

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19300111  
 研究課題名 (和文) 前頭皮質局所回路の皮質下構造に対応した機能分化  
 研究課題名 (英文) Local circuit differentiation of frontal cortex dependent on subcortical projection  
 研究代表者 川口 泰雄 (KAWAGUCHI YASUO)  
 生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授  
 研究者番号：40169694

## 研究成果の概要：

大脳皮質錐体細胞の機能的分化を生理学・薬理的に検索した。錐体細胞は皮質外投射先によって発火特性やアセチルコリン作用が異なることを見つけた。新皮質の2/3層から5層錐体細胞への興奮性結合は5層錐体細胞サブタイプによって、シナプス結合の確率・結合細胞の空間分布・発散結合の選択性が異なることが分かった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(1) 新皮質 (2) レイヤー (3) 錐体細胞 (4) 発火様式 (5) 橋核 (6) 線条体 (7) シナプス結合 (8) サブネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 他の脳部位に比べて、大脳皮質内部回路の解析は遅れている。その理由は、ニューロンタイプを同定した上で神経結合を解析しなければ根本的な理解には結びつかず、これまでは同定する事自体が非常に困難だったからである。皮質回路機能を明らかにする一般的なアプローチは、皮質情報処理の第一段階である感覚野4層で視床入力パターンをサブタイプごとに調べるものであった。本研究では、新皮質が投射先に依存してその内部回路をどのように分化させ、異なる出力を作っているかを調べることにした。

(2) 研究開始当初までに以下ことを見つけていた。

- ① 前頭皮質から線条体へ投射する5層錐体細胞には、同側の橋核・線条体へ軸索を出すもの(橋・線条体投射ニューロン; CPn細胞)と、両側の線条体に軸索を出すもの(両側線条体投射ニューロン; CCS細胞)の二種類がある。
- ② 錐体細胞サブタイプは発火様式・樹状突起形態が異なり、CCS細胞からCPn細胞への結合はみられるが、逆はほとんど見られない。
- ③ CCS細胞には5層内の位置による形態分

化がみられる。

これらの知見を基に、出力先による錐体細胞分化と、錐体細胞の投射サブタイプに依存した局所結合の解析を行う事にした。

## 2. 研究の目的

(1) 大脳新皮質は複数の層（レイヤー）からできており、各層の間は興奮性の錐体細胞で結合している。同じ層の錐体細胞でも投射先や生理的性質が多様であることが知られている。レイヤー間結合の選択性を調べるために、2/3層錐体細胞から5層錐体細胞への興奮性入力確率とシナプス出力の発散パターンを5層サブタイプごとに明らかにする。

(2) アセチルコリンは覚醒・認知機能に深く関与する伝達物質であり、前頭皮質と海馬で重要な働きをされると考えられている。そこで、皮質外出力様式が異なる新皮質2/3層と5層錐体細胞、海馬のCA1とCA3錐体細胞のアセチルコリンの作用を比較検討するとともに、多様なGABAニューロンサブタイプに固有の応答についても解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 線条体に投射する皮質5層錐体細胞の発火様式解析

前頭皮質5層CCS細胞とCPn細胞を、対側線条体、同側橋核への蛍光レーザー注入でそれぞれ逆行性に蛍光標識して同定した。蛍光標識したラットから脳切片標本を作成し、ホールセル記録を行った。カレントクランプ法で脱分極パルス通電で発火様式を解析した。バイオサイチンで細胞内染色し、樹状突起・軸索をニューロロシダで再構築した。

(2) 新皮質レイヤー間結合解析

前頭皮質5層の錐体細胞は発火様式から大きく、3種類の発火サブタイプに分けることができたので、同定した発火サブタイプへの2/3層から興奮性結合様式を解析した。グルタミン酸溶液を入れたガラス管を細胞体の傍に近づけ、圧で局所的にグルタミン酸を与えることで、2/3層の単一錐体細胞を興奮発火させ、それによって引き起こされる興奮性シナプス電流を5層錐体細胞で検索した。

