

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700345

研究課題名(和文) 行動決定におけるラット前頭前野錐体細胞と介在細胞の役割と皮質下投射細胞の出力情報

研究課題名(英文) Role for pyramidal cells and interneurons in prefrontal cortex underlying decision making and output information to subcortical areas

研究代表者

半田 高史 (Handa, Takashi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40567335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：行動選択におけるラット前頭前野(PFC)の錐体細胞(RS)と介在細胞(FS)の役割と多細胞集団の処理メカニズムと出力情報を理解することを目的とし、行動選択中のラットPFCから細胞活動を記録し、細胞(集団)活動がどのように表現されるかを解析した。RSとFSは同じような情報処理(音や行動選択)に貢献することが示唆された。PFC細胞集団は手掛かり刺激が新規な音に対し聞き慣れた音の時と似たような発火パターンを示すことがわかり、事前情報を利用して情報処理に寄与することが示唆された。線条体に投射する錐体細胞の分布する場所から傍細胞記録法による記録細胞のラベルすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To investigate roles for pyramidal cells (RS) and interneurons (FS) in prefrontal cortex (PFC) underlying choice behavior, we recorded neural activity during task performance and analyzed how single (multiple) neurons code the upcoming choice. RS and FS similarly contribute to the choice behavior. When cues were novel for rats, ensemble activity was similar as that when the cue was familiar. It suggests that prior experiences in the PFC bias the ensemble patterns even if sensory cue is novel. It is successful method to combine use of neurotracer to label projection neurons to striatum with juxtacellular recording/labeling method.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：神経生理 ニューロン活動 前頭前野 ラット

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質において、興奮性の信号を伝える錐体細胞と抑制性の信号を伝える介在細胞は互いに結合し、興奮・抑制しあう局所回路を形成する。また、錐体細胞が信号を他領域へ出力することで、複数の領域が神経回路網を形成し、システムとして機能しているはずである。局所回路・神経回路網メカニズムに迫るためには、個々の神経細胞の発火活動を調べるだけでは不十分で、細胞のサブタイプ（錐体細胞・介在細胞）に分類し、同時記録した多細胞間の発火頻度・スパイク時系列や他領域との関係を検証する必要性が注目されている。さらに、記録細胞の皮質内の存在位置（層）、投射様式を形態学的に同定することが必要である。

近年、これらを遂行できる2つの方法が開発・改良され有効となってきた。マルチユニット記録法は電極近傍の複数の細胞から発火活動を同時記録し、細胞間の発火活動の関係（興奮・抑制性）や多細胞集団のコードする情報を検証できる。一方、磯村ら（Nat. Neurosci. 2009）は、レバー押し課題遂行中のラットから単一神経細胞の発火活動を記録し、その記録細胞のみを可視化する慢性傍細胞（ジャクスタセルラー）記録法を確立し、運動発現の神経回路機構の解明する研究を展開している。

研究代表者（半田）は、行動決定に関わる局所回路機構の解明に迫るため、課題遂行中のラットにマルチユニット記録法を適用し、前頭前野（PFC）から多細胞発火活動を同時記録し、細胞間の発火活動の関係を詳細に解析してきた。さらに神経回路網機構まで迫るために、傍細胞記録法と逆行性トレーサーを用いた神経回路標識法を併用すれば、錐体細胞の他領域への出力情報を見出せると着想に至った。

2. 研究の目的

大脳皮質の神経細胞は投射型（錐体細胞）と介在型（介在細胞）に分けられるが、行動発現における各々の役割は不明である。近年、私たちは行動決定におけるラット前頭前野（PFC、特に非顆粒領域の内側部）の錐体細胞は行動選択や報酬結果に関係した応答を示すことを見出した。一方、それら情報がどこへ出力されるのか分かっていない。本研究は、錐体細胞と介在細胞の応答特性を比較し、同時に行動決定の神経基盤である大脳基底核や視床に投射する錐体細胞の発火活動を解析し、介在細胞の役割と神経回路網における出力情報の理解を目的とした。

