

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」

平成 21 年度採択研究代表者

川口 泰雄

自然科学研究機構生理学研究所・教授

大脳領域間結合と局所回路網の統合的解析

§ 1. 研究実施の概要

本研究チームでは、大脳の局所回路構築原理を理解するために、前頭皮質では、(1) 皮質外投射する錐体細胞サブタイプとそれらから作られる出力モジュールの同定と、(2) ニューロンタイプごとの樹状突起構造とシナプス分布の定量解析を行い、代表的な皮質外投射先である基底核では、(3) その内部回路が多様な皮質・視床入力に依存してどのように組織化されているかを調べる。これらを合わせて、ニューロンタイプ、局所回路、大脳システムという、3つの異なる階層を繋ぐ努力をしていく。これまでに行ってきた、新皮質や線条体の GABA 作動性細胞の形態・生理・分子発現によるニューロンサブタイプ同定や、それらのシナプス結合様式解析での経験を生かして研究を進める。今年度は、以下のような解析を進めた。(1) 前頭皮質領野分化を理解するための最初の段階として、一次・二次運動野の生理的・組織化学的同定法を確立した。(2) 皮質領域間結合に依存した局所回路分化を理解することを目指して、前頭皮質から嗅周皮質へ投射する錐体細胞の多様なサブタイプを同定した。(3) 局所回路・振動現象・ニューロモジュレーターの関係を知るために、皮質 GABA 細胞の発火とガンマ振動との関係やセロトニン受容体発現を解析した。(4) 新皮質ニューロンの樹状突起構造を機能的に理解するために、その定量的形態パラメータを取得した。(5) 線条体への入力や基底核内結合を単一ニューロンレベルで理解するために、GFP 発現ウィルスを使って、視床や線条体細胞の軸索分布を定量的に解析した。(6) 局所回路解析に有用な、線条体パルブアルブミン細胞の樹状突起が選択蛍光標識された遺伝子改変動物を作成した。今後、前頭皮質と基底核のサブネットワーク解析と合わせることで、大脳局所回路とそれらをつなぐループ結合の機能理解に貢献していきたい。

§ 2. 研究実施体制

(1)川口グループ

①研究分担グループ長:川口 泰雄 (自然科学研究機構生理学研究所、教授)

②研究項目

1. ラット運動関連領野の同定
2. 嗅周皮質投射錐体細胞の層分布解析
3. 皮質 FS 細胞の発火とガンマ振動との関係

(2)窪田グループ

①研究分担グループ長:窪田 芳之 (自然科学研究機構生理学研究所、准教授)

②研究項目

1. 非錐体細胞樹状突起構造の定量化とモデル化

(3)藤山グループ

①研究分担グループ長:藤山 文乃 (京都大学大学院、准教授)

②研究項目

1. 遺伝子組み換えウイルスを用いた線条体・視床下核・視床の髄板内核の単一神経トレース
2. 線条体のパルプアルブミン陽性細胞樹状突起を標識する遺伝子組み換え動物の開発

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

「大脳の局所回路構築原理を理解するために、前頭皮質では、(1) 皮質外投射する錐体細胞サブタイプとそれらから作られる出力モジュールの同定と、(2) ニューロンタイプごとの樹状突起構造とシナプス分布の定量解析を行い、代表的な皮質外投射先である基底核では、(3) その内部回路が多様な皮質・視床入力に依存してどのように組織化されているかを調べる。これらを合わせて、ニューロンタイプ、局所回路、大脳システムという、3つの異なる階層を繋ぐ努力をしていく。」という全体研究目標に従って、初年度は以下の研究項目を実施した。

(1) ラット運動関連領野の同定

げっ歯類の運動関連皮質は、一次運動野(M1)とその吻側に位置する二次運動野(M2)の少なくとも二つの領域から構成される。M1/M2 の皮質外投射と局所回路の関係を比較解析することは、M1/M2 の機能分担や、更には、前頭皮質領野分化を理解するのに重要である。そこで、今年度は、この二つの領域同定法を確立した。M1 と考えられる領域では、微小電流刺激で四肢やヒゲの動きを誘起できたが、M2 に相当する領域では容易には運動を誘起できなかった。微小電流刺激による運動誘発で決めた M1,M2 領野は、ニューロフィラメントの免疫染色パターンの違いでも同定

できることがわかった。

(2) 嗅周皮質投射錐体細胞の層分布解析

皮質間結合の一つに新皮質海馬投射があり、これは陳述記憶の形成に重要な働きをされると考えられている。しかし、新皮質から海馬へは多くの場合直接投射ではなく、嗅周皮質を介して行われる。皮質領域間・皮質下投射結合に依存した新皮質局所回路分化を理解することを目指して、この前頭皮質から嗅周皮質へ投射する錐体細胞の多様性を調べた。

前頭皮質の錐体細胞投射サブタイプは、標的部位への蛍光トレーサー注入による逆行性標識で同定した。投射部位二カ所への軸索分枝様式の解析には、異なる蛍光の二種類のトレーサーを用いた。前頭皮質から嗅周皮質へ投射する細胞は2/3層上部、5層上部、6層に分布していた。2/3層上部のものはカルシウム結合蛋白質のカルビンディンを発現し、その一部は扁桃体へも投射していた。一方、5層上部のものは対側線条体に投射しており、脳幹の橋への投射は見られなかった。視床投射細胞は5層上部にみられたが、同じ5層上部の嗅周皮質投射細胞とは重ならず、橋投射細胞の一部であった。(2009年11月北米神経科学学会発表)

(3) 皮質 FS 細胞の発火とガンマ振動との関係 [原書論文 (1)]

統合失調症や鬱病などの精神疾患では、前頭皮質セロトニン系の異常が考えられている。これらの疾患では前頭皮質の電氣的同期活動変化も報告されているが、セロトニンの皮質振動系における役割はよくわかっていない。麻酔したラットで背側縫線核を電気刺激すると、徐波 UP の時間が長くなり、強い刺激を与えると脱同期化した。新皮質に発現する主要なセロトニン受容体である2Aタイプ拮抗薬の全身的投与で、局所電場電位の徐波・ガンマ波ともに減弱したのに対して、1Aタイプの拮抗薬ではガンマ波の増強が見られた。新皮質の GABA 作働性ニューロンの主要なサブタイプである FS 細胞は皮質ガンマ波と同期して発火することが報告されており、その生成に深く関与すると考えられている。背側縫線核刺激によって一部の FS 細胞でみられる抑制は1Aタイプの拮抗薬によって減少した。一方、1Aタイプ拮抗薬によるガンマ振動増強に対応して、この振動と FS 細胞発火との同期が強くなることがみられた。

セロトニン1A、2A受容体の mRNA 発現を FS 細胞に対応するパルブアルブミン陽性細胞で調べると、両受容体ともに一部のパルブアルブミン細胞に見られたが、1A、2A受容体の両方を発現するパルブアルブミン細胞は少なかった。一方、錐体細胞では発現する2C受容体は殆どみられなかった。これらから、徐波生成がセロトニン2A受容体に依存することや、ガンマ振動がパルブアルブミン FS 細胞の1A、2A受容体を介して調節される可能性が明らかになった。

(4) 非錐体細胞樹状突起構造の定量化とモデル化

大脳皮質の局所神経回路の機能構造を解明するために、その構成要素である神経細胞の素子としての特性を解析する。特に、信号を受け統合する役割を担っている樹状突起の形態的な特徴を慎重に抽出し、それを元に神経細胞の正確な数理モデルを構築し、シミュレーション実験によ

って神経細胞の持つ信号伝導の特性を明らかにする。

そのために、以下のことを行っている。①大脳皮質の単一神経細胞を電気生理的および形態学的手法を用い同定し染色する。その神経細胞を光学顕微鏡で観察し樹状突起の立体的な伸展様式を解析する。その後、電子顕微鏡を用いて、連続切片上の染色された樹状突起の像から3次元再構築像をコンピュータにより作成し、その像を計測する事で高信頼性のある生体データを取得する。②そうして得た解剖生理学的知見を基盤に、皮質局所神経回路を構成する各種の神経細胞のシミュレーションモデルを構築し、信号伝導の効率性を解析する。

これまでに、次のような樹状突起の太さを決める形態法則を抽出した。

- 1) 樹状突起の太さは、そこから伸びている樹状突起の総延長と比例する。
- 2) 分岐部分では、親樹状突起の断面積と2つの娘樹状突起の断面積の和は等しい。
- 3) 樹状突起の断面は、楕円である。

今後、これらの法則を満たした、実際の形態特性をそっくり再現した非錐体細胞のモデル細胞を作製し、シミュレーション実験を行う予定である。(2009年11月北米神経科学学会発表)

(5) 遺伝子組み換えウイルスを用いた線条体・視床下核・視床髄板内核の単一神経トレース

大脳基底核内部回路の正確な解析には、単一神経レベルでの軸索投射を調べる必要がある。細胞膜に移行するシグナル (palmitoylation site) を付けた蛍光タンパク質 palGFP を発現するウイルスベクターをニューロンの細胞体・樹状突起に感染させ、順行性に軸索を可視化することにより、単一ニューロントレースを行っている。以下のような知見を得つつある。

(a) 視床線条体投射様式

視床線条体投射のうち、髄板内核群、特に束傍核からのものはマトリクス領域を好んで投射する。また、正中線核群からのものはパッチ領域を好んで投射するものが多く、大脳皮質のみならず視床からの投射もパッチ・マトリクス固有の経路が存在することが考えられる(2010年3月解剖学会発表)。

(b) 線条体パッチ・マトリクスからの出力

パッチ領域にも間接路ニューロンが存在すること、パッチ直接路ニューロンは全て、ドーパミンニューロンが存在する黒質緻密部に投射するが、マトリクスのニューロンが同部位に投射することはないことなどを見つけた。

(6) 線条体のパルブアルブミン陽性細胞樹状突起を標識する遺伝子組み換え動物の開発

局所回路解析には、タイプが同定された単一ニューロン全体像の標識が極めて有用である。(5) で用いたタンパク質を用いてパルブアルブミン発現線条体インターニューロンサブグループの樹状突起が GFP でゴルジ染色様に標識された遺伝子改変動物を作成した。このマウスと、小胞性グルタミン酸トランスポーターの免疫組織科学を用いて、このインターニューロンが皮質や視床からどのような入力を受けるのかを解析中である(2010年3月解剖学会発表)。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Puig MV, Watakabe A, Ushimaru M, Yamamori T, Kawaguchi Y: Serotonin modulates fast-spiking interneuron and synchronous activity in the rat prefrontal cortex through 5-HT1A and 5-HT2A receptors. *J Neurosci* 30: 2211–2222, 2010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3335-09.2010.