2/3層からの発散興奮性結合をみるために、発火タイプを同定した2個の5層錐体細胞から同時記録し、2/3層細胞をグルタミン酸刺激した。

(3) 新皮質及び海馬ニューロンのアセチルコリン作用解析

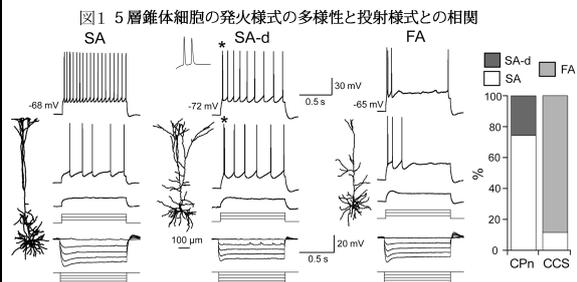
ラットの大脳皮質及び海馬から脳切片を作成し、人工脳脊髄液で灌流しながら直視下に皮質細胞からホールセル記録を行った。GABA細胞の場合にはバイオサイチンを細胞

内に入れ、固定後、細胞内染色と蛍光免疫組織化学で特異的マーカーの発現を調べ、サブタイプを同定した。アセチルコリンはガラス管から圧をかけて投与し、拮抗薬は灌流液に入れた。

## 4. 研究成果

(1) 皮質5層錐体細胞の発火サブタイプと皮質下投射パターン

5層錐体細胞のスパイク発火のバーストや順応パターンを細胞内脱分極通電で調べたところ、前頭皮質5層の錐体細胞には3種類の発火サブタイプがあることがわかった。橋核や線条体に投射する5層錐体細胞はそれぞれ特有の発火パターンであることから、投射先に依存して生理的にも機能分化すると考えられる。



SA, slow adapting

SA-d, slow adapting with doublet firing

FA, fast adapting

(2) レイヤー間興奮性結合における、シナプス前2/3層細胞とシナプス後5層錐体細胞サブタイプの結合確率と位置関係

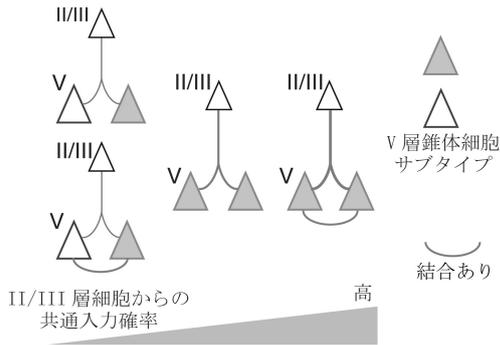
SA細胞とSA-d細胞の方が、FA細胞に比べて、2/3層細胞との結合確率が高かった。SA細胞とSA-d細胞はそれらの細胞体の5層内の位置に関係なく2/3層から入力を受けるのに対して、FA細胞は細胞体が5層の上部にあるものは2/3層の上部にある細胞から、5層下部に位置する細胞は2/3層の下部にある細胞から入力を受ける傾向にあることがわかった。2/3層からの入力は発火パターンサブタイプによって異なると考えられる。

(3) 5層錐体細胞サブタイプに依存した、レイヤー間発散結合の特異性

発火特性を同定した2個の5層錐体細胞から同時記録し、2/3層錐体細胞をグルタミン酸の短時間投与で発火させ、2/3層から5層錐体細胞への興奮性結合を解析した。同一2/3層細胞から共通入力を受ける確率が5層錐体細胞発火サブタイプの組み合わせやサブタイプ間のシナプス結合に影響されるのかを検討した。その結果、5層細胞が同一2/3層細胞から共通入力を受ける確率は、同じサブタイプペアの方が異なるサブタイプペアより高くなった。さらに、同じ

5層サブタイプペアでは、シナプス結合があるものが無いものより共通入力確率が高くなり、一方、異なるサブタイプペアが共通入力を受ける確率は5層間結合の有無に影響されなかった。以上のことから、2/3層から5層への興奮結合が5層錐体細胞サブタイプやその結合に依存したサブネットワークを作ることがわかった。皮質下出力に依存して、皮質内局所回路が分化していると考えられる。

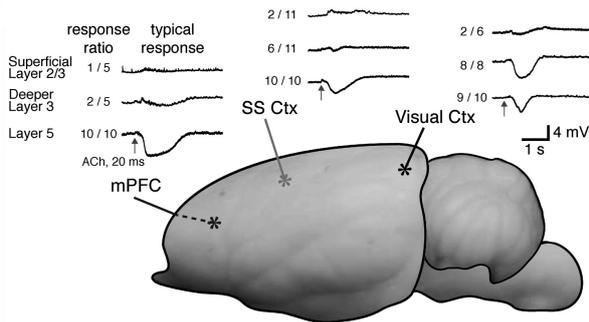
図2 錐体細胞サブタイプに依存したレイヤー間発散結合



(4) アセチルコリンの錐体細胞サブタイプへの作用

アセチルコリンの錐体細胞への作用を、新皮質の層ごとに、海馬内の領域ごとに比較した。新皮質では領野によらず、一過性のアセチルコリン投与に対して5層のものは著明に過分極するのに対して、2・3層のものは電位変化はみられなかった。アセチルコリンを海馬錐体細胞の細胞体付近に一過性に与えたところ、CA3領域では過分極が見られなかったが、CA1領域では、M1型ムスカリン受容体、細胞内カルシウム上昇を介したSKチャネルによる過分極が起きた。

