

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24730641

研究課題名(和文) 前頭前野における神経調節物質の影響に関する研究

研究課題名(英文) Effect of the neuromodulator in the prefrontal cortex

研究代表者

渡辺 由美子 (Watanabe, Yumiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・人間情報研究部門・主任研究員

研究者番号：20425739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では主に、大脳皮質にアセチルコリンを分泌する前脳基底部に着目して、前頭前野が、アセチルコリンの影響をどのように受けているのかを明らかにすることを目的とした。アセチルコリンは、記憶や学習、覚醒や注意など様々な機能を修飾することが知られている。実験では、ラットの前脳基底部マイネルト基底核を電気刺激し、大脳皮質前頭葉での応答を、時間・空間的な解像度が優れた膜電位イメージング法を用いて計測した。その結果マイネルト基底核の電気刺激により前頭葉で脱分極性応答がみられた。この応答はアセチルコリン受容体拮抗薬によって亢進したことからアセチルコリンは抑制作用を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Since the spatiotemporal dynamics of the frontal neuronal activity after the stimulation of the basal forebrain is unknown, we addressed this issue by using voltage-sensitive dye imaging of frontal neural activity evoked by electrical stimulation of the basal forebrain. As a result, voltage-sensitive dye imaging represented by a single-pulse stimulation of the basal forebrain elicited a short-latency excitatory response in the frontal cortex. After application of the acetylcholine receptor antagonist, neural response was spread across a wide area of the frontal cortex and presented a prolonged latency, compared to control condition. Meanwhile, the excitatory response was blocked after the glutamate receptor antagonist application. These results suggested that the basal forebrain-evoked specific excitatory response was attributed to the interaction of cholinergic and glutamatergic projections in the frontal cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：前頭前野 アセチルコリン 光イメージング

1. 研究開始当初の背景

学習や記憶、思考や推論などの高次脳機能に欠かせない前頭前野は、様々な部位からの入力を受けて情報処理を行っている。ドーパミンやアセチルコリンなどの神経調節物質はこうした情報処理を修飾していると考えられている。例えば中脳の「腹側被蓋野」と呼ばれる部位の神経細胞は、脳の活性を調節する物質である「ドーパミン」を産生し、前頭葉などに分泌してゆっくりと脳の機能を調節すると考えられてきた。しかし、神経細胞集団の電気的活動を時間的・空間的に高解像度で調べることができる膜電位感受性色素を用いた光イメージング手法を用いた筆者らの先行研究によりドーパミン細胞がゆっくりとした情報伝達だけでなく、前頭葉に素早く情報を伝える役割も果たしていることが明らかになった(Watanabe et al., 2009)。ドーパミン細胞が、ミリ秒オーダーで脳の機能を調節するということが明らかになったことは、神経調節物質の新たな機能を知る手掛かりとして重要であると考えられる。

アセチルコリン作動性神経は主に前脳基底部分のマイネルト基底核から大脳皮質の広範囲に投射を行い、大脳皮質の働きを調節していることが知られている。これまでにアセチルコリンは、記憶や学習、覚醒や注意など様々な機能を修飾することが明らかになっている。またアルツハイマー型認知症ではマイネルト基底核のアセチルコリン神経が脱落していることから、この部位は特に痴呆や記憶障害と密接に関わることが知られており、前脳基底部分と前頭前野の神経連絡の特徴を明らかにすることは、これらの疾患の原因解明や治療法の開発にもつながる。しかし実際に前脳基底部分と前頭前野の神経連絡の詳細や、アセチルコリン作動性神経及び前脳基底部分に存在する他の神経細胞がどのように前頭前野で情報処理を調節しているかについては明らかになっていない点が多い。

一方前頭前野は視床の背内側核とも相互結合を持ち、統合失調症などの精神疾患では、前頭前野の機能低下だけでなく、前頭前野に神経連絡を持つ視床背内側核においても神経細胞数の減少や委縮などがみられることが知られている。また筆者らの先行研究では、視床背内側核において、高次脳機能に不可欠な作業記憶に関連した神経活動が見つかり、作業記憶には前頭前野だけでなく視床背内側核も重要な役割を果たすことが明らかになった(Watanabe and Funahashi 2012)。ドーパミン作動性神経やアセチルコリン作動性神経は視床へも投射していることから、こうした神経調節物質が、視床の神経活動に影響を与えることによって、間接的に前頭前野における神経活動を調節していることも考えられる。したがって、視床の神経活動の特徴や情報処理の仕組みを明らかにすることは、こうした間接的な役割を明らかにするためにも重要であると考えられる。

2. 研究の目的

学習や記憶、思考や推論などの高次脳機能に欠かせない前頭前野が、神経調節物質の影響をどのように受けているのかを、ミリ秒オーダーの時間解像度で明らかにすること、これらが前頭前野および関連する神経回路における情報処理にどのように影響するかを明らかにすることを目的とした。本研究では主にアセチルコリンを分泌する前脳基底部分のマイネルト基底核と前頭前野との関係に着目して、前脳基底部分の電気刺激による前頭前野での活動を電気生理学的手法及び、時間的・空間的解像度に優れた光イメージング法により計測することで両領域の関係を明らかにしようと試みた。具体的には、前脳基底部分の電気刺激による前頭前野での応答の時間的特徴・空間的特徴を詳細に検討するとともに、前脳基底部分と前頭葉との間に機能的なトポグラフィが存在するかを前脳基底部分での刺激部位を変化させることにより検討した。さらに、前頭葉においてアセチルコリン受容体拮抗薬などの薬剤を投与することにより、どのような影響が見られるかを検討することで、前頭葉に対する前脳基底部分コリン作動性神経の調節作用を明らかにしようと試みた。

一方前頭前野へは、視床から強い投射が見られることから、視床と前頭前野との関係にも着目し、前頭前野と相互結合を持つ視床背内側核での高次脳機能に関わる神経活動の詳細を明らかにすることを目的として、行動課題を行っているサルに視床から計測した神経活動を解析することにより、作業記憶に関わる神経活動の特徴や情報処理の仕組みを検討した。

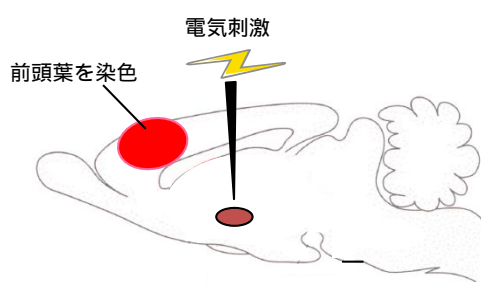
3. 研究の方法

実験にはオスのWistar系ラットを用いた。ウレタンの腹腔内投与(1.3g/kg)によって全身麻酔を行った後、頭部外科手術を行い光イメージングのための背側前頭葉へのチャンバの作成や刺激電極の設置を行った(図1)。電気刺激は同芯円電極(IMB-9002)を用い、刺激部位は、前脳基底部分の前方または後方とした。前脳基底部分の前方を電気刺激する際には、刺激電極の先端がプレグマから後方に約0.8ミリメートル、正中より側方へ2.8ミリメートルになるよう調節した。また前脳基底部分の後方を電気刺激する際には、刺激電極の先端がプレグマから後方に約2.2ミリメートル、正中より側方へ3ミリメートルになるよう調節した。電気刺激は単発刺激(パルス幅300 μ 秒)または高頻度刺激(パルス幅100 μ 秒、刺激頻度100Hz)の2種類を用いた。なお、光イメージングを行う際には単発刺激のみを用いた。

