

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) 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

(2) 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系研究科、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

(3) 小山内グループ

- ① 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

(4) 柳川グループ

- 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

認知的行動制御でみとめられる局所脳回路の動的状態変化において、その神経機構をシステムの状態遷移と捉えて、そのメカニズムを解明することが目標である。そのために、動的状態遷移に伴う局所細胞の活動パターンや応答特性、さらに状態遷移に伴うマイクロな律動的な脳振動状態に注目して、その機能的意義を明らかにすることによりマクロな各システムの状態遷移の動的神経基盤を明らかにする。

① サルの認知行動に伴う前頭葉局所回路の状態遷移

認知的行動課題に関して内側、外側の前頭葉の同時記録を行ない細胞活動の動的変化を調べた。順序動作を準備しているときに内側運動野で認められるベータ波とガンマ波は互いに相反的な変化を示し、それぞれ運動プランの維持と更新に関わることを発見した(Hosaka SFN 2012)。すなわち記憶された順序情報を遂行する際はベータ振動が強いが、行動プランを外部刺激により更新する際にはガンマ波が強まり、ベータ波が弱くなる傾向があった。このような振動現象の動的な変化は、課題の種類を問わず認められるものであった。帯状皮質運動野には報酬情報と動作回数情報を表現する細胞があり、異なる時間枠で両者の情報を切り替えていた³。今後は両手動作の維持更新に焦点を絞って更に動的情報変換と振動状態の関連性を検討する。

② 病的状態遷移としてのてんかんの研究

海馬においては、チャンネルロドプシン発現ラットに特定の周期の光刺激を与えることにより再現性よくてんかん状態に回路の状態を遷移させられることが明らかになった⁵。特にてんかん状態では海馬の局所電場電位が長軸方向で伝搬方向の逆転と同期の亢進が見られ最終的に停止する。このような特徴から長軸方向に遷移を伸ばす苔状細胞や OLM 細胞が重要である可能性が示唆された。

③ 統合失調症様の行動異常を示す PV-GAD67KO マウスの研究

柳川らのグループが作成した PV-GAD67 KO マウスにおいて統合失調症様の行動異常を示すことが示された。統合失調症では認知障害が知られており、大脳皮質局所回路の状態遷移の異常がその背景にあることが示唆されている。予備的な実験からこの PV-GAD67KO マウスの大脳皮質の slow oscillation を調べるとその局所振動現象の異常が見出された。背景にある slow oscillation の機序理解のため本年度オプトジェネティックで slow oscillation の双安定性を光駆動による外乱で検証する実験を試みたところ、slow oscillation のアップまたはダウン状態は安定で、外乱はアップ状態からダウン状態への相転移に効果があり位相を引きこむ現象が認められた¹。PV-GAD67 KO マウスではこのような slow oscillation のアップを生成維持できないのでは無いかと仮説を立てて実験検証中である。

④ 海馬の状態遷移

複数の回路で形成されるアトラクターでは、順方向性の可塑性のみならず逆行性の可塑性も関わるかを検討すべく、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 W-TChR2V4 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。すなわち 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時にのみ、シナプス前ニューロンの発火率が上昇した。これらは、出力側の変化に応じて入力側の動作特性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¹²。海馬のてんかんモデル動物では、海馬歯状回顆粒細胞が内分子層に異所性の投射をすることにより、異常なアトラクター回路を形成するという仮説がある。この検証のために 歯状回顆粒細胞選択的にシナプトフルオリンを発現するトランスジェニックマウス(TV-42)を用いて、ピロカルピンてんかんモデル動物を作製した。その結果 高い感度で内分子層への投射が認められ、その終末にシナプス小胞が集積し、シナプス前終末として機能していることが示唆された。さらに、CA3領域においても、放線層などにおいて、シナプトフルオリン陽性のシナプス前終末を多数認めた。したがって、歯状回のみならず CA3の領域において、新しいシナプスが形成され、情報の流れが変化していることが示唆される¹⁰。

⑤ 抑制細胞のサブタイプ

PV-GAD67 KO マウスの興奮・抑制の動的な変化を捉えるために、急性海馬スライス標本を作製し、GABA_A 受容体を介する抑制性後シナプス電流(IPSC)の入出力関係を解析したところ、KO マウスではコントロールマウスに比較し入出力関係が減弱しており、抑制性シナプス伝達の低下が示唆された。さらに興奮性シナプス伝達の特性を調べた結果、KO マウスではNMDA受容体の電流-電圧曲線に異常が認められた。これらの結果は、PV-GAD67 KO マウスでは抑制性シナプス伝達だけでなく興奮性シナプス伝達にも異常を生じていることを示唆している。また、GAD67-GFP マウスと逆行性色素などを利用して大脳皮質に投射している前脳基底部の GABAニューロンからホールセル記録した結果、fast-firing の発火パターンを観察した¹⁵。

⑥ 大脳皮質—基底核ループの状態遷移機構の解明

大脳基底核線条体は大脳皮質から入力を受け、線条体ニューロン・グリアにおいて持続時間が長く自発カルシウムリズムを示す。この系のリズム生成のメカニズムを局所回路の構成要素である興奮細胞—抑制細胞、グリアニューロンなどに分離した上で理解するために GAD67-GFP ノックインマウス、GFAP-GFP マウス等を用い細胞種を識別し、その発生機構の同定を行った。その結果、mGluR5-IP3 シグナル伝達経路を介して、自発カルシウムリズムが発生し、活動電位依存的にニューロン間、グリア細胞間のみならずニューロン—グリア間でも同期していることが分かった(Tamura et al., SFN2012)。この結果は現在論文投稿中である。今後は大脳皮質側の slow oscillation に焦点をおいて検討する。また大脳皮質—線条体の自発リズムの生理的意義を推定するために、生理的に妥当なニューロンのモデルを作成し、シミュレーション実験を行った。その結果、自発カルシウムリズムはカルシウム依存性カリウムチャンネルのうち SK チャンネルを介して、活動電位発生頻度を制御していることが示唆された。

⑦ オプトジェネティクスの最適化

W-TChR2V4 ラット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 が発現していることを利用することで、末梢触覚刺激の時空間パターンにともなう大脳皮質の状態遷移研究のモデルシステムが得られることが示唆される¹¹。このような実験系は世界的に類例がなく、それぞれのウイスカを独立にパターン刺激する道が開かれた。これは、感覚生理学の分野におけるマイルストーンであるとともに、アトラクターとその状態遷移の研究を進展させることが期待される。

UASプロモーターの下流に最適化された改変チャンネルロドプシンの一つ、チャンネルロドプシンワイドレシーバー(ChRWR)をコードした配列を有する UAS:ChRWR-EGFPトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作製し、Rohon-Beard ニューロン特異的に ChRWR を発現する個体を得た。このようにして得られたトランスジェニック・ゼブラフィッシュの体幹部に青色光(480 nm)・緑色光(540 nm)・赤色光(600 nm)の照射を行い、前二者において Rohon-Beard ニューロンの光駆動による逃避反射行動の誘発に成功した⁹。

⑧ 光学機器開発

状態遷移の研究に必要な関心領域への多点独立の時空間刺激を行うために 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。本年度はこれを発展させ、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⁷。また、DLP ®プロジェクターの光量を上げ、マルチバンドパスフィルターを用いることにより、同一ニューロンに発現させた青色光-ChR2 の組合せによる脱分極と橙色光-ArchT の組合せによる過分極を並列的に操作することが容易なシステムを開発した(八尾他, 2012)。我々はまた、脳深部活動のイメージング及び光刺激が可能な極微細蛍光内視鏡を開発した¹⁴。この内視鏡は従来よりも細径で画素数が多く、かつ光伝達効率にすぐれており、この内視鏡を用いて単一細胞の発する GFP 蛍光を捉えることと、カルシウムイメージングに成功している。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Kuki T, Ohshiro T, Fukazawa Y, Matsuzaka Y, Yawo H, Mushiake H, (2013) Frequency-dependent entrainment of neocortical slow oscillation to repeated optogenetic stimulation in the anesthetized rat. *Neurosci Res* 75:35-45 (doi: 10.1016/j.neures.2012.10.007)
2. Okuyama S, Iwata J, Tanji J, and Mushiake H (2013) Goal-oriented, flexible numerical operations by monkeys. *Anim Cog.* (in press)
3. Iwata I, Shima K, Tanji J, and Mushiake H (2013) Neurons in the cingulate motor area signal context-based and outcome-based selection of volitional action. *Exp Brain*

Res. (In press)

4. Matsuzaka Y, Akiyama T, Mushiake H (2013) Participation of neurons in multiple sectors of medial frontal cortex undergoes dynamic alterations depending on the demand for volitional control of action. *Exp Brain Res*. (In press)
5. Osawa S, Iwasaki M, Hosaka R, Matsuzaka Y, Tomita H, Ishizuka T, Sugano E, Okumura E, Yawo H, Nakasato N, Tominaga T, Hajime Mushiake H (2013) Optogenetically induced seizure and the longitudinal hippocampal network. *PLoS One* (in press)
6. Egawa R, Hososhima S, Hou X, Katow H, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H (2013) Optogenetic probing and manipulation of the calyx-type presynaptic terminal in the embryonic chick ciliary ganglion. *PLoS One* 8(3), e59179. (DOI: 10.1371/journal.pone.0059179)
7. Sakai S, Ueno K, Ishizuka T, Yawo H (2013) Parallel and patterned optogenetic manipulation of neurons in the brain slice using a DMD-based projector. *Neurosci Res* 75(1):59-64. (doi: 10.1016/j.neures.2012.03.009)
8. Tanimoto S, Sugiyama Y, Takahashi T, Ishizuka T, Yawo H (2013) Involvement of glutamate 97 in ion influx through photo-activated channelrhodopsin-2. *Neurosci Res* 75(1):13-22. (doi: 10.1016/j.neures.2012.05.008)
9. Umeda K, Shoji W, Sakai S, Muto A, Kawakami K, Ishizuka T, Yawo H (2013) Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system. *Neurosci Res* 75(1):69-75. (doi: 10.1016/j.neures.2012.08.010)
10. Ito S, Ishizuka T, Yawo H (2012) Remodeling of hippocampal network in pilocarpine-treated mice expressing synaptophluorin in the mossy fiber terminals. *Neurosci Res* 74(1):25-31. (doi: 10.1016/j.neures.2012.07.003)
11. Ji Z-G, Ito S, Honjoh T, Ohta H, Ishizuka T, Fukazawa Y, Yawo H (2012) Light-evoked somatosensory perception of transgenic rats which express channelrhodopsin-2 in dorsal root ganglion cells. *PLoS One* 7:e32699. (doi: 10.1371/journal.pone.0032699)
12. Ohta H, Sakai S, Ito S, Ishizuka T, Fukazawa Y, Kemuriyama T, Tandai-Hiruma M, Mushiake H, Sato Y, Yawo H, Nishida Y (2013) Paired stimulation between CA3 and CA1 alters excitability of CA3 in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 534:182-187. (doi: 10.1016/j.neulet.2012.11.058)
13. Wang ZH, Takada N, Uno H, Ishizuka T, Yawo H, Urisu T. (2012) Positioning of the sensor cell on the sensing area using cell trapping pattern in incubation type planar patch clamp biosensor. *Colloids Surf B Biointerfaces* 96:44-49. (doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.03.018)

14. Osanai M, Suzuki T, Tamura A, Yonemura T, Mori I, Yanagawa Y, Yawo H, Mushiake H. (2013) Development of a micro-imaging probe for functional brain imaging. *Neurosci Res* 75: 46-52,
15. McKenna JT, Yang C, Franciosi S, Winston S, Abarr KK, Rigby MS, Yanagawa Y, McCarley RW, Brown RE. (2013) Distribution and intrinsic membrane properties of basal forebrain GABAergic and parvalbumin neurons in the mouse. *J Comp Neurol.* 521, 1225-1250. (doi: 10.1002/cne.23290)
16. Dimitrov EL, Yanagawa Y, Usdin TB. (2013) Forebrain GABAergic projections to locus coeruleus in mouse. *J Comp Neurol.* in press. (doi: 10.1002/cne.23291)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)