

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18700386

研究課題名(和文) 運動発現・調節における大脳皮質インターニューロンの機能的役割

研究課題名(英文) Functional activity of cortical interneurons in motor expression and regulation

研究代表者

磯村 宜和 (ISOMURA YOSHIKAZU)

独立行政法人理化学研究所・脳回路機能理論研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：00415077

研究成果の概要：本研究課題では、運動課題を遂行中のラットの一次運動野において、どのインターニューロン・サブタイプがどのように運動機能の発現や調節に関与しているのかを解明することを目指した。そして、脳定位固定状態のラットが前肢の自発運動課題を効率よく学習する装置を開発し、傍細胞記録法とマルチユニット記録法を被検動物に適用し、特に fast-spiking インターニューロンは運動指令の抑制ではなく形成に参加していることなどを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：神経細胞、運動野、大脳皮質、ラット、神経生理学

## 1. 研究開始当初の背景

過去数十年間、金属微小電極をもちいた単一ユニット記録法によって脳のどの運動野領域にどのような運動関連活動をもつ神経細胞が分布しているかを探る研究が数多くおこなわれてきた。しかし従来の記録法の欠点は、ユニット記録した細胞が錐体細胞かインターニューロンか、新皮質の第何層に属するのか、どのような樹状突起の伸展や軸索回路の形成がみられるのか、形態学的にまったく同定できないことであった。この欠点を克服するために、ガラス微小電極により単一ユニット活動を記録した後に、バイオサイチン色素を電気浸透的に記録細胞内へ負荷する

技術が開発され、特にインターニューロン活動の記録とそのサブタイプ同定に大きな成果を挙げつつある(傍細胞記録法)。記録細胞内へ負荷されたバイオサイチンは数時間後には樹状突起や軸索内を拡散し、灌流固定後にABC染色法を施すと記録細胞だけがまるでゴルジ染色のように微細にわたり染色されて詳細な形態観察が可能となる。一方、近年大きな発展を遂げているマルチユニット記録法は記録細胞の形態的同定こそできないものの、同時に数十ものユニット活動を分離して記録することができ、ネットワーク活動を詳細に調べる有力な武器となってきた。そこで、この二つの記録技術を組み合わせると

動の発現と調節に関わる大脳皮質インターニューロンを機能的かつ形態学的に特定することが現実的に可能であると判断した。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ラットに前肢によるレバー押し自発運動課題を遂行させ、傍細胞記録法により対側の大脳皮質一次運動野から運動の「開始」や「停止」あるいは「調節」に関連する単一細胞（錐体細胞とインターニューロン）の発火活動を記録しバイオサイチンを細胞内に負荷する。運動関連活動のほか、平均発火頻度や自己相関性、バースト発火性、ユニット幅と形状などを定量化したうえで、パルバルブミンなどの各種細胞マーカーとバイオサイチンとの二重染色を施して細胞形態を詳細に観察し、記録インターニューロンを系統的に同定しサブタイプに分類する。同時に近傍や周辺領域からマルチユニット活動を記録して、運動時に同定インターニューロンが周辺の神経細胞に与える作用を解析する。このように本研究では、一次運動野におけるそれぞれのインターニューロン・サブタイプが運動の発現や調節に果たす機能的役割を、これまでに申請者が国内外で培ってきた電気生理学のおよび形態学的手法を駆使して具体的に特定することを大きな目標に据えた。

## 3. 研究の方法

<平成18年度> 当該年度の前半は、未訓練ラットを使用し傍細胞記録とテトロード記録の予備的実験を繰り返して最適な実験環境を決定し、これと並行してラットに前肢によるレバー押し自発運動課題の訓練を開始した。動物は行動実験に定評あるLong-Evans系ラット(オス200-400g)を採用し、初期馴化の後に、イソフルラン麻酔下で脳定位固定用の2本のパイプと電極挿入用のチャンバーをラットの頭蓋骨に歯科用セメントで取付ける手術をおこなった。飼育ケージ内の飲水制限を課したうえで、温湿度、明暗、環境音などを制御した訓練室にて毎日一定の時間帯に一定の実験者が課題の訓練を施した。脳定位固定状態にある被験ラットは前肢でレバー(可動範囲2cm, 一定負荷あり)を押し切ると試行が開始し、1秒以上保持した後に自分の意思でレバーを戻すと報酬の水滴を与えるように設定した。ほとんどのラットは訓練2週間以内で運動課題を学習した。当該年度の後半より、課題遂行中のラットから細胞活動の記録と同定、および周辺ユニット活動の解析を実際に開始した。運動の発現と調節に関与する一次運動野を記録対象とし、同一個体に傍細胞記録法とマルチユニット記録法を組み合わせ、近傍の複数部位のマルチユニット活動を記録しながら、