3. 研究の方法

（1）これまでの研究で得られてきたデータをもとに、PFCにおける錐体細胞と介在細胞の機能的相違点を検証するために、マルチユニット記録し、スパイクソーティング（竹川ら、Front. Neuroinfo. 2012）によって単離されたユニットのスパイク波形から錐体細胞と介在細胞を推定し、細胞タイプごとに単

一細胞活動の特徴を比較した。

（2）個別の細胞活動だけでなく、同時に得られた細胞集団がどのような情報をコードするかを、機械学習の解析手法を用いて、細胞集団活動の発火頻度から発火パターンを解析した。

（3）傍細胞記録法は神経活動を記録した細胞を形態学的に可視化できる一方で、検証する上で必要な細胞数のデータを得るためには、多個体の実験動物が必要となる。なぜなら、慢性傍細胞記録法はラットにつき1~2個の細胞を記録することが限度であるからである。そのために、当研究室（理研BSI、深井研究室）にすでに設置され日常的に稼働している多個体課題訓練機（デュアルゾンデリッキング装置を搭載した多個体オペラント課題訓練機）を用いて効率的にラット（Long-Evans rats, 200-250 g, ）を訓練した。つまり、多個体訓練機の効率的稼働が、この点を解決する肝となる。

（4）他領域に投射するPFCの錐体細胞がどのような情報をコードするかは不明である。皮質下の背側線条体（STR）に投射する錐体細胞の出力情報を電気生理学および組織学的に調べるために、以下のように傍細胞（ジャクスタセルラー）記録法と細胞標識法の併用を試みた。

記録の4日前に、STRに逆行性蛍光トレーサーFluoro gold (FG)を電気浸透的に微量注入する。訓練されたラットにマルチユニット記録法と傍細胞記録法を適用して、課題遂行中の神経活動をPFC（マルチユニットとジャクスタセルラー）、もしくはPFC（マルチユニットとジャクスタセルラー）およびSTR（マルチユニット）から記録した。具体的には、2%ニューロピオチンを充填したガラス微小電極を刺入し、32チャンネルのシリコンプローブを刺入した。

記録実験終了後、深麻酔下で灌流・固定し、脳をサッカロス溶液に浸透後、凍結脳切片を作成し、組織学的に記録細胞および標識細胞を蛍光可視化し、細胞の有無、位置、形態を蛍光顕微鏡下で観察した。ついでABC-DAB法により記録細胞の微細な形態を再構成して細胞のサブタイプを同定し、何層に位置するかを判定した。

（5）PFCとSTRから同時記録したマルチユニット活動はスパイクソーティングを用いて単一ユニットに分離し、個々の細胞活動および細胞集団の発火活動の特性を解析した。

4. 研究成果

（1）細胞タイプの活動特性の比較

音を手掛かりとした選択課題遂行中のラットのPFCからマルチユニット活動を記録し、当研究室が開発したスパイクソーティング法を用いてユニット活動に分離した。そのユニットごとのスパイク波形からスパイクの幅が広いものを錐体細胞（RS）、狭いものを介在細胞（FS）と推定した。我々は、音の周波数および選択の場所によってPFCの細胞活

動が修飾されることを見出した。続いて、それら細胞タイプごとに分類しそれらの特性を比較した結果、RS細胞とFS細胞は同じような割合で似た応答特性を示すことが示唆され、その応答の経時変化にも違いが見られなかった(図1)。

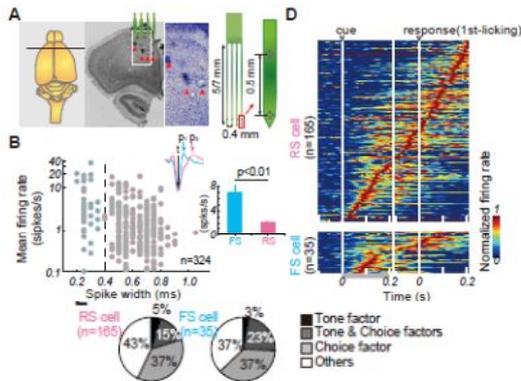


図1. (A)記録場所(PFC), (B)スパイク波形による細胞タイプの推定(D)細胞タイプごとの応答パターン(下段)細胞タイプごとの選択的応答を示す細胞の割合 (Handa et al. 未発表)