図3 レイヤーに依存したアセチルコリンの錐体細胞への作用



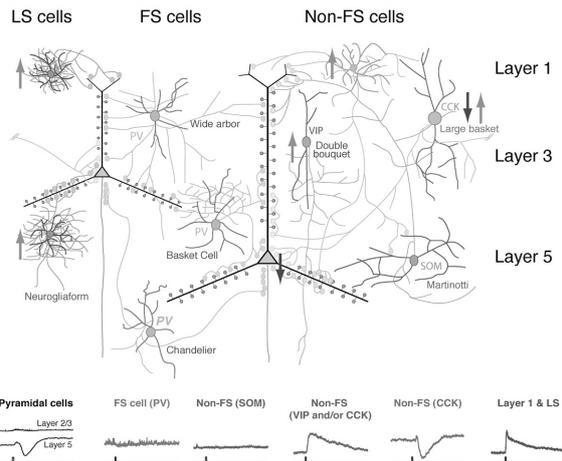
新皮質では2・3層から5層錐体細胞への結合が主要な興奮性経路の一つなのに対して、海馬ではCA3からCA1錐体細胞へのシナプスが主要な興奮経路である。皮質外への投射については、それぞれ5層とCA1錐体細胞が担っている。従って、アセチルコリンは、層構造下位の興奮性細胞の発火を一過性に抑制し、皮質外への出力を遮断する可能性があ

る。アセチルコリン作用・皮質内経路・皮質外投射様式を合わせて考えると、新皮質2・3層錐体細胞はCA3錐体細胞に、5層のものはCA1のものに対応すると考えられた。

(5) アセチルコリンの GABA 細胞サブタイプへの作用

ムスカリン性過分極はGABA細胞では、CCK陽性の大型バスケット細胞でみられた。過分極に関わる受容体は5層錐体細胞とは異なり、m2型であった。ニコチン性脱分極は、VIP細胞やニューログリア様細胞で起こすことができた。FS細胞、ソマトスタチン細胞では、他のグループによる報告とは異なり、一過性応答は殆ど観察できなかった。これらと私たちの以前の持続的投与結果と合わせると、アセチルコリンは皮質下構造に投射する5層錐体細胞を一過性に直接抑制する一方、抑制性ニューロンではニコチン受容体による脱分極・ムスカリン受容体による緩徐な持続的脱分極がサブタイプごとに異なる組み合わせで発現し、これらを介して抑制性回路活動を調節していることが明らかになった。

図4 GABA細胞サブタイプに依存したアセチルコリン作用



## 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6件)

- ① Otsuka T. & Kawaguchi Y. Firing-Pattern dependent specificity of cortical excitatory feed-forward subnetworks. *J.Neurosci.* 28:11186-11195 (2008) 査読有
- ② Puig M.V., Ushimaru M. & Kawaguchi Y. Two distinct activity patterns of fast-spiking interneurons during neocortical UP-states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 8428-8433 (2008) 査読有

- ③ Uematsu M., Hirai Y., Karube F., Ebihara S., Kato M., Abe K., Obata K., Yoshida S., Hirabayashi M., Yanagawa Y. & Kawaguchi Y. Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic Venus-expressing rats. *Cereb. Cortex* 18:315-330 (2008) 査読有
- ④ Kubota Y., Hatada S., Kondo S., Karube F. & Kawaguchi Y. Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *J. Neurosci.* 27:1139-1150. (2007) 査読有
- ⑤ Gullledge A.T., Park S.B., Kawaguchi Y. & Stuart G. Heterogeneity of phasic cholinergic signalling in neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 97:2215-2229. (2007) 査読有
- ⑥ Gullledge A.T. & Kawaguchi Y. Phasic cholinergic signaling in the hippocampus: functional homology with the neocortex? *Hippocampus* 17:327-332. (2007) 査読有
- [学会発表] (計 17 件)
- ① Kubota Y., Hatada S., Sekigawa A., Shigematsu N, Kawaguchi Y. (2008.11.15-19) The excitatory and inhibitory synapse densities on various GABAergic nonpyramidal cells in the rat cerebral cortex. 38th Annual Meeting Society for Neuroscience. (Washington D.C. USA)
- ② 川口泰雄 (2008. 11. 8-9) 大脳皮質のニューロン多様性と特異的振動. 第 39 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会. (名古屋)
- ③ Morishima M. Kawaguchi Y. (2008.7.9-11) Excitatory and inhibitory recurrent connections dependent on pyramidal cell subtypes in layer 5 of frontal cortex. 第 31 回日本神経科学大会 (東京)
- ④ Hirai Y., Morishima M. Kawaguchi Y. (2008.7.9-11) Pyramidal neuron subtypes of rat frontal cortex projecting to the perirhinal cortex. 第 31 回日本神経科学大会 (東京)
- ⑤ Otsuka T, Kawaguchi Y. (2008.7.9-11) Specificity of excitatory connections from layer 2/3 to layer 5 cortical cells. 第 31 回日本神経科学大会 (東京)
- ⑥ Tanaka Y, Tanaka Y, Furuta T, Yanagawa Y, Kawaguchi Y. Kaneko T (2008.7.9-11) Connections of GABAergic interneurons to corticospinal neurons in the cerebral cortex. 第 31 回日本神経科学大会 (東京)
- ⑦ 川口泰雄, 大塚岳, 森島美絵子, 平井康治, 重松直樹 (2008.3.27-29) 大脳皮質錐体細胞の多様性と結合特異性. 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (大分)
- ⑧ 川口泰雄 (2008.3.7) 大脳皮質ニューロンタイプとアセチルコリン作用. 基礎生物学研究所研究会 大脳皮質の発生と可塑性 II (岡崎)
- ⑨ 川口泰雄 (2008.2.13) 大脳皮質ニューロンタイプとシナプス結合. 第 3 回生理学研究所・名古屋大学環境医学研究所合同シンポジウム (名古屋)
- ⑩ Gullledge A, Kawaguchi Y. (2007.11.3-7) Phasic cholinergic signaling in the hippocampus: functional homology with the neocortex? Society for Neuroscience 37th Annual Meeting (San Diego, USA)
- ⑪ Kubota Y, Karube F, Sekigawa A, Nomura M, Aoyagi T, Mochizuki A, Kawaguchi Y. (2007.11.3-7) Dendritic dimensions of cortical nonpyramidal cells. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting (San Diego, USA)
- ⑫ Shino M, Yanagawa Y, Kawaguchi Y. Ozawa S, Saito Y (2007.11.3-7) Electrophysiological membrane properties of inhibitory neurons in the prepositus hypoglossi nucleus in transgenic Venus-expressing rats. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting (San Diego, USA)
- ⑬ 川口泰雄 (2007.9.10-12) 皮質局所神経回路における興奮・抑制結合の多様性. 第

30 回日本神経科学大会 (横浜)

- ⑭ 窪田芳之, 苅部冬紀, 野村真樹, 青柳富誌生, 望月敦史, 川口泰雄 (2007.9.10-12) 大脳皮質非錐体細胞の樹状突起特性の解析. 第 30 回日本神経科学大会 (横浜)
- ⑮ 大塚岳, 森島美絵子, 川口泰雄 (2007.9.10-12) 大脳皮質回路における発火パターンに依存した結合特異性. 第 30 回日本神経科学大会 (横浜)
- ⑯ 関川明生, 窪田芳之, 畑田小百合, 川口泰雄 (2007.9.10-12) 大脳皮質非錐体細胞への興奮性・抑制性シナプス入力比. 第 30 回日本神経科学大会 (横浜)
- ⑰ 紫野正人, 柳川右千夫, 川口泰雄, 小澤澁司, 齋藤康彦 (2007.9.10-12) 舌下神経前位核における抑制性ニューロンの膜特性 -VGAT-Venus transgenic rat を用いた解析-. 第 30 回日本神経科学大会 (横浜)

[図書] (計 1 件)

- ① Kawaguchi Y. & Karube F. (2008) Structures and Circuits: Cerebral Cortex, Inhibitory cells. In The New Encyclopedia of Neuroscience (ed Squire L). Elsevier, Amsterdam. 総ページ数 9

[その他]

ホームページ等

部門 HP

<http://www.nips.ac.jp/circuit/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 泰雄 (KAWAGUCHI YASUO)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授

研究者番号: 40169694

### (3) 連携研究者

高田美絵子 (TAKADA MIEKO)

(森島美絵子 MORISHIMA MIEKO)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・助教

研究者番号: 30435531