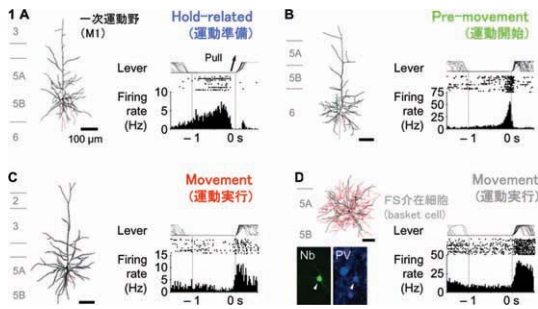
目的とする運動関連活動を示す単一細胞が見つかるまで傍細胞記録電極を進め、良好な記録(数十試行、約15分間)が得られるとすぐさま正電流を与えてバイオサイチンを記録細胞内に負荷した。前肢の運動は常にレバー位置の経時的変化として記録しておき、さらに必要に応じて前肢に被覆付銀線電極を埋め込んで筋電図の測定もおこなった。約2-6時間後にパラホルムアルデヒドをもちいて灌流固定し、摘出した脳から組織切片を作成してアビジン-ビオチン複合体(ABC)法により記録細胞を染色し、細胞タイプ、層、樹状突起・軸索投射などを観察した。またパルバルブミンやカルレチニンなどのインターニューロン・マーカーの免疫組織染色との二重染色も施して、形態学的に記録細胞のサブタイプを同定し分類した。

<平成19年度以降> 基本的に前年度の記録実験を踏襲した。形態学的に同定・分類されたインターニューロンは、平発火頻度や自己相関性、バースト発火性、ユニット幅と形状などの基本的な機能的特徴を詳細に解析したうえで、前肢の位置、速度、加速度などの運動パラメーターと運動関連発火活動との関連性を定量解析し、それぞれが運動の発現と調節のどの機能に関与しているのかを特定した。

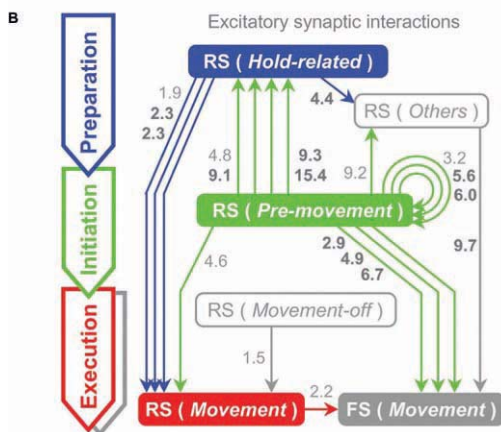
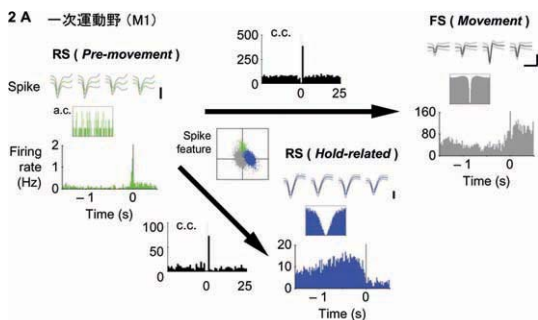
## 4. 研究成果

本研究の実施により、我々はラットの一次運動野の運動発現を担う興奮性錐体細胞と抑制性インターニューロンの役割を明らかにすることができた。この目的のために、多数のラットに効率よくオペラント学習課題を訓練できる脳定位固定オペラント訓練装置を開発し(特許出願中)、単一神経細胞の発火活動記録と形態学的同定ができる傍細胞記録法と複数の神経細胞の発火活動を同時に記録できるマルチユニット記録法を行動中のラットに適用する行動学的・生理学的研究手法を確立した。さらに所属研究チームの竹川高志研究員を中心としてマルチユニット記録データから個々の細胞のスパイク活動を高精度で自動検出するスパイク・ソーティング・プログラム(ウェーブレット変換を使ったロバスト変分ベイズ法:実装プログラムEToS)を開発し実用化した(論文投稿中)。

これらの実験技術をもちいて、ラットが自発性運動を遂行中に一次運動野の局所回路における運動情報の流れを追跡した。まず傍細胞記録法により運動関連活動を示す神経細胞のサブタイプを形態学的に可視化し同定した。自発性運動の準備、開始、実行に関与すると思われる興奮性の錐体細胞(図1A-C)は各層にわたって分布していた。一方、バスケット細胞などの抑制性Fast-spiking



介在細胞のほとんどは運動実行中に活動しており(図1D)、これらの抑制性細胞は運動コマンドの「ゲーティング」でなく「シェーピング」に関与することを示した。次に、マルチユニット記録法により運動関連活動を示す神経細胞の間にみられる単シナプス性興奮結合を調べて、一次運動野の局所回路における運動情報の流れを調べた(図2A)。そして、運動開始に関与する神経細胞は、同じ運動開始グループを興奮させるだけでなく準備や実行に関与する錐体細胞や介在細胞にも単シナプス性に信号伝達するという「機能的皮質回路」を解明した(図2B)。以上の研究成果は論文投稿中である。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

① Tsujimoto T, Shimazu H & Isomura Y (2006) Direct recording of theta

oscillations in primate prefrontal and anterior cingulate cortices. *J Neurophysiol* **95**(5): 2987-3000 査読あり

