様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

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：６３９０５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４３００１９

研究課題名（和文）皮質局所回路におけるFS細胞と錐体細胞の結合特異性

研究課題名（英文）Connection specificity between cortical pyramidal cells and FS interneurons

研究代表者
大塚　岳（OTSUKA, Takeshi）

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・助教

研究者番号：１０３９０６９２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：皮質の多様な投射先に対応した情報処理様式を理解するために、本研究ではFS細胞と投射先が異なる錐体細胞サブタイプ間の制御機構を明らかにすることを目的とした。前頭皮質の5層においてFS細胞と錐体細胞間の結合様式についてスライス標本を用いて解析した。その結果、FS細胞は錐体細胞サブタイプと非依存的に双方向性のシナプス結合を形成していることがわかった。また、オプトジェネティクスを用いてFS細胞と錐体細胞サブネットワーク間の活動制御を検討した結果、オシレーション活動が特定の錐体細胞サブタイプとFS細胞間で発生した。FS細胞は錐体細胞間の活動を制御するインターフェイスとしての役割を担っていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The cortex outputs the information to several brain areas through different sets of pyramidal cells. It has been shown that cortical pyramidal cells form intra- and inter-laminar subnetworks, depending on pyramidal projection subtypes. Cortical fast spiking (FS) interneurons strongly regulate pyramidal cells through perisomatic innervations. Therefore, it is important to know how activities of individual pyramidal cell subnetworks are regulated by FS cells. I investigated connection pattern between FS and pyramidal cells and optogenetically induced network activities in the rat frontal cortical slices. I found that FS cells form connections between pyramidal cells without pyramidal subtype specific manner. However, oscillatory activities at the frequency around 30Hz were observed in specific pyramidal subtypes and FS cells during light stimulations. These results suggest that FS cells play important roles in regulation of excitatory cell subnetworks.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質　錐体細胞　FS細胞

１．研究開始当初の背景

脳の高次機能を担う大脳皮質の情報処理様式の特徴として、皮質下構造や他の皮質領野へ多様な出力を行っていることが挙げられる。研究代表者は、皮質の錐体細胞は情報を出力する投射領域に依存して生理学的性質や形態の特徴が異なり、様々な投射領域に対応して錐体細胞間のシナプス結合が層内・層間で選択的に形成されていることをこれまでに見出し、投射先に対応した興奮性サブネットワークを同定してきた。しかし、大脳皮質が高次機能を発揮するには多様な投射先へ協働して情報を出力することが必要不可欠である。皮質の主要な介在細胞である Fast spiking (FS) 細胞は錐体細胞と相互にシナプス結合を形成し、活動を制御していることが研究代表者の結果も含めて知られている。従って、FS 細胞が錐体細胞サブネットワーク間の活動制御に関与していることが考えられる。しかし、これまでに FS 細胞がどのように投射先が異なる錐体細胞サブタイプから入力を受け、出力をしているのかは知られていない。また、FS 細胞同士はギャップジャンクションを介して電気的に結合しており、抑制性のサブネットワークを形成している。興奮性の錐体細胞サブネットワークと抑制性の FS 細胞サブネットワークがどのように相互に活動を制御しているのかも明らかでない。

２．研究の目的

皮質の主要な介在細胞タイプである FS 細胞と錐体細胞サブタイプ間のシナプス結合様式を明らかにすることによって投射先に対応した皮質の情報処理を理解することを目的とした。

３．研究の方法

本研究では、ラットの大脳皮質（前頭皮質）の脳スライス標本を用いた。5 層の抑制性介在細胞や錐体細胞からホールセル記録を行い、細胞間のシナプス結合等を解析した。錐体細胞サブタイプは、スライス実験を行う２～３日前に逆行性蛍光トレーサーを投射領域に注入して細胞内ラベルをし同定した。介在細胞は、膜通電による発火特性から FS 細胞と non-FS 細胞に分類した。記録した細胞は、バイオサイチンを記録電極内液に加え、細胞内ラベルを行い可視化した。また、皮質回路においてネットワーク活動を誘発するために、チャネルロドプシン（ChR2）を子宮内電気穿孔法を用いて 2/3 層や 5 層錐体細胞に選択的に発現させ、青色（波長 470nm）の光をスライス標本に照射することによって ChR2 を活性化させた。