従って、RSとFSは協調して同じような情報処理(音や行動選択/運動準備)に貢献することが示唆された。

(2) 多細胞集団活動の解析

多細胞活動がどのように手掛かり刺激や行動選択にかかわる情報を処理するかを調べるために、ある時刻 t における各細胞の発火活動(発火頻度)から構成される発火活動ベクトル (V_t , N 個の細胞からなる集団だと N 次元のベクトル)とし、解析期間内の V_t がどのような軌道を表現するかを解析した。機械学習による計算法で、フィッシャーの線形分離法を用いた。高次元空間において、あるカテゴリーに関して2つのクラスター(例えば、音の周波数高い・低い音の試行や選択の場所が左・右の試行)が最も分離するよう射影する固有値ベクトルを導くことができ(図2左下)、その2つのクラスターがどの程度分離しているかを計算することができる。この解析手法により、細胞集団の V_t が、どのように選択行動を予測できるかを検証した。

その結果、手がかり刺激提示後約150ミリ秒あたりから選択行動を予測し始めることが示唆された。平均的なラットの反応時間が300ミリ秒前後なので、反応開始よりも先んじて情報が処理された。特に新規の音を手掛かり刺激として提示したときには、軌道の分離は親和音を手掛かり刺激とした時と似ていたが、分離する前に不安定な期間がみられた(図2上)。

この結果から、手掛かり刺激が慣れた音でも初めて聞いた音でも似たような発火パターンでPFC細胞集団は行動選択にかかわる処理に寄与することが示唆された。

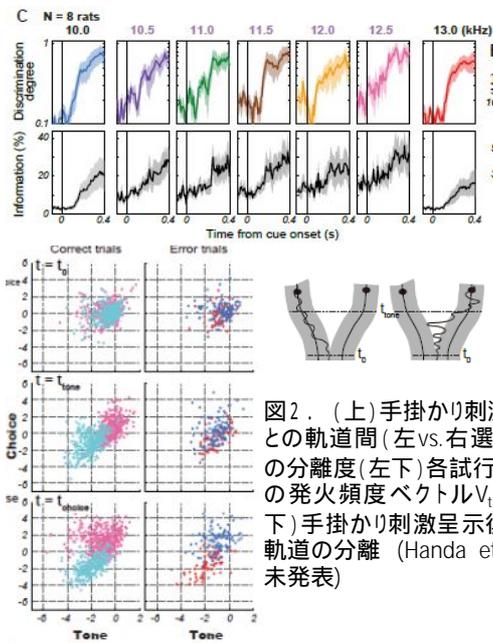


図2. (上)手掛かり刺激ごとの軌道間(左vs.右選択)の分離度(左下)各試行ごとの発火頻度ベクトル V_t (右下)手掛かり刺激提示後の軌道の分離 (Handa et al. 未発表)

(3) 他個体訓練機の効率的稼働化

多個体同時オペラント課題訓練機を用いて、毎週1匹の訓練されたラットを得ることに成功した。課題遂行中のおよそ30匹のラットのPFCから傍細胞記録実験を行うことに成功した。

(4) 神経活動の記録と細胞同定

逆行性蛍光トレーサー-FGを注入して3-4日後、間を経て記録実験を行った。予測した通り記録場所となるPFCの細胞がラベルされ、近い場所から傍細胞記録を行った(図3)。

