

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 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700368

研究課題名（和文） ヒゲ感覚に関わる大脳皮質回路の構造と機能：第4層に注目して

研究課題名（英文） Structure and function of the neural circuit processing whisker sensation: focusing on cortical layer 4

研究代表者

古田 貴寛 (Furuta Takahiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60314184

研究成果の概要（和文）：ラットを用いて、ヒゲ感覚を大脳皮質に伝える視床ニューロンの反応特性を調べた。さらにそのニューロンが大脳皮質第4層に展開する軸索の分布を再構築した。反応特性と軸索の分布との関係性を調べたところ、視床から大脳皮質第4層への入力には2種類の正反対の方向選択性マップが重なって存在していることが分かった。大脳皮質では状況に応じて2つのマップを使い分けて入力を受けているのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Response properties of thalamic neurons to whisker stimulation in rats. Furthermore, in cortical layer 4 arborization of axons derived from the recorded neuron was reconstructed. By analyzing the correlation between the response properties and the axonal arborization in each neuron, we revealed that thalamocortical input consists of two overlapping angular tuning maps.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学

キーワード：神経回路網

1. 研究開始当初の背景

ラットにおいてヒゲ（感覚毛、whisker）の感覚情報はその個体を取りまく空間の状況を認知するうえで大変重要である。ラットは基本的に夜に活動性が高く、時として全くの暗闇で行動する。しかしラットの視覚は非常に発達しているわけではなく、暗闇ではほとんどものが見えていないと考えられるため、吻部に生える長いヒゲの感覚が最も優先的な情報源であると考えられる。ヒゲの知覚

情報はヒゲの根元にある受容体から発し、三叉神経節を介して三叉神経核に到達する。三叉神経核のニューロンはその入力によって活動し、さらに出力を視床へと送る。その情報は脳皮質に送られ、最終的に空間的情報が再構築されるものと考えられる。解剖学的側面においてこのシステムは非常にユニークな構造を持つ。ラットの感覚毛は決まった場所に整列して存在しており、中枢では一本一本の感覚毛の知覚に対応して反応するニ

ニューロンのグループがそれぞれ存在する。その分布は感覚毛の空間的配置に対応しており、この構造は視床でも大脳皮質でも見られる。大脳皮質ではそれぞれのヒゲに対応する領域が円柱状になって並んでいるので、それらは **Barrels** (樽) とよばれている。

申請者はラットのヒゲ感覚システムにおける研究手法を学ぶためにカナダ・ケベックシティの **Laval** 大学を訪問し **Deschenes** 博士と一年間共同研究を行った。**Deschenes** 博士の研究室ではピエゾ素子によるヒゲの刺激と細胞外記録法と **Juxtacellular** 標識法を組み合わせることで三叉神経核内でのニューロンの場所とその活動パターンについて調べた。この結果は三叉神経核中間核の活動パターンの初めての詳細な記載となった。またその後、電気生理学、破壊実験、トレーサー注入、**in situ hybridization**、ウイルスベクター、電子顕微鏡等を組み合わせた研究により三叉神経核主感覚核に対する抑制性制御について報告を行った。さらに、ヒゲ刺激に対して異なる反応特性を持つ視床ニューロンは大脳皮質に対する投射パターンが異なることを生理学的手法と形態学的手法を組み合わせることにより明らかにした。

2. 研究の目的

大脳皮質は高次機能の中核であると考えられており、多くの研究者がそれぞれ独自の視点と方法を持ってその秘密に迫ろうとしているが、そこに存在する神経回路の厳密な構造や、ニューロンの活動による情報表現がどのようなものであるかということについて、明らかでないことが多く残されている。大脳皮質第4層は視床から強い入力を受けるといった性質から大脳皮質の入り口ととらえることができる。本申請課題ではその大脳皮質第4層に焦点を絞り、ヒゲ感覚系を題材として回路の活動特性と構造の関係について解析する。

ヒゲ感覚を司る視床から大脳皮質 **Barrel** 領域への入力は「刺激の方向」「ヒゲが動いた距離」「ヒゲが動く速度」「ヒゲに働くトルク」等といった情報（刺激の特性）がコードされていると考えられる。しかし、実験者が単一細胞記録から観測できるのはニューロンのヒゲ刺激に対する反応特性である。その反応特性とは反応強度、潜時、方位選択性といった事柄である。反応特性は刺激の特性と常に一対一に対応している訳ではないので、研究がさらに困難になっている。ここでは比較的その機能的意味を理解しやすい方位選択性に注目する。ある先行研究では大脳皮質2/3層ニューロンの方向選択性はその **Barrel** 内での位置に関係しているという報告がなされている。また、別の研究では **Barrel** 内において似通った方位選択性

を持つニューロンが皮質に垂直方向に並んで小さなカラムを形成しているという報告もある。このように生理学的研究によりニューロンの反応特性については次第に明らかになりつつあるが、残念ながら、それらの投射軸索の形態学的特徴に関するデータが記載されていない。本研究ではニューロンのヒゲ刺激に対する反応特性と、形態学的特徴、つまり回路の単位構造、をあわせて解析し、神経回路を再構築することを試みる。

3. 研究の方法

ピエゾ素子によるヒゲ刺激とガラス電極を用いた細胞外記録を組み合わせることで反応特性を調べ、さらに **juxtacellular injection** (細胞近接注入法) を利用することによりその細胞の形態を明らかにする。

ラットはケタミンとキシラジンのカクテルによって麻酔され、定位脳手術装置に固定される。ヒゲは5mmの長さに切りそろえられ、ピエゾ素子刺激装置がセットされる。ピエゾ素子は電気信号により正確に形状を変化させる材質で、これをステイミュレータでコントロールすることによりヒゲをある方向から一定時間押さえることが出来る。このピエゾ素子を駆動する電気信号はコンピュータにも取り込まれる。細胞標識物質(ビオチン化デキストランアミン、**BDA**)を含んだ電極内液を入れたガラス電極は視床後内側腹側核に刺入され、電動マニピュレータによって動かされる。電極内電位は増幅装置によって増幅されコンピュータに取り込まれる。電極先端がニューロンに十分近づくとその単一ニューロンの発火活動が記録できる。この状態でヒゲ刺激に対するニューロンの反応を記録する。その後、発火活動を観察しながら電極に電流を流すと、電極が細胞体にほぼ密着している場合、ニューロンは脱分極され連続して発火する。これによってそのニューロンに細胞標識物質が注入される (**Juxtacellular injection**)。この実験後にラットを回復させ約2日の生存期間を与える。その間に注入された標識物質は細胞内を拡散し樹状突起や大脳皮質に広がる軸索分枝の隅々まで行き渡る。その後、ラットを還流固定し脳の切片を **ABC** キットで震盪して標識物質にペルオキシダーゼを付加する。さらに **tyramin signal amplification system** (通称 **TSA**) によって標識された細胞にビオチンを大量に付加する。このシステムはペルオキシダーゼ存在下で過酸化水素を基質としてビオチン化チラミンが活性化され組織に共有結合するという現象を利用したものである。もう一度 **ABC** キットでペルオキシダーゼを付加し、**DAB** 発色を行う。このような行程を経ることにより記録されたニューロンの形態を非常に良く視覚化することができる。

樹状突起や軸索分枝の神経終末様構造の分布をコンピュータ化された顕微鏡描画器 (neuroLucida) を用いて3次元的に再構築する。これがサイトクロムオキシダーゼ染色によって視覚化される Barrel の構造とどのような関係にあるかを解析する。皮質内での軸索分布がその軸索が運ぶ情報の特徴 (例えば方向選択性) と何らかの関係があると推測される。

ニューロンの反応特性としては、「方向選択性」に注目して解析を行うが、その他にも基本的なデータである「潜時」や「反応の大きさ (発火放電の数)」等の解析も行う。さらに「ヒゲが動いた距離」「ヒゲが動く速度」「ヒゲに働くトルク (加速度)」といった刺激の特徴がどのように発火特性に反映されているのかを検討する。そのようにして解析されたニューロンの活動特性が投射軸索の形態学的特徴とどのような関係になるか統計的に解析する。明瞭な結果が得られ、生理学的特徴と形態学的特徴の間に関連する要素が直感的に取り出せることが望ましいが、もしそのような結果が得られなかった場合、主成分分析など多変量解析の手法も取り入れることを視野に入れている。

Juxtacellular injection 法は生理学的データを記録した細胞の形態や化学的特性を明らかにできる利点を持ち、1996年に論文発表されて以来、いくつかの研究室がその技術を利用して有益な結果を出してきている。しかし、この方法の弱点として、標識があまり強くない、成功率がなかなか上がらないという問題がある。特に本申請課題の目的のためには、標識が弱く軸索の隅々まで視覚化することが難しいということが大きな問題点であった。しかし、申請者は注入する標識物質の種類や濃度、ガラス電極の形態などを最適化し、また、TSA法を自作した試薬で行うことにより高い成功率で軸索の明瞭な可視化を実現する手技を確立した。

4. 研究成果

視床後内側腹側核の中央部において一本のヒゲに反応するニューロンが集まっていることを確認した。それらのニューロンの方向選択性を調べた後、上にも説明した Juxtacellular labeling 法を利用してそのニューロンに標識物質を注入する。バレル皮質において視床から投射された線維の分布を見ると、バレル内に一様に広がるのではなく、何らかの偏りをもっていることが分かった。実際のヒゲの配列とバレル皮質の体部位表現が対応するようにバレルを回転して、視床ニューロンの方向選択性とバレル内での軸索終末の偏りの相関を調べたところ、好みの方向に対応する側に終末を集中させるタイプとその反対側に軸索を集中させるタイプ

の二つの群に分かれることが明らかになった。この二つの群の投射軸索を足し合わせると、それぞれの群が持っている方向選択性と終末分布の相関は帳消しになって、全体としては方向選択性に対する軸索の偏りは存在しなくなる。このことはバレルにおいて方向選択性マップが規則正しく展開されていないことを示す先行研究ともよく合う。ここで我々の研究結果が示したことは、二つの正反対の方向選択性マップがバレル内で重なっているということである。この構造の持つ意義は、一連のヒゲ感覚情報が持つ文脈やラットの能動的探索行動などに応じてこれらのマップが柔軟に使い分けられているということかもしれない。

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8件)

1, Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka Y, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. (2011) Morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: A single neuron tracing study with viral vectors. *Cereb Cortex* in press 査読有

2, Tanaka YR, Tanaka YH, Konno M, Fujiyama F, Sonomura T, Okamoto-Furuta K, Kameda H, Hioki H, Furuta T, Nakamura KC, and Kaneko T. (2011) Local connections of excitatory neurons to corticothalamic neurons in the rat barrel cortex. *J Neurosci* in press 査読有

3, Tanaka YH, Tanaka YR, Fujiyama F, Furuta T, Yanagawa Y, Kaneko T. (2011) Local connections of layer 5 GABAergic interneurons to corticospinal neurons. *Front Neural Circuits* 5:12, <http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2011.00012> 査読有

4, Sardella TC, Polgár E, Garzillo F, Furuta T, Kaneko T, Watanabe M, Todd AJ. (2011) Dynorphin is expressed primarily by GABAergic neurons that contain galanin in the rat dorsal horn. *Mol Pain* 7:76, <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-7-76> 査読有

5, Furuta T, Deschênes M, Kaneko T. (2011) Anisotropic distribution of thalamocortical boutons in barrels. *J*

Neurosci 31(17):6432-9,
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6154-10.2011> 査読有

6, Ma YF, Hioki H, Konno M, Pan SX, Nakamura H, Nakamura KC, Furuta T, Li J-L, Kaneko T. (2011) Expression of Gap Junction Protein Connexin36 in Multiple Subtypes of GABAergic Neurons in Adult Rat Somatosensory Cortex. *Cereb Cortex* 21(11):2639-49,
<http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhr051> 査読有

7, Honda Y, Furuta T, Kaneko T, Shibata H, Sasaki H. (2011) Patterns of axonal collateralization of single layer V cortical projection neurons in the rat presubiculum. *J Comp Neurol* 519(7):1395-412,
<http://dx.doi.org/10.1002/cne.22578> 査読有

8, Fujiyama F, Sohn J, Nakano T, Furuta T, Nakamura KC, Matsuda W, Kaneko T. (2011) Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur J Neurosci* 33(4):668-77,
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07564.x> 査読有

〔学会発表〕 (計 28 件)

古田貴寛 Morphological analysis of axon collaterals derived from single corticospinal neurons in subcortical structures、第 117 回日本解剖学全国学術集会、2012、3、27、山梨大学

古田貴寛 皮質脊髄路ニューロンの軸索側枝を単一ニューロンレベルで形態学的に解析する、第 34 回日本神経科学大会 2011、9、16、パシフィコ横浜

古田貴寛 三叉神経核群中間亜核のヒゲ感覚ニューロンに対する大脳皮質由来の制御 第 33 回日本神経科学大会 2010、9、2、神戸コンベンションセンター

〔図書〕 (計 1 件)

古田貴寛 (2012) 触覚システムにおける神経回路の構造と機能：ラットのヒゲ感覚システムを題材として。ブレインサイエンスレビュー2012、(出版社：クバプロ) 107-126

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mbs.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田貴寛 (Furuta Takahiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60314184