FS/錐体細胞の結合回路に関する計算機シミュレーションを用いた活動制御様式の解析では、錐体細胞や FS 細胞は、マルチコンパートメントモデルとし、各コンパートメントにはホジキン - ハクスレイ型のイオンチャネルコンダクタンスを導入した。また、スライス標本を用いた実験で得られた結合確率を基にして細胞モデル間にシナプス結合を仮定し、回路モデルを作成した。

４．研究成果

FS 細胞と錐体細胞間のシナプス結合様式を解析するために、５層の FS 細胞と錐体細胞から同時にホールセル記録を行った。逆行性蛍光トレーサーを対側の皮質と同側の橋核に注入し、それぞれの領域に投射する錐体細胞サブタイプを同定した。尚、これらの細胞は二重にラベルされることはなく、異なる錐体細胞サブタイプであることが研究代表者らの知見も含めて知られている。FS 細胞への錐体細胞サブタイプからの入力について解析した。記録している細胞への入力を検討するために、グルタミン酸を先端が細いガラス管を用いて、細胞体（シナプス前細胞）に

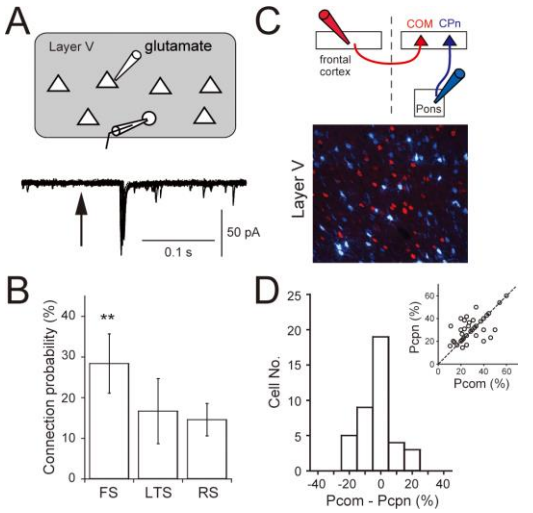

図 - 1　FS 細胞への COM、CPn 細胞の入力

短時間投与した。この方法は、単一または同時記録する複数の細胞へのシナプス前細胞を、簡便に多数の細胞の中から検索することができる利点がある。単一の FS 細胞への対側の皮質に投射する細胞（COM）と同側の橋核に投射する（脊髄路）細胞（CPn）の入力を検討した結果、29.3±11.6 と 30.7±11%の確率で COM、CPn 細胞から入力を同様に受けていた（図 - 1）。さらに、FS 細胞と COM /

CPn 細胞から同時にホールセル記録を行った。

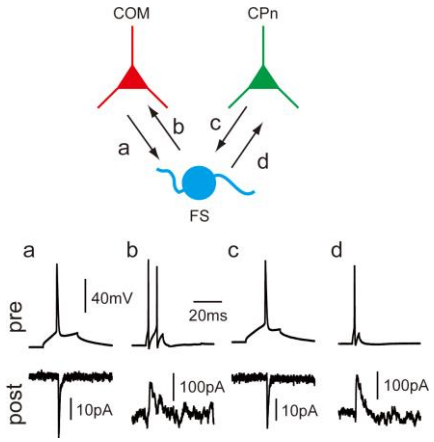

図 - 2　FS、COM、CPn 細胞の同時記録による結合様式

その結果、同一の FS 細胞に投射する COM、CPn 細胞がよく記録された（図 - 2）。また、COM、CPn 細胞から FS 細胞がシナプス入力を受けていた場合、FS 細胞は抑制性のシナプスを COM、CPn 細胞に形成していた。これらの結果は、単一の細胞レベルで FS 細胞はインターフェイスとして投射先が異なる錐体細胞サブネットワーク間の活動を制御していることを示唆する。

皮質回路では錐体細胞は投射先に依存して層内・層間でサブネットワークを形成していることが知られている。また、FS 細胞同士も電気結合を形成し、異なる機能カラムを越えて結合回路を形成していることが知れれている。興奮性の錐体細胞サブネットワーク群と抑制性の FS 細胞サブネットワークの相互の活動制御を検討するために、特定の錐体細胞群に子宮内電気穿孔法を用いて ChR2 を発現させ、光刺激によって誘発されるネットワーク活動を解析した。ラットでは胎生 17 日目に子宮内電気穿孔法を行うと 2/3 層の錐体細胞群に ChR2 が導入されることがわかった（図 - 3）。2/3 層から 5 層錐体細胞へのシ

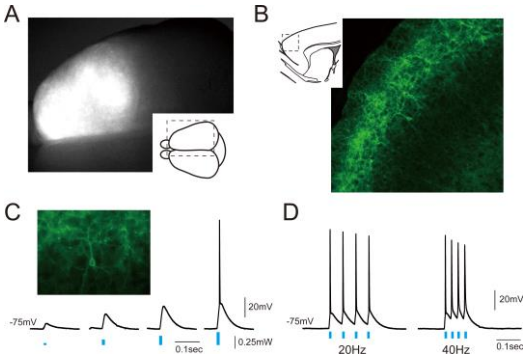

図 - 3　ChR2 の発現と光刺激によるスパイク応答

ナプス結合は、5 層錐体細胞サブタイプに依存して共通入力を形成していることが研究代表者の知見などで知られている。そこで、ChR2 を発現している 2/3 層錐体細胞群の活動を光操作することによって誘発されるネットワーク活動を 5 層の細胞において解析した。強度が徐々に強くなるランプ形の光を照射することによって、ネットワーク活動を誘発した。その結果、5 層の錐体細胞、FS 細胞、non-FS 細胞において、～30Hz 程度の膜電位のオシレーションがみられた（図 - 4）。オシ

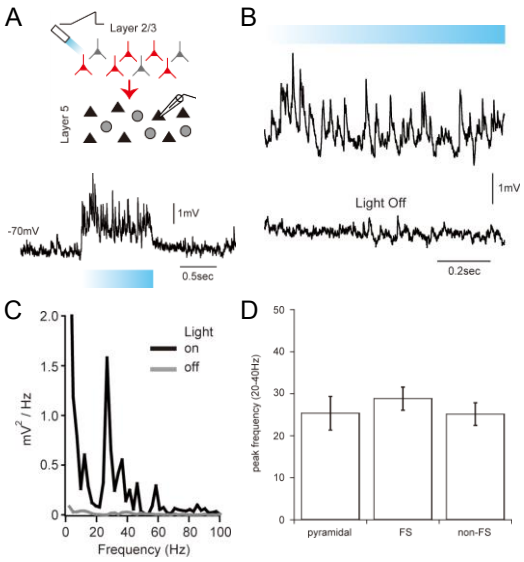

図 - 4　光刺激によるネットワーク活動の誘発

レーション活動の発生機構を検討するために、同時に 2 つの細胞から記録を行い、膜電位オシレーションの細胞間の同期性を解析した。錐体細胞/錐体細胞と錐体細胞/FS 細胞間では、膜電位の相互相関において同期性がみられた。しかし、錐体細胞/FS 細胞間では同期に時差がみられた。また、錐体細胞/non-FS 細胞間では、膜電位の同期性はみられなかった。これらの結果は、錐体細胞と FS 細胞間の相互結合によってオシレーションが形成されていることを示唆する。

5 層の COM、CPn 細胞を逆行性蛍光トレーサーを用いて同定し、オシレーションの発生における錐体細胞サブタイプ依存性を検討した。その結果、多くの CPn 細胞において膜電位のオシレーションがみられた。また、光刺激時における 5 層の細胞の発火活動について、セルアタッチ記録を行い解析した。CPn 細胞と FS 細胞では光刺激時に連続したスパイクの発生がみられたが、COM 細胞や non-FS 細胞では殆どみられなかった。これらの結果は、CPn/FS 細胞の相互結合回路によってオシレ

ーションが発生していることを示唆する。そこで、5 層の錐体細胞に ChR2 を発現させ 5 層錐体細胞の活動を直接操作によるオシレーション活動の誘発について検討した。5 層の錐体細胞に選択的に ChR2 を発現させるために、子宮内電気穿孔法を胎生 14、15 日目のラットに行った。5 層錐体細胞は、対側の皮質などに投射する IT 細胞（COM 細胞を含む）と脊髄路の PT 細胞（CPn 細胞を含む）に分類されるが、CTIP2 の発現の有無で同定できることが知られている。胎生 14、15 日目に電気穿孔法で遺伝子が導入された細胞の CTIP2 の発現について抗体染色を行い検討した結果、胎生 15 日目に遺伝子導入された細胞の殆どは CTIP2 陰性であった（97.7±0.7%）。一方、胎生 14 日目に導入された細胞の内、95.4±0.5%で CTIP2 陽性であった。従って、電気穿孔法を胎生 14、または 15 日目に行うことによって 5 層の PT 細胞と IT 細胞に選択的に遺伝子を導入することができることがわかった。そこで、胎生 14 日目と 15 日目に電気穿孔法を行い ChR2 を導入した動物を用いて、5 層 IT 細胞と PT 細胞の活動を選択的に光操作することによって誘発されるネットワーク活動を比較した。その結果、胎生 14 日目に ChR2 を導入した場合において、ランプ形の光照射によってオシレーション活動が 5 層の錐体細胞や FS 細胞にみられた。しかし、胎生 15 日目に導入した場合は、オシレーション活動が発生しなかった（図 - 5）。これらの結果は、PT（CPn）細胞と FS 細胞の結合回路によって、皮質のオシレーション活動が形成されていることを支持する。

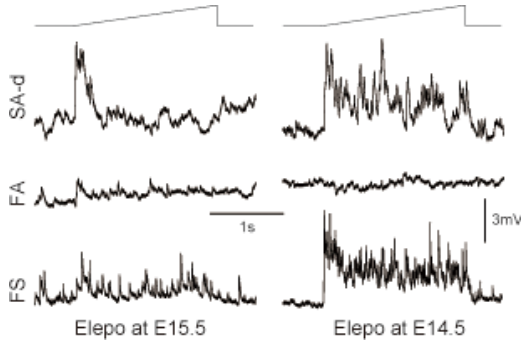

図 - 5　5 層錐体細胞サブタイプ選択的に光操作した時の膜電位応答

5 層の錐体細胞と FS 細胞の結合回路によって、オシレーション活動が形成されるのかについて計算機シミュレーションを行い検討した。錐体細胞と FS 細胞は共に 3 つのコンパートメント（細胞体と 2 つの樹状突起）から成り立つと仮定し、各コンパートメントにホジキン - ハクスレイ型のイオンチャネルコンダクタンスを加えた。PT（CPn）細胞は電流注入に対して持続的に発火するが、IT（COM）細胞は通電に対して発火周波数が徐々に減衰することが研究代表者の知見で知られている。実験データで得られたこれらの発火特性を再現するようにモデル化した。細胞モデル間のシナプス結合は、スライス標本で得られた実験データを基に、錐体細胞サブタイプ間や FS 細胞間などで、興奮性・抑制性の結合を作成した。また、FS 細胞間では電気結合（ギャップジャンクション）も実験データを基に導入し、5 層の結合回路モデルを作成した。光刺激によって誘発される 2/3 層からのシナプス入力として、回路モデルでは入力タイミングが個々の細胞モデルでランダムな入力と共通入力を外部からのシナプス入力として仮定した。錐体細胞サブタイプや FS 細胞に入力する共通入力などは、研究代表者の知見を基に、細胞タイプ間の比率を仮定した。外部からシナプス入力が 1 秒間ある場合についてシミュレーションを行った結果、PT（CPn）細胞と FS 細胞モデルにおいて～30Hz のオシレーション活動が誘発されることがわかった（図 - 6）。また、IT（COM）細胞モデルではオシレーション活動が誘発されなかった。オシレーション活動の形成機構を検討するために、回路モデルを構成するシナプスの結合則を変更した。その結果、回路モデルにおけるオシレーションの誘発には、CPn 細胞間の相互のシナプス結合や、CPn / FS 細胞間のシナプス結合がオシレーション活動の発生に重要であった。

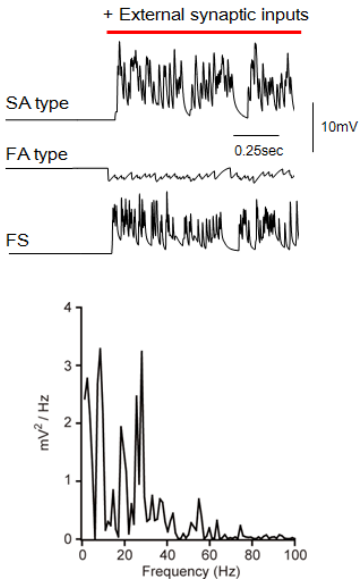

図 - 6　回路モデルにおける外部からの入力に対する細胞モデルの膜電位応答

FS 細胞同士はギャップジャンクションを介して電気的に結合している。ギャップジャンクションは、電気結合した細胞間の同期した活動に影響を与えることが知られている。そこで、ギャップジャンクションの阻害剤である meclofenamic acid をスライス標本に加え、オシレーション活動における電気結合の影響を検討した。その結果、2/3 層への光刺激によって誘発される 5 層細胞でのオシレーションは阻害された。また、回路モデルにおいても FS 細胞間の電気結合を除外すると外部入力によって誘発されるオシレーション活動の発生が阻害された。これらの結果は、ギャップジャンクションがオシレーション活動の発生に関与していることを示唆する。

以上の結果から、FS 細胞は投射先が異なる錐体細胞サブタイプ間の活動制御においてインターフェイスとしての機能的役割を担っていることを示唆する。また、特定の錐体細胞サブネットワークと協働して、学習などに関係するオシレーション活動の形成に FS 細胞は関与していることが示唆された。FS 細胞が特定の錐体細胞サブタイプとの協働によって、どのように大脳皮質の高次機能に関与しているのかは今後の課題である。

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 3 件）

（１） 植田禎史、大塚岳、森島美絵子、牛丸美香、川口泰雄、Multiple layer 5 pyramidal cell subtypes relay cortical feedback from secondary to primary motor areas in rats. Cereb. Cortex., 査読有, 2014, 24(9):2362-2376. DOI: 10.1093/cercor/bht088

（２） 植田禎史、平井康治、大塚岳、川口泰雄、Direction- and distance-dependent interareal connectivity of pyramidal cell subpopulations in the rat frontal cortex. Front. Neural Circuits., 査読有, 2013, 11;7:164. DOI: 10.3389/fncir.2013.00164

（３） 大塚岳、川口泰雄、Common excitatory synaptic inputs to electrically connected cortical fast-spiking cell networks. J. Neurophysiol., 査読有, 2013, 110:795-806. DOI: 10.1152/jn.00071.2013

〔学会発表〕（計 2 件）

（１） 大塚岳、川口泰雄、Cortical membrane oscillatory activities induced by light stimulations.、第 44 回北米神経科学学会、2014/11/15、ワシントン DC、米国

（２） 大塚岳、川口泰雄、光刺激によって誘発される皮質回路のオシレーション活動、第 37 回日本神経科学大会、2014/09/11、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔その他〕
ホームページ等
部門ホームページ
http://www.nips.ac.jp/circuit/

６．研究組織
(1)研究代表者
大塚 岳 (OTSUKA, Takeshi)
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・助教
研究者番号：10390692