

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20020032

研究課題名（和文） 大脳皮質回路の結合選択性

研究課題名（英文） CONNECTION SELECTIVITY IN CEREBRAL CIRCUITRY

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（和文）：大脳皮質組織化原理の解明は、大脳システム機能の理解には不可欠である。私たちは、新皮質の興奮性と抑制性細胞のサブタイプを同定して、サブタイプ間結合には選択性があることや、大脳皮質でみられる局所・大域的振動現象に抑制性細胞サブタイプが同調して発火することを見つけた。新皮質局所回路のシナプス結合パターンや振動現象は、大脳システム回路に依存して特異化していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of neocortical organization principles is crucial for understanding the function of the cerebral cortex. We quantitatively identified excitatory pyramidal and GABAergic nonpyramidal cell subtypes. We found that the neuron subtypes exhibited selective connectivity and that GABAergic cells discharged during the local and global rhythms. Thus, the local synaptic organization and firing activity in the neocortex are specified according to global inter-regional circuits and their oscillatory interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	24,900,000	0	24,900,000
2009年度	9,400,000	0	9,400,000
総計	34,300,000	0	34,300,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(1) 大脳皮質；(2) 局所回路；(3) 錐体細胞；(4) 介在細胞；(5) GABA；(6) 層構造；(7) シナプス結合；(8) 徐波。

## 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の構造に関しては、それを構成している細胞の種類がようやくわかり始めたところで、機能的回路の構築ルールの多くはまだほとんどわかっていない。私たちは、大脳皮質の局所神経回路構成、ニューロンタイプの機能分化、結合パターンを調べることを目標としている。

対象とする前頭皮質は、それが投射する大脳基底核の線条体とともに精神活動や運動・行動にとって非常に重要な場所であり、この異常は多様な精神疾患を引き起こす。前頭皮質局所回路を大脳システムの中での機能的モジュールとして捉え、ニューロンタイプのレベルから理解したいと考えている。これまでに、GABA 細胞の生理的・形態

的・分子的同定を進めてきたが、本研究では、それに加えて、錐体細胞の機能分化を定量的に進めることにした。投射先が多様な前頭皮質の興奮性・抑制性ニューロンタイプを明らかにした上で、局所回路構成・結合様式を解析し、新皮質局所回路と大脳マクロ回路を結びつける方向を模索することにした。

## 2. 研究の目的

大脳皮質の機能的回路構築ルールを少しでも明らかにするために、多様な出力系をそなえる前頭皮質で以下の問題を検討した。

- (1) GABA 細胞の分子的・形態的多様性
- (2) 第5層錐体細胞の出力先に依存した生理的多様性
- (3) 皮質内フィードフォワード結合の錐体細胞サブタイプによる分化
- (4) FS 細胞の発火様式の多様性

## 3. 研究の方法

### (1) GABA 細胞分子的サブタイプの解析

GABA 細胞の化学的マーカーである、6種類のペプチドやカルシウム結合蛋白質の蛍光免疫組織化学でサブタイプを同定した。サブタイプのGABA細胞集団での割合を出すのに、GABA細胞特異的に蛍光を発現している遺伝子改変ラットを用いた。

### (2) 皮質5層細胞の解析

前頭皮質5層の錐体細胞を、標的部位への蛍光トレーサー注入で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、二細胞同時記録を行った。発火様式・シナプス結合を調べた後、細胞内染色し、結合していたペアーの樹状突起・軸索をニューロルシダで再構築した。

### (3) In vivoでのFS細胞の発火パターン解析

抱水クロラル麻酔下ラットの大脳皮質から局所電場電位を記録しながら、FS細胞とみられるニューロンから細胞外ユニット記録し、記録後、傍細胞外通電で記録細胞を染色した。FS細胞と確認するために、分子マーカーであるパルブアルブミンの蛍光免疫組織化学を記録細胞に適用した。

## 4. 研究成果

### (1) 大脳皮質GABA作働性ニューロンの構成

まず、ニューログリアフォーム細胞の免疫組織化学的同定を進めた。ニューログリアフォーム細胞の特有な発火様式を確認した上で、分子マーカーを検索した。その結果、これらがアクチン結合蛋白質であるアルファ-アクチニン-2を選択的に発現することがわかった。そこで、GABA細胞における、パルブアルブミン(PV)、ソマトスタチン(SOM)、VIP、コレシストキニン(CCK)、カルレチニン(CR)、アルファ-アクチニン-2(aAC2)という、6種類のペプチド・蛋白質の発現様式を定量的に

調べた。GABA細胞の中での各物質の発現割合をみると、1層、2/3層、5層では9割以上、6層では9割近くのGABA細胞が6つのマーカーの内、少なくとも一つを持っていることがわかった。(図1)

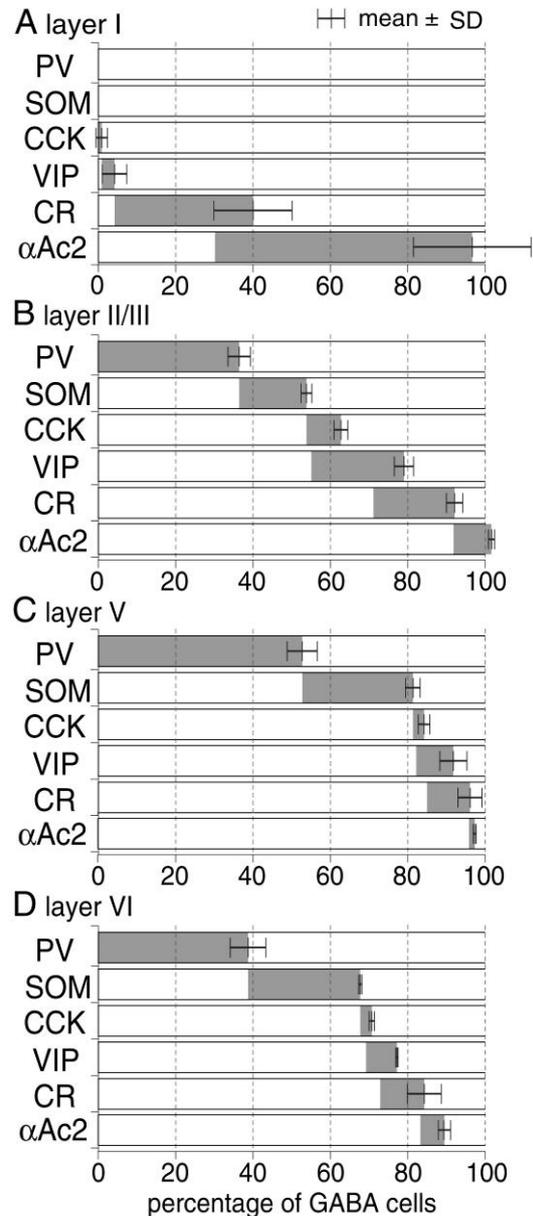


図1 前頭皮質GABA細胞の化学的サブタイプ

### (2) 前頭皮質5層錐体細胞の分化

大脳新皮質は複数の層(レイヤー)からできている。各層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。スパイク発火のバーストや順応パターンを調べたところ、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。

(3) 大脳皮質レイヤー間の興奮結合選択性  
2/3層から5層への興奮結合選択性を明らかにするために、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投与で発火させ、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。(図2)

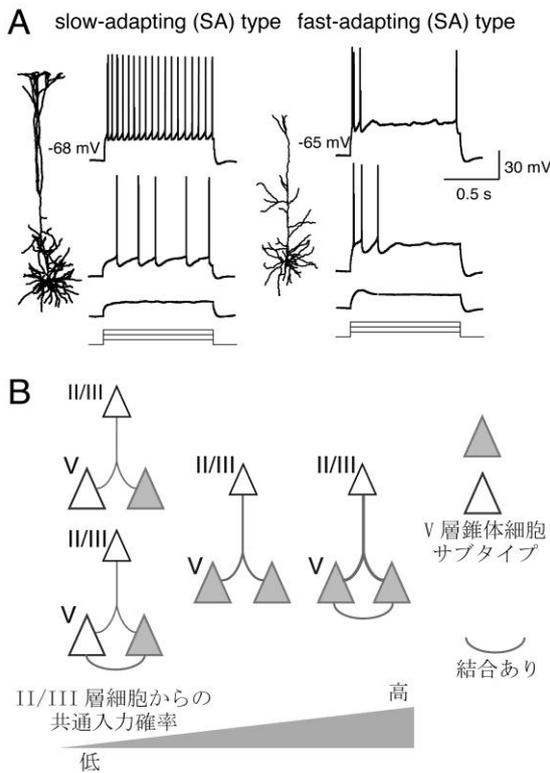


図2 前頭皮質錐体細胞の多様性と層間結合

(3) 介在細胞タイプに依存した興奮性経路の選択的抑制

大脳皮質の神経回路は興奮性の錐体細胞と抑制性の介在細胞から成り立っており、介在細胞によって興奮性ネットワークが制御されている。錐体細胞間では、皮質外投射先や発火様式に依存して特異的にシナプス結合がなされ、サブネットワークを形成していることが次第に明らかになってきている。し

かし、多様な細胞タイプからなる抑制性介在細胞と興奮性サブネットワークとの関係はよく知られていない。5層介在細胞と興奮性サブネットワークとの関係について、ラットの頭皮質スライス標本を用いて検討した。5層介在細胞は電気生理学的にFast Spiking (FS)細胞と non-FS細胞に分類したが、記録した non-FS細胞の多くは形態学的にマルチインオッティ細胞であった。最初に層内での結合特異性を検討するために、5層の介在細胞と錐体細胞から同時にホールセル記録した。その結果、FS細胞と錐体細胞間では両方向性のシナプス結合が多く細胞ペアで見られたのに対して、non-FS細胞と錐体細胞間では双方向結合は殆ど見られなかった。また、双方向結合していた FS/錐体細胞ペアの興奮性・抑制性シナプス電流の振幅は、一方結合のものに比べて大きかった。次に異なる層からの興奮性入力パターンを検討するために、グルタミン酸刺激法を用いて2/3層錐体細胞から5層の介在細胞と錐体細胞に共通入力する確率について調べた。その結果、5層の non-FS細胞と錐体細胞では、その間にシナプス結合があると2/3層錐体細胞から共通入力する確率が高くなったのに対して、5層 FS/錐体細胞ペアに対する2/3層錐体細胞からの共通入力確率は5層細胞間の結合の有無に依存しなかった。以上の結果から、5層の介在細胞は細胞タイプに依存して錐体細胞と層内・層間の異なるサブネットワークを形成しており、興奮性ネットワークの抑制様式が介在細胞タイプごとに異なることが示唆された。

(4) 大脳皮質 FS細胞の徐波状態における発火様式

大脳新皮質ニューロンは睡眠中に脱分極の Up 状態と過分極の Down 状態を繰り返し、1ヘルツ以下の徐波と呼ばれるリズムで振動している。さらに UP 状態には、視床由来の7から14ヘルツのスピンドル波と、皮質自身で作る30から80ヘルツのガンマ波がのっている。これらのリズム制御には皮質の抑制性介在ニューロンが重要な働きをすることが考えられている。そこで、抑制性ニューロンで最も数が多い FS細胞で、徐波時に現れる3種類のリズムでの発火パターンを調べた。Upでの発火時期をみると、前半と後半のどちらかで発火しやすい FS細胞があることがわかった (Early と Late FS細胞)。Early FS細胞は脳波が徐波から脱同期化すると発火頻度が下がり、逆に Late FS細胞は脱同期化すると発火頻度が上がった。この二種類の FS細胞は Up 上のスピンドル・ガンマ波の異なる位相で発火した。Early FS細胞は Late FS細胞よりスピンドル波に強くカップリングし、これら振動の早い位相で発火した。スピンドルとガンマでの発火しやすい位相の間

には相関が見られた。これらの結果は、FS細胞ごとに Up 状態での発火パターンが時空間的に決められており、最初スピンドル波で同期的に引き起こされた局所的なガンマ波が Early FS 細胞から Late FS 細胞へ伝えられる可能性を示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kubota Y, Hatada S and Kawaguchi Y (2009) Important factors for the three-dimensional reconstruction of neuronal structures from serial ultrathin sections. *Front. Neural Circuits* 3:4. (査読有)
- ② Otsuka T and Kawaguchi Y (2009) Cortical inhibitory cell types differentially form intralaminar and interlaminar subnetworks with excitatory neurons. *J Neurosci* 29: 10533-10540. (査読有)
- ③ Puig MV, Ushimaru M, Kawaguchi Y (2008) Two distinct activity patterns of fast-spiking interneurons during neocortical UP-states. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 8428-8433. (査読有)
- ④ Otsuka T, Kawaguchi Y (2008) Firing-pattern dependent specificity of cortical excitatory feed-forward subnetworks. *J. Neurosci.* 28: 11186-11195. (査読有)
- ⑤ Uematsu M, Hirai Y, Karube F, Ebihara S, Kato M, Abe K, Obata K, Yoshida S, Hirabayashi M, Yanagawa Y, Kawaguchi Y (2008) Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic Venus-expressing rats. *Cereb Cortex* 18: 315-330. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Yasuo Kawaguchi Cortical Neuron Diversity and Local Connection Selectivity. 第 56 回 NIBB CONFERENCE " Neocortical Organization " 2010. 3. 12 岡崎
- ② 川口泰雄 大脳皮質の階層構造. 自然科学研究機構連携プロジェクト「自然科学における階層と全体」平成 21 年度シンポジウム 2009. 12. 24 熱海
- ③ Yasuo Kawaguchi Local connectivity of cortical projection neurons depends on their extracortical targets. Construction and Reconstruction of the Brain 大阪大学大学院 生命機能研究科グローバルCOEプログラム 2009. 10. 9 兵庫
- ④ 川口泰雄 大脳皮質ニューロンの結合選

択性と発火特異性. 第 32 回日本神経科学大会時実賞受賞記念講演 2009. 9. 16 名古屋

- ⑤ Yasuo Kawaguchi Cortical GABAergic and Pyramidal Cell Subtypes. Gordon Research Conference 2009. 7. 28 Waterville, ME (USA)
- ⑥ 川口泰雄 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 2008. 11. 8 名古屋

[図書] (計 3 件)

- ① 川口泰雄 (2009) 大脳皮質内興奮性回路の機能分化. “ブレインサイエンスレビュー 2009” (伊藤正男・川合述史編)、pp. 181-205、クバプロ、東京
- ② 川口泰雄 (2009) 大脳皮質における振動生成と結合特異性. *生体の科学* 60: 31-38.
- ③ Kawaguchi Y, Karube F (2008) Structures and Circuits: Cerebral Cortex, Inhibitory cells. In *The New Encyclopedia of Neuroscience* (ed Squire L). Elsevier, Amsterdam.

[その他]

ホームページ:

<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