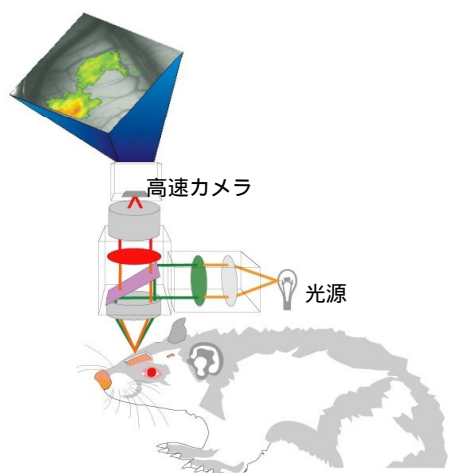
電気生理学計測では、背側前頭葉の脳表に先端が球状の電極を置くことで、刺激前後のローカルフィールドポテンシャルを計測し

た。光イメージングではまず、あらかじめ背側前頭葉に作成したチャンバ内に膜電位感受性色素 RH-795 を満たし、斜光した状態で約 1 時間染色した（図 1）。その後染色液を洗い流し、チャンバ内を人工脳脊髄液で満たし、気泡が侵入しないようカバーガラスで蓋をした。光計測には、高速・高感度 CCD イメージングシステム（MiCam01, Brain Vision）を用いた（図 2）。

電気刺激の位置を確認するために実験終了後、0.1mA の電流を 10 秒間流し、電極先端にマーキングを行った。かん流固定後、脳切片の Nissl 染色により組織標本を作製し、刺激部位の同定を行った。本研究は産業技術総合研究所動物実験委員会の承認を得て行われた。



【図 1】前脳基底部の電気刺激と、背側前頭葉の位置関係の概念図。図はラットの脳を側面から見た図で、左側が前方（吻側）右側が後方（尾側）。実際の実験では、光イメージングのカメラとの接触を防ぐために、刺激電極は後方から角度をつけて挿入した。



【図 2】膜電位感受性色素を用いた光イメージングの概念図。ハロゲン光源からの白色光を波長 540nm に中心透過帯を持つバンドパスフィルターを通して励起光とし、ダイクロイックミラーに反射させ脳表面に照射した。膜電位感受性色素により染色された前頭葉の脳組織からの蛍光は、ロングパスフィルターを通し、CCD 撮影素子により蛍光量変化を検出した。

視床背内側核での高次脳機能に関わる神経活動の詳細を明らかにするための研究では、作業記憶が必要な 2 種類の遅延眼球運動課題を行っているサルの視床背内側核から計測した神経活動を解析することにより、個々のニューロンが遅延期間中の時間経過にともないどのような情報を表現しているかを調べた。また課題の違いによる神経活動の大きさを比較することによって、課題依存的な神経活動が見られるかにどうかついても検討した。

4. 研究成果

実験の結果、マイネルト基底核の単発刺激では刺激強度が強まると大脳皮質前頭前野での反応が増強した。またバースト刺激の前後でローカルフィールドポテンシャルを比較すると、刺激後に前頭前野で低周波成分が減少した。先行研究からも、バースト刺激によって刺激後に低周波成分が減少することが示されており実験ではこの反応を、刺激部位が前脳基部に到達していることの指標とし、引き続き単発の電気刺激による反応を光イメージング手法により計測した。実際に、バースト刺激によって低周波成分が減少した部位は、組織学的な刺激部位の同定によっても、前脳基部マイネルト基底核と一致した。光イメージングの結果マイネルト基底核の電気刺激により前頭葉の広範囲で早い興奮性応答（脱分極性応答）がみとめられることが明らかになった。またこの興奮性反応にアセチルコリンがどのように関与しているかを調べるためにアセチルコリン受容体拮抗薬を前頭葉背側面に設置したチャンバ内に満たし、再び光イメージングを行った。その結果アセチルコリン受容体拮抗薬によってこの応答は亢進した。具体的には、興奮性反応を示した領域は広がり、また反応の持続時間は伸びた。以上のことから、前頭前野において、アセチルコリンは抑制作用を担っている可能性が示唆された。次に興奮性応答の由来を調べるために、グルタミン受容体拮抗薬を投与し、再び光イメージングを行った。その結果興奮性応答は、グルタミン受容体拮抗薬によってほとんど消失した。したがって、前脳基底部の電気刺激によって生じた興奮性応答には、主にグルタミン酸が関わっていたと考えられ、アセチルコリンはグルタミン酸によって生じた興奮性応答の抑制に関わっていたと考えられる。興奮性応答が、前脳基部に存在し大脳皮質に投射するグルタミン作動性神経によるのか、アセチルコリン作動性神経そのもの由来なのか、また視床など他の部位を経由したもののかなどに関する詳細はまだ分かっておらず今後の課題となった。

また本研究によってマイネルト基底核の刺激部位の違いによって、前頭葉でトポグラフィックな応答が見られることが明らかになった。具体的には前脳基部マイネルト基

底核の前方部刺激により背側前頭葉の内側に位置する Fr2 領域を中心に、また後方部への電気刺激では、第一次運動野 (M1) を中心とした領域で応答が見られた。以上の結果は、前脳基底部マイネルト基底核は前後方向で異なる皮質領域の活動を調節していることを示している。

一方作業記憶に関わる視床背内側核の神経活動を解析した結果、遅延期間中に感覚刺激の位置情報を表現し続ける神経活動、遅延期間中に眼球運動の方向に関わる情報を表現し続ける神経活動が見つかった一方で、遅延期間中に感覚情報から運動情報へと単一ニューロンレベルで表現する情報が変化したものもあることが明らかになった。また 2 種類の異なる行動課題で比較すると、特に眼球運動に関わる神経活動において同じ方向への眼球運動であっても課題依存的に活動の強度が変化する神経活動が見つかった。こうした課題依存的な神経活動には課題の特性に応じた注意や覚醒の変化などが影響していることも考えられるため、視床へのアセチルコリン作動性神経がこうした課題依存的な神経活動に影響している可能性もある。

<引用文献>

Watanabe Y, Kajiwara R, Takashima I, Optical imaging of rat prefrontal neuronal activity evoked by stimulation of the ventral tegmental area. *Neuroreport*, 20:875-880, 2009

Watanabe Y, Funahashi S, Thalamic mediodorsal nucleus and working memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36:1, 134-142, 2012

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 8 件)

Information transformation of thalamic mediodorsal neurons during spatial working memory performance., Watanabe Y, Funahashi S, International Neuropsychological Society 41st Annual Meeting, アメリカ合衆国ハワイ州、2013 年 2 月

Task-dependent modulation of saccade-related activity in primate thalamic mediodorsal neurons. Watanabe Y, Funahashi S, 第 90 回日本生理学会、東京、2013 年 3 月

Response of rat frontal neuronal activity evoked by stimulation of the basal forebrain. Nagasaka K, Watanabe Y, Kunori N, Kajiwara R, Takashima I, 第 51 回日本生物物理学会年会、京都、2013 年 10 月 28 日

Task-dependent modulation of primate thalamic mediodorsal activities during working memory performances., Watanabe Y, Funahashi S, The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience, アメリカ合衆国サンディエゴ、2013 年 11 月 12 日

電気刺激が認知機能に関わる神経回路に与える影響に関する研究、渡辺由美子、長坂和明、高島一郎、茨城県つくば市、第 13 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2014 年 2 月 18 日

Analysis of cortical and hippocampal neural activity following basal forebrain stimulation in rats, Nagasaka K, Watanabe Y, Kunori N, Kajiwara R, Takashima I, 第 37 回日本神経科学大会、神奈川横浜、2014 年 9 月 13 日、

Information processing in the thalamic mediodorsal nucleus during spatial working memory performance, Watanabe Y, Funahashi S, 2014 International Symposium Vision, Memory, Thought:How Cognition Emerges from Neural Network, 東京、2014 年 12 月 6 日

Voltage-sensitive dye imaging of rat frontal neuronal activity evoked by stimulation of the basal forebrain, Nagasaka K, Watanabe Y, Kunori N, Kajiwara R, Takashima I, 第 38 回日本神経科学大会、兵庫県神戸市、2015 年 7 月 29 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺由美子 (WATANABE YUMIKO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・人間情報研究部門・主任研究員

研究者番号：20425739