② Isomura Y, Sirota A, Özen S, Montgomery S, Mizuseki K, Henze DA & Buzsáki G (2006) Integration and segregation of activity in entorhinal-hippocampal subregions by neocortical slow oscillations. *Neuron* **52**(5): 871-882 査読あり

③ F.-Tsukamoto Y, Isomura Y, Imanishi M, Fukai T & Takada M (2007) Distinct types of ionic modulation of GABA actions in pyramidal cells and interneurons during electrical induction of hippocampal seizure-like network activity. *Eur J Neurosci* **25**(9): 2713-2725 査読あり

④ Okamoto H, Isomura Y, Takada M & Fukai T (2007) Temporal integration by stochastic recurrent network dynamics with bimodal neurons. *J Neurophysiol* **97**(6): 3859-3867 査読あり

⑤ Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M & Buzsáki G (2008) Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron* **60**(4): 683-697 査読あり

⑥ Tsujimoto T, Mima T, Shimazu H & Isomura Y (2009) Directional organization of sensorimotor oscillatory activity related to the electromyogram in the monkey. *Clin Neurophysiol* (in press) 査読あり

⑦ Isomura Y, Fujiwara-Tsukamoto Y & Takada M (2008) A network mechanism underlying hippocampal seizure-like synchronous oscillations. *Neurosci Res* **61**(3): 227-233 査読あり

[学会発表] (計11件)

① Isomura Y (2007) A network mechanism underlying seizure-like synchronous oscillations. *Synchronous Rhythms in the Brain*. (University of British Columbia, Vancouver, Canada, Jun 18-20(19))

② Isomura Y, Harukuni R, Takekawa T, Aizawa H & Fukai T (2008) Functional and

morphological identification of neocortical neurons in rodents performing operant motor task. *Soc Neurosci Abstr* **38**: 860.23 (38th annual meeting, Washington DC, Nov 15-19(19))

③ Isomura Y (2009) Functional and morphological identification of single cortical neurons in behaving rats. *Creativity, Dynamics, and Mutual Interaction* (11th Tamagawa Dynamic Brain Forum, Atami, Japan, March 2-4(2))

④ Isomura Y (2006) Neocortex-hippocampus interactions via slow network oscillations. *Neurosci Res* **55**(suppl): S43 (29th annual meeting, Kyoto, Jul 19-21)

⑤ 磯村 宜和, 塚元 葉子 (2006) インビボおよびインビトロ実験系における海馬ネットワーク・オシレーションの発生メカニズム. 平成 18 年度生理学研究所シナプス研究会 (岡崎 11 月 30 日-12 月 1 日)

⑥ 磯村 宜和(2007) インビボ生理実験系の新潮流: マルチユニット記録法と傍細胞記録法. 日本大学学術フロンティア推進事業平成 18 年度研究会 (東京 2 月 24 日)

⑦ Isomura Y, Harukuni R, Tanaka S, Aizawa H & Fukai T (2007) Juxtacellular/multiunit recordings from head-restraint rats performing forelimb movement task. *Neurosci Res* **58**(suppl): S151 (30th annual meeting, Yokohama, Sep 10-12(11))

⑧ 磯村 宜和(2008) 傍細胞記録法によるラット運動野ニューロンの機能的および形態学的同定. 大脳皮質-大脳基底核連関と前頭葉機能. 平成 19 年度生理学研究所研究会 (岡崎 1 月 17-18 日(17))

⑨ 磯村 宜和(2008) 慢性傍細胞記録法による大脳皮質神経細胞の機能的および形態学的同定. 三重大学医学研究科セミナー (津 1 月 23 日)

⑩ Isomura Y, Harukuni R, Takekawa T, Aizawa H & Fukai T (2008) Functional and morphological identification of single cortical neurons in operant-task-performing rats. *Neurosci Res* **61**(suppl): S60 (31th annual meeting, Tokyo, Jul 9-11(10))

⑪ 磯村 宜和 (2008) ラット運動野の錐体細胞と介在細胞の機能的活動の解析. 平成 20 年度生理学研究所シナプス研究会 (岡崎 12 月 4-5 日(5))

〔図書〕(計 2 件)

① 磯村 宜和, 塚元 葉子 (2006) 脳機能研究の新展開 (羊土社、狩野方伸他編) 第 3 章 海馬ネットワーク・オシレーションの機能と発生メカニズム: 164-169.

② 塚元 葉子, 磯村 宜和 (2008) 学習と記憶-基礎と臨床 (医学書院、石塚典生編) 海馬神経回路における同期的リズム活動の発生メカニズム. *Brain & Nerve* **60**(7): 755-762.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 動物実験装置

発明者: 磯村 宜和

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2007-042633

出願年月日: 2007 年 2 月 22 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://nct.brain.riken.jp/isomura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯村 宜和 (ISOMURA YOSHIKAZU)

独立行政法人理化学研究所・脳回路機能理

論研究チーム・副チームリーダー

研究者番号: 00415077

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし