *The Journal of*

- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27 (28):7476-7481. doi:10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007
- Nishimura-Akiyoshi S, Niimi K, Nakashiba T, Itohara S (2007) Axonal netrin-Gs transneuronally determine lamina-specific subdendritic segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (37):14801-14806. doi:10.1073/pnas.0706919104
- Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo MM, Kato K (2000) Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 408 (6812):584-588. doi:10.1038/35046067
- Oesch N, Euler T, Taylor WR (2005) Direction-selective dendritic action potentials in rabbit retina. *Neuron* 47 (5):739-750. doi:10.1016/j.neuron.2005.06.036
- Rall W (1962) Electrophysiology of a dendritic neuron model. *Biophysical journal* 2 (2 Pt 2):145-167
- Regehr WG, Carey MR, Best AR (2009) Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron* 63 (2):154-170. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.021
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2007) Subthreshold dendritic signal processing and coincidence detection in dentate gyrus granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (31):8430-8441. doi:10.1523/JNEUROSCI.1787-07.2007
- Sjostrom PJ, Rancz EA, Roth A, Hausser M (2008) Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiological reviews* 88 (2):769-840. doi:10.1152/physrev.00016.2007
- Tahvildari B, Alonso A (2005) Morphological and electrophysiological properties of lateral entorhinal cortex layers II and III principal neurons. *The Journal of comparative neurology* 491 (2):123-140. doi:10.1002/cne.20706
- Tsukada M, Aihara T, Kobayashi Y, Shimazaki H (2005) Spatial analysis of spike-timing-dependent LTP and LTD in the CA1 area of hippocampal slices using optical imaging. *Hippocampus* 15 (1):104-109. doi:10.1002/hipo.20035
- Wang X, Lambert NA (2003) Membrane properties of identified lateral and medial perforant pathway projection neurons. *Neuroscience* 117 (2):485-492. doi:10.1016/s0306-4522(02)00659-0
- Yoganasimha D, Rao G, Knierim JJ (2011) Lateral entorhinal neurons are not spatially

selective in cue-rich environments. *Hippocampus* 21 (12):1363-1374.
doi:10.1002/hipo.20839

Yoneyama M, Fukushima Y, Tsukada M, Aihara T (2011) Spatiotemporal characteristics of synaptic EPSP summation on the dendritic trees of hippocampal CA1 pyramidal neurons as revealed by laser uncaging stimulation. *Cognitive neurodynamics* 5 (4):333-342. doi:10.1007/s11571-011-9158-9

研究業績

原著論文（学位審査の条件となる論文に*印を付けること）

- [1] *TC Kamijo, H Hayakawa, Y Fukushima, Y Kubota, Y Isomura, M Tskuda, T Aihara “Input integration around the dendritic branches in hippocampal dentate granule cells” Cognitive Neurodynamics. DOI : 10.1007/s11571-014-9280-6

国際会議

- [2] T Kamijo, H Hayakawa, Y Fukushima, T Aihara “Integration of different inputs in the hippocampal granule cell” 8th International Brain Research Organization, Poster session 2011年7月15日（金）Firenze, Italy
- [3] H Hayakawa, T Kamijo, Y Fukushima, T Aihara “Location dependency of information processing in the dendrite of hippocampal granule cells” 8th International Brain Research Organization, Poster session, 2011年7月15日（金）Firenze, Italy
- [4] T Kamijo, H Hayakawa, Sashi A, Y Fukushima, Hida E, T Aihara “Nonlinearity of the input integration in the dentate Granule cell”, Neuroscience2011 Society for Neuroscience Poster 2011年11月15日（火）
- [5] H Hayakawa, T Kamijo, Y Fukushima, T Kitajima, T Aihara “Different information processing depending on the dendritic locations in hippocampal granule cell” Neuroscience2011 Society for Neuroscience Poster 2011年11月15日（火）
- [6] T Kamijo, I Tsuda, Y Yamaguti, Y Fukushima, M Tsukada, T Aihara. “Cantor coding for a spatio-temporal input sequence in the hippocampal CA1” Neuroscience2012 Society for Neuroscience Poster 2012年10月13日（日）New Orleans, America
- [7] H Hayakawa, T Kamijo, Y Fukushima, H Hayashi, E Hida, T Aihara. “Spatio-temporal integration between lateral and medial dendritic inputs in hippocampal granule cell” Neuroscience2012 Society for Neuroscience Poster 2012年10月13日（日）New Orleans, America
- [8] T Kamijo, H Hayakawa, Y Fukushima, Y Kubota, Y Isomura, E Hida, T Aihara “The analysis of input integration around the dendritic branches in dentate granule cells” Neuroscience2013 Society for Neuroscience, Poster session, San Diego,

America 2013 年 11 月 6 日 (水)

- [9] H Hayakawa, T Kamijo, Y Yamazki, S Fujii, T Aihara “Spatio-temporal interaction of inputs in hippocampal granule cells” Neuroscience2013 Society for Neuroscience, Poster session, San Diego, America 2013 年 11 月 6 日 (水)

国内会議

- [10] 上條 中庸、相原 威、高橋 英之脳と心のメカニズム 第10回 冬のワークショップ ポスター発表 2010年1月12日(火)～14日(木)
- [11] 早川 博章、上條 中庸、坂田 幸介、相原 威「海馬歯状における入力情報の統合」電子情報通信学会総合大会 ポスター発表 2010年3月16日(火)～19日(金) 東北大学
- [12] 早川 博章、上條 中庸、米山誠、福島康弘、相原 威“Information processing on the dendrite hippocampal granule cell”neuro2010 ポスター発表神戸コンベンションセンター2010年9月2日(木)～9月4日(土)
- [13] 上條 中庸、早川 博章、福島 康弘、相原 威「海馬歯状回における異なる入力情報の相互作用」脳と心のメカニズム 第11回 冬のワークショップ ポスター発表 2011年1月12日(火)～14日(木) 北海道ルスツ
- [14] 早川 博章、上條 中庸、米山 誠、福島 康弘、相原 威「海馬歯状回の樹状突起における情報処理」脳と心のメカニズム 第11回 冬のワークショップ ポスター発表 2011年1月12日(火)～14日(木) 北海道ルスツ
- [15] 上條 中庸、早川 博章、福島 康弘、相原 威「海馬歯状回における異なる入力情報の相互作用」電子情報通信学会 東京支部学生研究発表会 口頭発表 2011年3月12日(土) 東京神田
- [16] 早川 博章、上條 中庸、米山 誠、福島 康弘、相原 威 「海馬顆粒細胞の樹状突起における情報処理」電子情報通信学会 東京支部学生研究発表会 口頭発表 2011年3月12日(土) 東京神田
- [17] 上條 中庸、早川 博章、福島 康弘、相原 威 “Information processing on the dendrite in hippocampal granule cells” 玉川大学・カリフォルニア工科大学ジョイントレクチャーコース ポスター発表 2011年6月7日(木) 京都
- [18] 早川 博章、上條 中庸、米山 誠、福島 康弘、相原 威 「海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起における2点間の情報処理の違い」ニューロコンピューティング研究会 口頭発表 2011年6月23日(木) 沖縄
- [19] 上條 中庸、早川 博章、福島 康弘、相原 威 “Integration of different inputs in the hippocampal granule cells” 第12回脳と心のメカニズム ポスター発表 神戸 2011年8月21日(日)
- [20] 早川 博章、上條 中庸、米山 誠、福島 康弘、相原 威 「海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起における情報処理の解析」 FIT2011 第10回情報科学技術フォーラム 口頭発表 2011年9月7日(水) 函館

- [21] T Kamijo, H Hayakawa, Y Fukushima, T Aihara “Interaction of different inputs in the rat hippocampal dentate gyrus” 第 34 回日本神経科学会 ポスター発表 2011 年 9 月 15 日 (木)
- [22] H Hayakawa, T Kamijo, Y Fukushima, T Aihara “Frequency-dependent information processing in the dendrite of hippocampal granule cells” 第 34 回日本神経科学会 ポスター発表 横浜 2011 年 9 月 15 日 (木)
- [23] T Aihara, T Kamijo, H Hayakawa “Nonlinear information processing of the dentate granule cell in hippocampus” The 26th Symposium on Biological and Physiological Engineering, Neurorobotics, Oral presentation 滋賀 2011 年 9 月 21 日 (水)
- [24] T Kamijo, H Hayakawa, Y Fukushima, Y Kubota, Y Isomura, T Aihara “Nonlinear information processing of the hippocampal dentate granule cell” Japanese Neural Network Society 2011, Poster session 2011 年 12 月 16 日 (金) 沖縄
- [25] 上條 中庸、早川 博章、福島 康弘、相原 威 「海馬樹状突起における非線形情報処理の解析」ニューロコンピューティング研究会 口頭発表 2012 年 3 月 14 日 (水) 町田
- [26] 上條 中庸、海江田 岳、早川 博章、福島 康弘、窪田 芳之、相原 威 「海馬歯状回顆粒細胞における非線形性」 “Non-linearities in the rat hippocampus dentate granule cell” 第 89 回 日本生理学会大会 ポスター発表 2012 年 3 月 29 日 (木) 松本
- [27] 上條 中庸、早川 博章、福島 康弘、窪田 芳之、磯村 宜和、相原 威 「海馬樹状突起分岐入力における非線形的情報統合の解析」2012 年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ 2012 年 7 月 26 日 (木) 仙台
- [28] 早川 博章、上條 中庸、佐村 俊和、相原 威 「海馬歯状回における空間・非空間情報の処理様式の解析」2012 年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ 2012 年 7 月 26 日 (木) 仙台
- [29] 上條 中庸、早川 博章、福島 康弘、窪田 芳之、磯村 宜和、相原 威 “Supralinearity of input integration at dendritic branches in dentate granule cells” 「歯状回顆粒細胞における樹状突起分岐での入力統合の超線形性」日本神経回路学会 第 22 回全国大会 ポスター発表 2012 年 9 月 13 日 (木) 名古屋
- [30] 早川 博章、上條 中庸、佐村 俊和、相原 威 「海馬顆粒細胞の樹状突起部に依存した情報処理」日本神経回路学会 第 22 回全国大会 ポスター発表 2012

年9月13日(木)名古屋

- [31] 上條 中庸、早川 博章、福島 康弘、窪田 芳之、磯村 宜和、相原 威「海馬顆粒細胞樹状突起分岐周辺の入力統合の解析 脳と心のメカニズム 第13回 冬のワークショップ 2013年1月9日(水) ポスター発表 北海道ルスツ
- [32] 早川 博章、上條 中庸、佐村 俊和、相原 威「海馬歯状回における入力情報の相互作用」脳と心のメカニズム 第13回 冬のワークショップ 2013年1月9日(水) ポスター発表 北海道ルスツ
- [33] 早川 博章、上條 中庸、佐村 俊和、相原 威 「海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起上における空間情報・非空間情報の相互作用」ニューロコンピューティング研究会 口頭発表 2013年1月25日(水) 北海道
- [34] 上條 中庸、山口 裕、福島 康弘、津田 一郎、塚田 稔、相原 威 “The dependency for spatial input pattern in Cantor coding using laser uncaging system” Neuro 2013 ポスター発表 2013年6月22日(土) 名古屋
- [35] 早川 博章、上條 中庸、佐村 俊和、相原 威 「海馬歯状における空間情報処理メカニズム」 Neuro 2013 ポスター発表 2013年6月21日(金) 名古屋
- [36] 上條 中庸、山口 裕、福島 康弘、津田 一郎、塚田 稔、相原 威 「レーザーアンケーシングによるカントールコーディングにおける空間入力様式の依存性」2013年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ ポスター発表 2013年8月31日(土) 名古屋
- [37] 早川 博章、上條 中庸、佐村 俊和、相原 威「海馬歯状における空間情報処理メカニズム」2013年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ ポスター発表 2013年8月31日(土) 名古屋
- [38] 早川博章、上條中庸、佐村俊和、相原威、海馬歯状回顆粒細胞における非空間情報が空間情報に与える影響の解析、ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2013年9月13日 2013、口頭発表 東京
- [39] T Kamijo, H Hayakawa, Y Fukushima, Y Kubota, Y Isomura, T Aihara “The input integration around the dendritic branches in dentate granule cells” 脳と心のメカニズム 第13回 冬のワークショップ 2014年1月9日(水) ポスター発表 北海道ルスツ