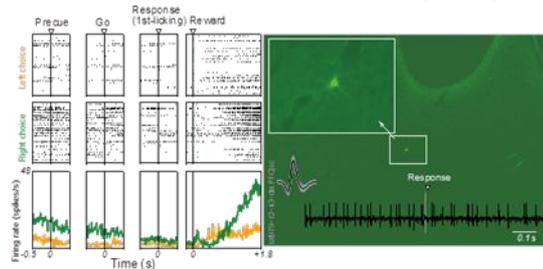


図3. (左)行動選択課題遂行中のラットから傍細胞記録した細胞活動(左、右選択試行に分けて)。 (右)その記録細胞を組織学的に可視化 (Handa et al. 未発表)

なお、組織学的な検証は継続中である。

(5) 皮質 線条体間のネットワーク活動の解析

行動選択課題遂行中に記録したPFCとSTRのユニット活動は、行動選択的な活動を示すことが分かった。一方、両領域から同時記録した多細胞集団のコードする情報を比較した(図4)。同時に記録された細胞集団は似たようなダイナミクスで行動選択に関わる情報を表現していた。期待したようなPFCからSTRへという情報の流れのみでは、説明できない現象も観測された。より複雑な情報のカスケードがありうる。より詳細な解析を継続中である。

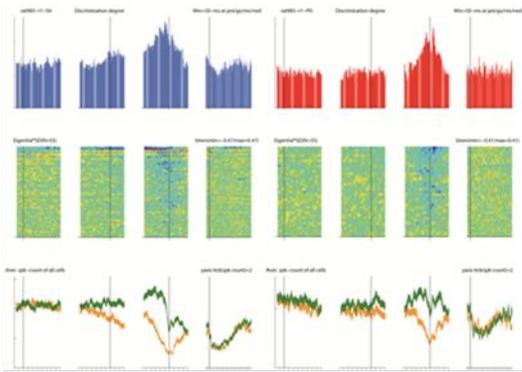


図4. 行動選択課題遂行中のラットのSTR (左)とPFC(右)から同時記録した多細胞集団活動。(右)左・右選択の選択性が反応前から観測された (Handa et al. 未発表)

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 2 件)

S. Unno, T. Handa, Y. Nagasaka, M. Inoue, A. Mikami (2014) Modulation of neuronal activity with cue-invariant shape discrimination in the primate superior temporal sulcus. *Neuroscience*, 268: 221-235. <査読有り>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452214002371>

Y. Isomura, T. Takekawa, R. Harukuni, T. Handa, H. Aizawa, M. Takada, T. Fukai (2013) Reward-modulated motor information in identified striatum neurons. *The Journal of Neuroscience*, 33(25):10209-10220. <査読有り>
 doi: 10.1523/JNEUROSCI.0381-13.2013

〔学会発表〕(計 4 件)

Handa Takashi, Takekawa Takashi, Harukuni Rie, Isomura Yoshikazu, and Fukai Tomoki. Neural ensemble dynamics in rat dorsomedial prefrontal cortex during probabilistic sensory-cued choice. Bernstein Conference, poster W65, 2013 (24-27th September, Tuebingen, Germany)

Handa Takashi, Takekawa Takashi, Harukuni Rie, Isomura Yoshikazu, and Fukai Tomoki. Neural ensemble dynamics in rat dorsomedial prefrontal cortex during a sensory-guided choice task. Neuro2013, P3-2-69, 2013 (20-23rd June, Kyoto, Japan)

Handa Takashi, Takekawa Takashi, Harukuni Rie, Isomura Yoshikazu, and Fukai Tomoki. Representation of sensory feature and spatial choice in dorsomedial prefrontal cortex of rat making action decision using sensory

information. *Society for Neuroscience Abstract*, 38:811.06, 2012 (13-17th October, New Orleans, U.S.A.)

Handa Takashi, Takekawa Takashi, Harukuni Rie, Isomura Yoshikazu, and Fukai Tomoki. Cell type-specific activity in rodent prefrontal cortex for making action decision using novel information. The 8th Federation of European Neuroscience Society Forum, 22.10, 2012 (14-18th July, Barcelona, Spain)

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

半田 高史 (HANDA Takashi)

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 研究員

研究者番号: 40567335

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: