

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500317

研究課題名（和文） インターニューロンネットワークが生み出す脳リズム活動の生成メカニズム

研究課題名（英文） The mechanisms for generation of rhythmic activities in the interneuronal networks .

研究代表者

塚元 葉子（藤原 葉子）(TSUKAMOTO YOKO (FUJIWARA YOKO))

玉川大学・脳科学研究所・嘱託研究員

研究者番号：90209130

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、脳波やてんかん発作に見られるような「脳のリズム活動」に興味を持ち、そのリズムがどうやって作られるのかを解明したいと考えている。本研究ではラットの海馬や大脳皮質のスライス標本を用い、電気刺激によって引き起こされたリズム現象を、ホールセルパッチクランプ法を用いて解析した。その結果、海馬 CA1、嗅内野および大脳皮質では高頻度発火インターニューロンのネットワークがリズムを作り出す能力を持つことを見出した。

研究成果の概要（英文）：The aim of our research is to elucidate the mechanisms for generation of rhythmic activities in the brain, such as EEG and epilepsy. In this study, we analyzed rhythmic neuronal synchronization induced by strong electrical stimulation in acute slice preparations of rat hippocampus and cerebral cortices, using whole-cell patch-clamp technique. We found that a network of fast-spiking interneurons alone can drive the electrically induced rhythmic activity (prototypic afterdischarge) in the hippocampal CA1 area, entorhinal cortex and neocortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：海馬、リズム、介在細胞、神経回路、生理学、脳・神経、GABA、ギャップ結合

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、成熟ラット海馬 CA1 スライス標本に強い電気刺激（テタヌス刺激）を与えると、錐体細胞膜電位に数十秒間続く同期的なリズム活動（afterdischarge）が誘発されることを見出した（Fujiwara-Tsukamoto et al. 2003）。この afterdischarge の実験モデルは、従来の薬物誘発性リズム活動の実験モデルなどと異なり、極端に細胞内外の環境を変えずに誘発することができ、電気刺激により 100% の確率で誘発され、実験者の任意のタイミングで誘発できるという利点を持っている。このような、ニューロンネットワークが作り出す律動的な活動パターンの解析に理想的なモデル系を用いて、研究代表者らは、以下のような事実を解明してきた。

- (1) この afterdischarge の発現には GABA およびグルタミン酸伝達が関与しており、特にインターニューロンから錐体細胞への GABA 作動性入力、テタヌス刺激により一過性に興奮性に転じている（Fujiwara-Tsukamoto et al. 2003）。
- (2) この afterdischarge に貢献度が高く、一過性の興奮性 GABA 伝達を担うインターニューロンは、錐体細胞層と多形細胞層に細胞体が存在するインターニューロンである（Fujiwara-Tsukamoto et al. 2004）。

これらの研究結果から、インターニューロン群と錐体細胞群が興奮性シナプスで相互に結合する「正のフィードバック回路」を形成し、錐体細胞とインターニューロンが相互に興奮させ合って同期発火が実現されるというネットワーク機構を提案した。

このように、テタヌス刺激誘発性の afterdischarge という同期的リズム現象に関しては、我々の一連の研究から「同期」と「リズム」のうち前者のメカニズムをほぼ解明することに成功したといえる。次に解決すべき課題は、「リズム生成のメカニズム」であると考え、薬理学的実験を進めた。その過程で、研究開始当初は見落としていたものの、イオンチャネル型グルタミン酸受容体拮抗薬 CNQX と AP5 の存在下においてもテタヌス刺激誘発性の振動性入力があることを発見した。これは、グルタミン酸が遮断されていても GABA 作動性メカニズムのみで律動的な同期発火が惹起され得ることを示す結果であり、よりシンプルな afterdischarge のプロトタイプすなわち「prototypic afterdischarge」となるモデル実験系とみなすことができる。そこで、この prototypic afterdischarge について、電気生理学、薬理学および組織学的手法を駆使して、リズム生成神経回路を構成するニューロン群を同定

し、これらの特性や相互作用を明らかにしたいと考えた。

平成 19-20 年度科学研究費補助金基盤研究 (C) においては、この海馬 CA1 領域における prototypic afterdischarge の発現を担うインターニューロンネットワークの構成ニューロンが、高頻度発火特性を持つ多形・錐体細胞層のインターニューロンであることを突き止めた。本研究は、この研究課題の成果をさらに発展させるために提案された。

2. 研究の目的

1 の項目でも記したように、研究代表者らは海馬 CA1 スライス標本におけるテタヌス刺激誘発性の afterdischarge について、グルタミン酸伝達が遮断された条件下でもリズムが生成される事実を発見し、その発生メカニズムを解析しようと試みた。その結果、インターニューロンの中でも、高頻度発火特性を持つ多形・錐体細胞層のインターニューロンネットワークがリズム活動を生成していると考えられた。本研究では、これらのネットワークを構成する個々のニューロンのうち、リズム生成に特化したニューロンサブタイプ（ペースメーカーニューロン）が存在するかどうかを検討することにより、リズム生成メカニズムを解明することを目的とした。さらに、テタヌス刺激誘発性の afterdischarge が発現することが分かっている海馬関連領域について、prototypic afterdischarge が発現するかどうかを検討し、リズム生成に関わるインターニューロンネットワークの領域特異性を解明することを目的とした。

本研究成果が得られれば、哺乳類脳組織局所神経回路におけるリズム生成機構についてそのニューロンレベルでの説明が可能となり、in vivo 脳組織で観察される脳波など生理的リズム活動の生成機構の解明や、側頭葉てんかんなど脳の律動的興奮異常を呈する病態の解明や治療薬開発にも貢献し得ると予想される。

3. 研究の方法

本研究で行われた全ての実験について、動物の飼養および実験上の処置は、「動物の愛護及び管理に関する法律」をはじめとする関係法令、ならびに玉川大学が定める動物実験指針を遵守して行われた。

(1) スライス標本の作成

ラットをエーテルで麻酔し、断頭した後、海馬あるいは大脳皮質組織を摘出して低融

点アガロースにより固定し、スライス標本作成器を用いて厚さ 400 μm のスライス切片を作成した。

(2) 電気生理学的記録法

- ① スライス標本を 1 時間以上人工脳脊髄液 (ACSF) 内でインキュベーションした後、ACSF を循環させた実験チャンバー内に白金製スライス押さえ器で固定した。
- ② 電気刺激装置に接続した微小ガラス管刺激電極を刺入し、テタヌス刺激を行った。パッチクランプ用増幅器に接続したパッチ電極を用い、直視下で細胞内記録を行おうとする細胞に狙いをつけてホールセルパッチクランプ記録を行った。フィールド電位はフィールド電極を刺入して記録した。

(3) 薬理的解析

グルタミン酸受容体拮抗薬 (CNQX (10 \cdot M)、AP5 (50 \cdot M))、GABA_A 受容体拮抗薬 (ビククリン (25 \cdot M)) やギャップ結合阻害薬 (カルベノキソロン (100 \cdot M)) は、ACSF に溶解して灌流投与した。

(4) 形態学的観察

パッチ電極内液には常にバイオサイチン 5mM を溶解しておき、実験後必ず組織学的形態観察ができるようにした。電気生理学的実験の最後に、正電流 (0.5nA、0.5 秒、1Hz) をかけて細胞にバイオサイチンを負荷し、スライスを 10%ホルマリン溶液にて固定し、DAB を発色基質としたアビジン-ビオチン複合体 (ABC) 法により記録細胞を可視化した。

4. 研究成果

(1) prototypic afterdischarge 発現中の個々のインターニューロン活動に対する薬物の影響

prototypic afterdischarge が GABA_A 受容体拮抗薬やギャップ結合阻害薬などにより消失することから、これらの薬物が、prototypic afterdischarge 発生中に同期的なリズム活動を示す高頻度発火インターニューロン群に、どのような影響を及ぼすのかを検討した。ほとんどのインターニューロンはこれらの薬物投与後にリズム活動を示さなくなった (図 1)。

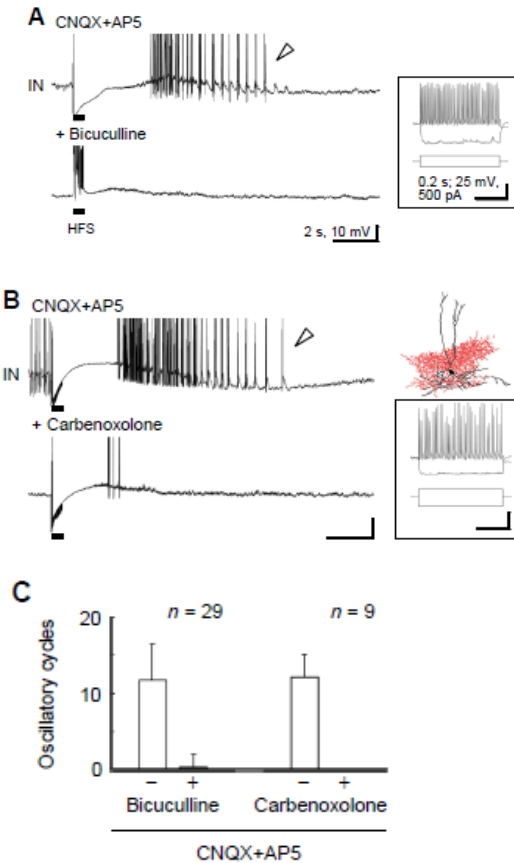


図 1. prototypic afterdischarge 活動を示す高頻度発火インターニューロンに及ぼす薬物の影響。

しかし、GABA_A 受容体拮抗薬ビククリンを投与した後もリズム活動が維持される高頻度発火インターニューロンが数例観察された。このような、リズム活動が残るインターニューロンは、リズム生成の開始に重要な役割を担っている可能性があると考えられた (図 2)。

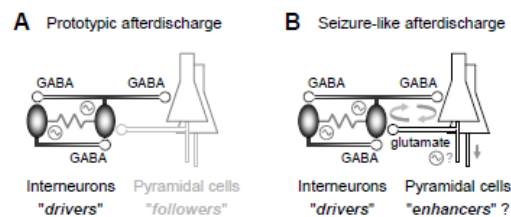


図 2. prototypic-afterdischarge および afterdischarge 発現に関わるネットワークメカニズムの模式図。

(2) 海馬近傍領域における prototypic afterdischarge

海馬CA1領域で発現するprototypic afterdischargeと同様のリズム活動が海馬CA1の近傍領域、すなわち、側頭葉、嗅内野、海馬CA3、歯状回などにおいても誘発され得るかどうかを検討した。これらの領域で、テタス刺激誘発性のafterdischargeが発現することはすでに我々が報告している (Kaneda et al. 2005)。海馬CA3領域では、グルタミン酸伝達が遮断されていない条件下では、数十秒続くはっきりとしたafterdischargeが発現するにもかかわらず、グルタミン酸伝達を遮断すると海馬CA1領域で見られるような膜電位とフィールド電位が同期するリズム活動 (prototypic afterdischarge) は観察されなくなった (図3)。歯状回も同様に、prototypic afterdischargeが観察されなくなった。海馬CA3領域はCA1領域と形態学的にも電気生理学的にも類似した高頻度発火インターニューロンが存在する。それにも関わらず、グルタミン酸伝達遮断条件下ではリズムが惹起されない事実は、大変興味深い。

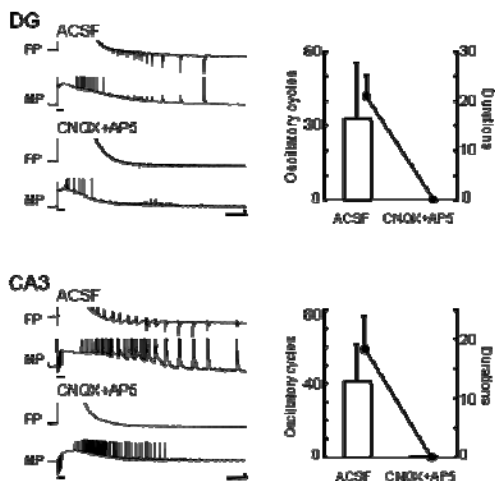


図3. 海馬CA3および歯状回では prototypic afterdischargeは観察されない。

一方、嗅内野と新皮質では、CA1と同様の prototypic afterdischargeが発現した (図4)。嗅内野と新皮質における prototypic afterdischargeは、CA1と同様、GABA_A受容体拮抗薬ピククリン (図4) およびギャップ結合阻害薬カルベノキソロンによって完全に消失した。これらの結果から、インターニューロンネットワークのリズム生成能力には領域による差異が存在すると推察された。この差異が明らかになれば、リズム生成メカニズムの本質を理解する手掛かりがつかめるのかも

しれない。

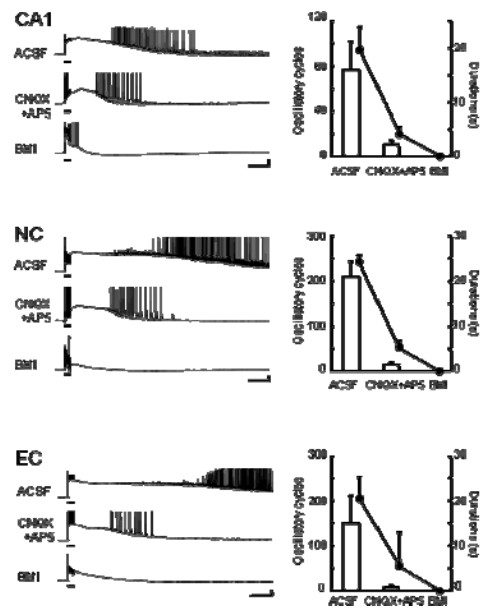


図4. 嗅内野 (EC) および新皮質 (NC) の prototypic afterdischarge。ピククリン (BMI) によって消失した。

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1件)

- ① Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y., Imanishi, M., Ninomiya, T., Tsukada, M., Yanagawa, Y., Fukai, T., Takada, M. (2010) Prototypic seizure activity driven by mature hippocampal fast-spiking interneurons. *J. Neurosci.* 30(41): 13679-89 査読有 DOI:10.1523/NEUROSCI.1523-10.2010

〔学会発表〕 (計3件)

- ① 塚元葉子、磯村宜和、今西美知子、塚田稔、高田昌彦. ラット海馬/大脳皮質における prototypic afterdischarge 発現の領域特異性. 第34回日本神経科学大会. 2011年9月15日. 横浜
- ② 塚元葉子、磯村宜和、今西美知子、塚田稔、高田昌彦. 海馬/大脳皮質各領域における後発射前駆活動. 第33回日本神経科学大会. 2010年9月3日. 神戸

- ③ 塚元葉子、磯村宜和、今西美知子、二宮
太平、柳川右千夫、深井朋樹、高田昌彦.
グルタミン酸非依存性海
「proto-afterdischarge」の発生に關与
する海馬インターニューロンサブタイ
プの同定. 第 32 回日本神経科学大会.
2009 年 9 月 17 日. 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚元 葉子 (藤原 葉子) (TSUKAMOTO YOKO
(FUJIWARA YOKO))

玉川大学・脳科学研究所・嘱託研究員

研究者番号：90209130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし