

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650224

研究課題名(和文) 顆粒細胞のユニットレコーディング法の確立と小脳皮質への適用

研究課題名(英文) Development and application of unit-recording method for cerebellar granule cells

研究代表者

石川 享宏 (ISHIKAWA, Takahiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：90595589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来のユニットレコーディング法を発展させ、これまでは記録が困難であった小脳顆粒細胞などの小型の神経細胞にも適用可能な新たな手法の確立を試みた。麻酔下のラットにおいて小脳顆粒細胞と推定されるユニット活動を計測するための実験システムを構築し、更に運動課題遂行中のニホンザル小脳において、小脳顆粒細胞への入力である苔状線維の終末から長時間安定してユニット活動を計測する手法を確立した。この手法を用いて運動時の大脳から小脳への入力を網羅的に計測し、運動指令のコピーが送られていることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Modification of extracellular unit-recording method was attempted to investigate neural activity of small neurons, e.g. cerebellar granule cell, which is difficult to be recorded by normal unit-recording method. Major improvement in S/N ratio achieved by modification of electrode and amplifier allowed isolation of tiny spikes generated by small neurons. The modified system provided a preferable condition to record presumed unit activity of cerebellar granule cells in anesthetized rats, and furthermore mossy fibers in behaving monkeys. Mossy fibers in the lateral part of the cerebellum originate from cerebral cortices and form small glomerulus with granule cell dendrites. Movement-related activity of mossy fibers was recorded to examine input to granule cells during a movement in behaving monkeys, and it was suggested that the cerebellum receives a copy of motor command before movement onset.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳・神経 顆粒細胞 苔状線維 ユニットレコーディング 小脳

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来のユニットレコーディング法(単一神経細胞活動の細胞外記録法)は、脳全体の1%にも満たない大型の神経細胞を主な記録の対象としている。しかしながら、実際の神経回路における情報処理においては、圧倒的多数の小型の神経細胞も重要な役割を果たしていると考えられる。このため、顆粒細胞など小型の神経細胞の活動を、ユニットレコーディング法の特徴である極めて高い時間解像度で捉えることは、そこで行われている情報処理の全体を正しく理解する上で重要である。

(2) 小脳皮質の神経回路構造は大脳皮質に比べて単純で規則正しく、顆粒細胞が存在する部位や回路内での入出力関係も明確に記載されている。このような利点から、麻酔下のラットや除脳ネコにおいて小脳顆粒細胞の活動記録を試みた例(Chadderton et al. 2004, Jörntell and Ekerot 2006)がある。近年では種々のイメージング法によって顆粒細胞の活動記録を試みた例もあるが、顕著な結果は得られていない。

## 2. 研究の目的

(1) 小型の神経細胞のユニット活動記録を可能とする実験システムを構築する。特に行動中の動物において、心拍や呼吸あるいは運動に伴う振動が生じる中でも脳内の特定の位置に長時間安定して電極を維持し、対象となる小型の神経細胞の活動を追跡するための実験システムを確立する。

(2) 小型の神経細胞の一例として小脳顆粒細胞のユニット活動を行動中の動物から記録し、小脳皮質における入力(苔状線維)出力(プルキンエ細胞)との比較により、小脳皮質の3層性神経回路における情報処理過程を推測する。

## 3. 研究の方法

(1) ユニット活動記録用の金属電極の形状と記録アンプの特性について検討し、以下の手順で改良を加えた。

記録用金属電極の先端を小型の神経細胞の活動電位を捉える最適の形状に成型した。また、S/N比を損なわない程度に「適度に」高いインピーダンスを持たせる。この改良は次の改良と並列して行った。

記録アンプやプリアンプの特性に改良を加え、高周波数の信号に対する性能を十分に高く設定し、雑音を極限まで低く抑えた。

アクティブシールドにより電極先端から初段アンプに至るまでの高周波成分の信号ロスを最低限に留めた。アクティブシールドとして、記録電極を保護するステンレスのガイドチューブの表面をポリイミドコートで絶縁処理し、アクティブシールドの一部することで信号ロスの低減を図った。

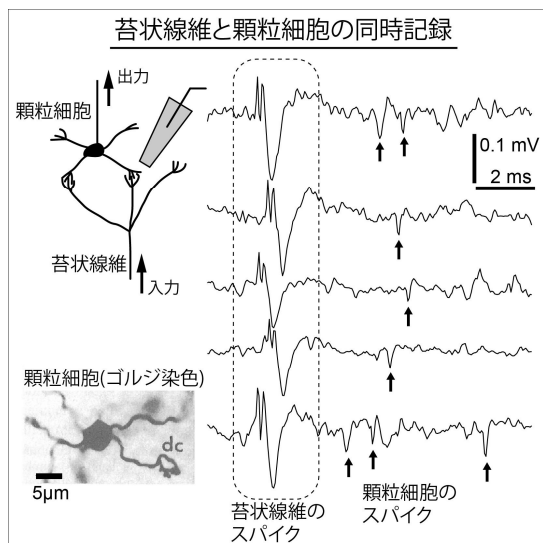
記録電極を小脳皮質顆粒細胞層に長時間保持し、観察される記録波形から上記の妥当性を検討し、必要に応じて更に改良を加えた。

(2) 小脳皮質を構成する主要な要素として、顆粒細胞を除く苔状線維、プルキンエ細胞、ゴルジ細胞はそれぞれが非常に特徴的な活動電位波形と活動パターンを示すことから、これらを分離することは容易である。顆粒細胞については、1つの記録電極で苔状線維終末の活動電位と同時記録することによって同定できると期待される。顆粒細胞はわずかに4本の苔状線維からのみ入力を受け、しかも樹状突起が非常に短いため、直接のシナプス結合を持つ苔状線維と顆粒細胞の組み合わせを同時に記録できる確率が非常に高い。従って、苔状線維のユニット活動と同時に記録された小型のスパイクの中に、苔状線維の活動に有意な時間的相関を示すものがあれば、

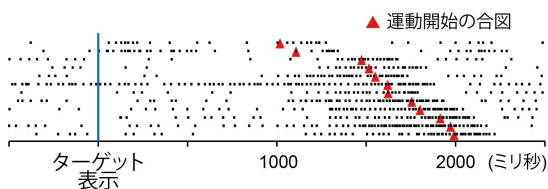
それは結合関係のある顆粒細胞のユニット活動であると同定できる。このような方法を用いて顆粒細胞のユニット活動を同定し、活動電位波形の特徴や活動の時間パターンを詳しく分析することとした。

#### 4. 研究成果

(1) 記録用金属電極の先端形状およびアンプの改良により、麻酔下ラットの小脳皮質において、体性感覚刺激を模した電気刺激に伴う苔状線維および顆粒細胞と推定されるユニット活動を一本の電極で同時に記録できることを確認した。



(2) 上記の実験システムを用い、手首を用いた運動課題を遂行中のニホンザル小脳においてユニット活動記録を試みた。最初に、記録電極を顆粒細胞層に保持する手法を確立し、かつ顆粒細胞への入力を調べるために、苔状線維終末からユニット活動を記録した。その結果、先行研究 (van Kan et al. 1993) と同様に、運動に伴う活動の増加や減少が観察された。更に、運動開始の合図に先行する活動変化も生じていることを初めて示した



(Ishikawa et al. 2014b)

運動の準備中に生じる同様の神経活動の変化は大脳運動野、小脳核、視床でも確認されていることから、大脳皮質と小脳を結ぶ大脳-小脳連関と呼ばれるループ状の神経回路において形成・維持される神経活動であると考えられる。また、苔状線維のユニット活動パターンは大脳運動野の神経細胞と多くの点で共通していたことから、運動時に大脳運動野で作られた運動指令のコピーが小脳に送られていると推測される。苔状線維を介してこのような入力を受ける顆粒細胞もまた、共通するパターンを持った活動を示す可能性が高い。

(3) 運動課題遂行中のニホンザル小脳から顆粒細胞活動の記録を試みたが、単一の顆粒細胞活動の分離は極めて困難であった。一つの小脳糸球体には約 50 個の顆粒細胞が含まれるとされており、これらの細胞が同期した活動を示す可能性がある。今後も記録データの分析を進め、活動電位波形のわずかな違いから信号源の分離を試みる。

#### < 引用文献 >

Chadderton P, Margrie TW, Häusser M. Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature*, 428(6985):856-60 (2004)

Jörntell H and Ekerot CF. Properties of somatosensory synaptic integration in cerebellar granule cells in vivo. *Journal of Neuroscience*, 26(45):11786-97 (2006)

van Kan PL, Gibson AR, Houk JC. Movement-related inputs to intermediate cerebellum of the monkey. *Journal of Neurophysiology*, 69:74-94 (1993)

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ishikawa T, Tomatsu S, Tsunoda Y, Lee J, Hoffman DS, Kakei S. Releasing dentate nucleus cells from Purkinje cell inhibition generates output from the cerebrocerebellum. *PLoS ONE* 9(10):e108774 (2014a) doi:10.1371/journal.pone.0108774 (査読有)

Ishikawa T, Tomatsu S, Tsunoda Y, Hoffman DS, Kakei S. Mossy fibers in the cerebellar hemisphere show activity during an instructed delay period. *Neuroscience Research* 87:84-89 (2014b) doi:10.1016/j.neures.2014.07.006 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

石川享宏、寛慎治 大脳小脳における出力生成メカニズム 包括脳ネットワーク・冬のシンポジウム 東京医科歯科大学(東京都) 2014年12月12日

Ishikawa T, Tomatsu S, Hoffman DS, Kakei S. Releasing dentate nucleus from Purkinje cell inhibition generates output from the cerebrocerebellum. International Symposium -Vision, Memory, Thought- 東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都) 2014年12月6-7日

Ishikawa T, Tomatsu S, Hoffman DS, Kakei S. Mossy fibers in the cerebellar hemisphere show activity during an instructed delay period. *Neuroscience* 2014, Washington DC (USA) 2014年11月18日

石川享宏、戸松彩花、寛慎治 遅延運動課題における小脳半球部への苔状線維入力 第37回日本神経科学大会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年9月11日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 享宏 (ISHIKAWA, Takahiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野

研究員

研究者番号: 90595589

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし