

虫明 元

東北大学大学院医学系研究科・教授

中枢神経系局所回路の状態遷移としての動的情報変換の解明

§ 1. 研究実施体制

(1) グループ全体

- ① 虫明元, 八尾寛, 小山内実, 柳川右千夫
- ② 研究項目 (光遺伝学的神経機能能評価系の構築)
 - ・光遺伝学的神経機能能評価系の構築

(2) 虫明グループ

- ① 研究代表者: 虫明 元 (東北大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目 (前頭葉皮質の動的状態遷移の解明と多機能電極開発)
 - ・前頭前野内側部の動的表現機構の解析
 - ・両手順序動作制御における神経活動の動的情報表現
 - ・オブジェクト操作課題における神経活動の動的情報表現

(3) 八尾グループ

- ① 主たる共同研究者: 八尾寛 (東北大学大学院生命科学研究科、教授)
- ② 研究項目 (オプトジェネティクスツールの最適化と海馬における状態遷移機構の解明)
 - ・オプトジェネティクスツールの最適化
 - ・海馬における状態遷移機構の解明

(4) 小山内グループ (東北大学医学系研究科保健学専攻)

- ① 主たる共同研究者: 小山内実 (東北大学大学院医学系研究科、准教授)
- ② 研究項目 (動的イメージング計測による状態遷移機構の解明とモデル化)

大脳皮質—基底核ループの状態遷移機構の解明

- in vitro カルシウムイメージングによる、ニューロン活動のアンサンブル計測
- 生理学的な現象の背景になる神経機構のモデル化
- オプトジェネティック実験系の作成

(5)柳川グループ(群馬大学医学系研究科)

- ① 主たる共同研究者:柳川右千夫 (群馬大学大学院医学研究科、教授)
- ② 研究項目(GABA 細胞の扁桃体局所回路における機能的意義)
 - GABA 細胞の扁桃体局所回路における機能的意義
 - 機能プローブ発現システムの開発

§ 2. 研究実施内容

本研究では、認知的行動制御でみとめられる局所脳回路の情報表現の動的変化を、神経システムの状態維持や遷移と捉え、その現象の本質とメカニズムを解明し、またその回路の状態を操作する光遺伝学をもちいた実験手法を開発することが目標である。

虫明グループ:

研究実施項目 前頭葉皮質の動的状態遷移の解明と多機能電極開発

1) 前頭葉の細胞活動の情報表現が動的に変化に関して多安定をしめず神経回路の状態遷移としてモデル化して発表した(Katori et al 2011)。このモデルでは、皮質細胞が多数の入力を受けながら、その情報選択性が動的に変化すること(ゴール選択性からアクション選択性)を説明する。局所回路の細胞は相互の結合性により複数の多安定状態を示す。その一つの多安定状態はある情報選択(ゴールの選択やアクションの選択)と結びついている。しかもシナプス強度は短期的なシナプス可塑性を仮定することで時間的に次第に現在の状態を不安定化させる。このようにして、自発的または外的な信号により、最初はゴール選択性を示す回路状態がアクション選択性を示す回路状態へと遷移することが説明できた。

2) 前頭葉内側面に位置する前補足運動野は時間間隔計測に関わりその時間情報表現を時間とともに動的に変化させる。多数の細胞活動を同時に調べてみると、細胞集団としては構成する細胞活動で定義される多変量状態空間の軌跡として現在の経過時間を表現していることが明らかになった(Shinomoto et al 2011)。さらにその細胞集団の活動パターンを異なる時間間隔の計測課題で比較してみると、その細胞活動の動的変化による時間情報の表現は絶対時間ではなく相対時間であることが明らかになった。

3) これまで外側前頭前野が迷路問題解決課題で動的であることを示したが、前頭前野内側特に前補足運動野の前方の前頭前野領域は、これまでその機能が不明確であった。この前頭前野内側部が、行動戦略の選択に関わり、行動戦略が複数存在して選択が必要な条件か戦略が単一で選択を要しないかで動的に変化させることを示した(Matsuzaka et al 2012)。前頭前野内側は複数の行動戦略の選択可能性(多安定性)を維持し必要に応じて素早く選択できるように下位の高次運動野へ働きかけている可能性が示唆された。

4) 光遺伝学による局所脳回路への介入により状態変化を引き起こす例として、ChR2を発現した海馬への光刺激実験を試み、てんかんへの状態変化を引き起こすことと同時多点局所電場電位によりその状態遷移の特性解明に成功した。八尾研と脳神経外科との共同研究として、ChR2を広く神経系に発現させた遺伝子改変ラット W-TChR2V4 ラットを用いて光遺伝学的に海馬の直接光刺激で Seizure を示す新たな動物モデルを作成した(大沢ら 特願 2011)。光刺激は、最初誘発電位の変化を起こすが、以後(刺激誘発波→自律的な海馬長軸方向への流れ→自律的な同期化→終了)という一連の変化を極めて再現性高く誘発できる。多点解析の結果、Seizure はグランジャー因果性と同期性の指標であるコヒーレンスの2次元の相空間を一定の軌跡をたどり経過することが明

らかになった。

八尾グループ:

研究実施項目 オプトジェネティクスツールの最適化

1) 八尾グループでは、局所回路の状態遷移を光遺伝学的手法により研究するために、選択的に遺伝子を導入する新たな方法を開発した。すなわち、抗体提示型ウイルスベクターを用いた細胞種特異的遺伝子導入法である。この方法ではバクテリア由来のプロテイン A の IgG 結合ドメインをエンベロープタンパク質に組み込んだ ZZ-sindbis ウイルスを持ちいることにより、形質膜タンパク質の細胞外ドメインを標的とする抗体に依存する遺伝子導入が認められることを報告した(Konno et al., 2011)。

2) W-TChR2V4 ラットでは中枢および末梢のさまざまなニューロンが ChR2 を発現しており光刺激できることを明らかにした。たとえば、脊髄後根神経節においては、機械刺激に応答する大型の DRG ニューロン選択的に ChR2 が発現しているが、傷害刺激に関与する小型の DRG ニューロンには発現していなかった。また、メルケル小体、マイスナー小体などの末梢機械受容器にも ChR2 が発現しており、皮膚の光刺激が機械受容感覚を誘発することを報告した(Ji et al., 2012)。

3) 急性脳スライス、スライス培養などの *in vitro* システムにおいて、複数の任意の関心領域に対して独立した時空間パターンで、並列的に光刺激するシステムの開発および評価を実施した。DLP®方式のイメージプロジェクターを顕微鏡落射管に装着した装置とこれを制御するソフトウェア(多点並列光刺激システム、MiLSS)を開発した。W-TChR2V4 ラットの急性スライスを用いた評価実験において、高い空間および時間解像度で、並列的に光刺激実験ができることを報告した(Sakai et al., 2012)。

研究実施項目 海馬における状態遷移機構の解明

意思決定のように不連続なダイナミクスに関連した現象として、入力の変化が小さいにもかかわらず出力の変化が顕著に拡大する bifurcation が挙げられる。これとは逆向きに、感覚や記憶のような入力を適応的に行動出力とバインドさせる神経系においては、出力側の変化に応じて入力の変化をダイナミックに変化させるメカニズムの存在もまた検討されるべきものと考えられる。そこで、海馬の局所回路において出力側の変化が入力側に影響を及ぼす可能性を検討した。

我々はチャンネルロドプシン 2 発現ラットと 2 点の局所光刺激手法を用いて、海馬急性スライスにおいてシナプス前ニューロン(CA3)の興奮性がシナプス後ニューロン(CA1)とのペアリング刺激のパターンに依存して変化することを発見した。シナプス前ニューロンの興奮性の変化を追跡するため、持続的な光刺激条件下の発火率を細胞外記録にて取得した。ペアリングが因果的な場合、すなわちシナプス前ニューロンと後ニューロンが同期的に発火するペアリング刺激をした際、シナプス前ニューロンの発火率が上昇した。一方、ペアリングが非因果的な場合、すなわちシナプス後ニューロンが抑制された状態で前ニューロンが発火するペアリング刺激の場合、発火率が低下した。

これらは、出力側の変化に応じて入力側のレンジが動的に変化することを意味しており、出力側の状況に応じて適応的に回路形成が為されている可能性を示唆するものである。今後、このようなシナプス前ニューロンの興奮性の変化がネットワークの中でどのような役割を果たしているかを検証す

るシミュレーション実験を計画している。

小山内グループ:

研究項目 大脳皮質—基底核ループの状態遷移機構の解明

小山内グループでは、線条体における自発 Ca^{2+} リズム (Osanai et al., 2011) がニューロンあるいはグリアの状態を遷移させているという仮説を検証するために、その発生細胞種及びメカニズム、その生理的意義を検討した。

1) 発生細胞種、発生機構の同定: 細胞種特異的に GFP を発現しているマウスを用いた実験により、ニューロン、グリアの双方で自発 Ca^{2+} リズムが発生していることが確認された。また薬理実験により、mGluR5 活性化による IP3 産生メカニズムが関与していることが明らかとなった。

2) 生理的意義の検討: Ca^{2+} ダイナミクスを導入することにより昨年度作成した線条体投射ニューロンのモデル細胞を改良し、実験で得られた自発 Ca^{2+} リズムの時間経過により細胞体の Ca^{2+} 濃度を固定する“ Ca^{2+} -clamp”シミュレーションを行った。その結果、自発 Ca^{2+} リズムが Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルを介してニューロンの発火特性を変化させていることが示唆された。この実験的検証のために、カルシウムイメージングとパッチクランプを同時に行うためのシステムを構築し、現在実験を進めている。

柳川グループ:

研究項目 扁桃体局所回路の解明

1) GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD; GAD65 と GAD67 の 2 型存在) により生合成される。恐怖などの情動行動機能におけるパルブアルブミンニューロン (PV ニューロン) からの GABA 神経伝達の役割を明らかにすることを目的として、PV ニューロン特異的 GAD67 ノックアウトマウス (PV-GAD67 KO マウス) を作出した。PV-GAD67 KO マウスホモ接合体では、てんかん様の痙攣発作が観察され生後 2 月齢まで約 20% が死亡した。一方、PV-GAD67 KO マウスヘテロ接合体では、痙攣発作は観察されなかった。PV-GAD67 KO マウスヘテロ接合体とコントロールマウス (GAD67-flox マウス) について行動解析を追加した。その結果、ヘテロ接合体でプレパルス抑制の低下に加えて、MK801 感受性の亢進、社会行動の変化 (新規嗜好性の低下) が観察された。今後は、PV-GAD67 KO マウスのスライス標本を用いてシナプス伝達について電気生理学的に解析する。

2) GAD67-GFP マウスを利用して大脳皮質前頭前野におけるガンマオシレーション研究に貢献した (McNally et al., 2011)。また、海馬 CA1 領域から扁桃体基底内側核へ投射するニューロンでは、標的の一部が GABA ニューロンであることを GAD67-GFP マウスと順行性色素を用いて明らかにした (Müller et al., 2012)。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

- A-1. Shinomoto S, Omi T, Mita A, Mushiake H, Shima K, Matsuzaka Y, Tanji J. Deciphering elapsed time and predicting action timing from neuronal population signals. *Front Comput Neurosci.* 5:29, 2011. (doi: 10.3389/fncom.2011.00029)
- A-2. Katori Y, Sakamoto K, Saito N, Tanji J, Mushiake H, Aihara K. Representational switching by dynamical reorganization of attractor structure in a network model of the prefrontal cortex. *PLoS Comput Biol.* 7:e1002266, 2011. (doi: 10.1371/journal.pcbi.1002266)
- A-3. Matsuzaka Y, Akiyama T, Tanji J, Mushiake H. Neuronal activity in the primate dorsomedial prefrontal cortex contributes to strategic selection of response tactics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:4633-4638, 2012. (doi: 10.1073/pnas.1119971109)
- A-4. Sakamoto K, Yamamoto K, Saito N, Tanji J, Mushiake H. Plan to execution through neuronal synchrony in the prefrontal cortex. *Advances in cognitive neurodynamics (III)*, in press.
- A-5. Miyazaki A, Nakajima T, Shima K, Mushiake H. Neuronal activity in the prefrontal cortex during performance of a dual task consisting of a main- and an interrupting-task. *Advances in cognitive neurodynamics (III)*, in press.
- B-1. Asano T, Ishizuka T, Yawo H. Optically controlled contraction of photosensitive skeletal muscle cells. *Biotechnol Bioeng.* 109:199-204, 2012. (DOI 10.1016/j.neures.2011.08.013)
- B-2. Konno A, Honjo Y, Uchida A, Ishizuka T, Yawo H. Evaluation of a Sindbis virus vector displaying an immunoglobulin-binding domain: antibody-dependent infection of neurons in living mice. *Neurosci Res.* 71:328-334, 2011. (DOI 10.1002/bit.23285)
- B-3. Ji ZG, Ito S, Honjoh T, Ohta H, Ishizuka T, Fukazawa Y, Yawo H. Light-evoked somatosensory perception of transgenic rats that express channelrhodopsin-2 in dorsal root ganglion cells. *PLoS ONE.* 7:e32699, 2012. (DOI 10.1371/journal.pone.0032699)
- B-4. Sakai S, Ueno K, Ishizuka T, Yawo H. Parallel and patterned optogenetic manipulation of neurons in the brain slice using a DMD-based projector. *Neurosci Res*, in press. (DOI 10.1046/j.neures.2012.03.009)
- C-1. Osanai M, Yaguchi Y, Yamada N, Oboshi F, Yagi T. Spontaneous calcium changes in striatal cells. *Electron Commun Jpn.* 94:43-52, 2011. (DOI 10.1002/ecj.10242)

- D-1. McNally JM, McCarley RW, McKenna JT, Yanagawa Y, Brown RE. Complex receptor mediation of acute ketamine application on in vitro gamma oscillations in mouse prefrontal cortex: modeling gamma band oscillation abnormalities in schizophrenia. *Neuroscience* 199:51-63, 2011. (doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.015)
- D-2. Müller M, Faber-Zuschratter H, Yanagawa Y, Stork O, Schwegler H, Linke R. Synaptology of ventral CA1 and subiculum projections to the basomedial nucleus of the amygdala in the mouse: relation to GABAergic interneurons. *Brain Struct Funct.* 217:5-17, 2012. (DOI:10.1007/s00429-011-0326-9)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)