

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861764

研究課題名(和文) LSPS法を用いた大脳皮質味覚野における微小カラム状神経回路の解明

研究課題名(英文) Functional mapping of excitatory synaptic inputs in the agranular insular cortex

研究代表者

山本 清文 (YAMAMOTO, Kiyofumi)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30609764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：LSPS法を用いて無顆粒皮質のニューロンが構築する神経回路、さらに無顆粒皮質の回路と、不全顆粒皮質の回路ならびに全顆粒皮質の回路の違いを明らかにした。無顆粒皮質および全顆粒、不全顆粒の5層上部ならびに5層中間部の錐体細胞ならびに高頻度発火型介在細胞(FSN)はいずれも近位から興奮性入力を受けることが示唆され、一方5層下部FSNは下方向腹側から強い興奮性入力を受けていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The insular cortex (IC) plays a pivotal role in processing multiple sensory information. Laser-scanning photostimulation (LSPS) mapping using slice preparations is suitable for exploring neural connections to comprehend the source of excitatory synaptic inputs to a cell. In the present study, we focused on the excitatory synaptic inputs to layer 5 neurons in the AI, which are considered to involve principal projecting neurons to other brain areas. Both pyramidal cells and fast spiking interneurons in upper and middle layer 5 showed the largest evoked EPSCs by stimulating around the recording cell soma, and the evoked EPSC amplitude steeply decreased with increasing distance from the soma. In contrast, the fast-spiking interneurons recorded from lower layer 5 received potent excitatory inputs from ventral and lower directions in the AI.

研究分野：神経生理

キーワード：島皮質 局所神経回路 uncaging

1. 研究開始当初の背景

視覚野や聴覚野と異なり、島皮質には痛覚、内臓感覚、味覚など複数の感覚が収斂する特殊な感覚野である。島皮質は、他の感覚野と類似した6層から構成される顆粒皮質以外に、第4層を欠く不全顆粒皮質ならびに無顆粒皮質から構成される。無顆粒皮質には、痛みに応答するニューロンが存在し (Jasmin et al., 2003, 2004), 不全顆粒皮質には味覚や内臓感覚を処理するニューロンが存在する。大脳皮質局所神経回路は、興奮性錐体細胞ならびに種々の抑制性介在ニューロンから構成され (Kawaguchi et al., 1997)、島皮質内へのムスカリン受容体賦活薬の投与が、一回の忌避物質の投与で形成される味覚嫌悪学習を障害させることから、島皮質の神経回路は可塑的变化を制御していると推察される (Yamamoto et al., 1994)。味覚情報の処理を担う島皮質不全顆粒皮質の局所回路は、興奮性錐体細胞ならびに発火特性の差異によって区別される種々の抑制性介在ニューロンから構成され (Kawaguchi et al., 1997)、これらのシナプス伝達が脳内情報処理機構の根幹を成している。申請者は、スライスパッチクランプ法を用いて島皮質の抑制性シナプスにおけるアドレナリン受容体ならびにムスカリン受容体の動員を介した伝達物質放出の修飾様式が、発火特性などの膜応答特性などによって分類されるシナプス後側ニューロンの種類に依存することを明らかにしてきた (Koyanagi et al., 2010, Yamamoto et al., 2010)。しかし興奮性錐体ニューロンならびに種々の抑制性ニューロンによって構成されるシナプス結合が構築する味覚野の局所神経回路の同定は未だ未解明のままである。したがってこれら種々の神経修飾物質によるシナプス伝達の修飾が、回路にどのような影響を及ぼし、島皮質からの出力を変えうるか推察できていない。微小カラム構造状の応答特性は、他の皮質で同様に観察される発火特性を示す興奮性ならびに抑制性ニューロンが、島皮質内ではこれらニューロン同士で全く異なった特異的なシナプス結合を構築することを示唆する。大脳皮質視覚野や聴覚野と全く異なり大脳皮質味覚野において、甘味や酸味などの味質の違いを知覚するだけでなく、繊細な味を作り出す巧妙な味覚生成システムに寄与する特殊な神経回路が島皮質の無顆粒皮質ならびに不全顆粒皮質に存在すると推定される。

2. 研究の目的

島皮質の特徴として、(1)興奮性ならびに抑制性ニューロンは、甘味や酸味などの基本5味のうち1種類の味質に対して発火応答を示す傾向がある (Yokota et al., 2011)。(2)第2/3を電気刺激すると皮質表層から深層を貫く微小カラム状の応答特性を示すことが知られる (Sato et al., 2008)。(3)我々の先行研究において、第4層を欠いている島皮質におい

て側頭溝下に密に局在する parvalbumin (PV)陽性細胞が、免疫組織学的な検証によって示され、PV陽性細胞は高頻度発火型 (fast spiking, FS)抑制性ニューロンであると同定される (Kawaguchi and Kubota 1997)、ことが挙げられる。したがって、無顆粒皮質ならびに不全顆粒・顆粒皮質で全く異なる回路が存在すると予想されるため、Laser scanning photostimulation (LSPS)法により記録ニューロンに入力する興奮性入力源を推定し、それぞれの領域の興奮性入力マップを作成した。

3. 研究の方法

実験には VGAT-Venus 蛍光タンパク遺伝子導入ラットを用いた。既報に基づき急性脳スライス標本作製した。2-3週齢の Venus 発現ラットを pentobarbital 麻酔下で断頭した (75 mg/kg, i.p.)。吻側大脳皮質を摘出し、マイクロスライサーを用いて島皮質を用いて厚さ 350 μm の冠状断スライスを作製した。人工脳脊髄液灌流下で、共焦点レーザー顕微鏡ならびに蛍光顕微鏡観察下で、Venus 陽性ニューロンと陰性ニューロンを GABA 作動性抑制性ニューロンと興奮性錐体ニューロン (Pyr) に弁別した。複数のニューロンに電極を同時に装着しホールセルパッチクランプ法により膜電位を記録した。脱分極性ならびに過分極性パルスによって惹起された発火パターンや膜特性から記録したニューロンの高頻度発火型介在細胞 (FSN) を同定した。分類したニューロンに対し、-60 mV で膜固定し、脱分極性刺激パルス (1200 pA, 2.5 ms) によってパッチ電極を設置するニューロン同士で形成されるシナプス応答を記録した。ケージドグルタミン酸 (200 μM) および AD-5 (25-50 μM) 灌流下で、記録ニューロン周囲に UV レーザーを 336 ポイント照射し、レーザー誘発性のシナプス応答から記録ニューロンに入力する興奮性入力源の位置を推定した。

4. 研究成果

解剖学的手法により、高頻度発火型介在ニューロンの特異的なマーカータンパクである parvalbumin の陽性ニューロンが集団で無顆粒皮質第 V 層と第 VI 層の境界に存在することが先行研究で示されたため、無顆粒皮質第 V 層ならびに第 VI 層に存在する Pyr および FSN の興奮性入力源を上記手法にて推定した。第 II から第 VI までの AI 全域を 60 μm ずつレーザー照射し、得られたレーザー誘発性シナプス応答を検出し、応答の積分値を解析した。

無顆粒皮質第 V 層上部、中間部および下部において記録された Pyr ならびに同層上部、中間部から記録された FSN は、いずれも記録ニューロンの近位から興奮性入力を受けることが示された。第 V 層上部に位置する Pyr ならびに FSN は、表層からの興奮性入力が多く、第 V 層中間部に位置する Pyr ならびに FSN

は、深層方向から興奮性入力を受ける傾向が認められた。記録ニューロンを中心として表層、深層、腹側ならびに背側の四カ所とそれぞれの地点で挟まれる斜めの四地点の合計 8カ所の平均積分値によって評価される興奮性入力強度の方向性に Pyr ならびに FSN 間に著明な差は認められなかった。一方、層下層の FSN は、腹側からの興奮性入力を受けることが示唆され、これらの FSN は、同位置に存在する Pyr と異なる興奮性入力強度の方向性を示した。AI の FSN でみられた偏った興奮性入力は隣接した不全顆粒皮質の同程度の深さから記録された FSN で認められなかった。これらの結果から、(1)無顆粒皮質第 V 層では、ニューロンが存在する位置によって興奮性の入力の度合いや方向性に違いが認められた。

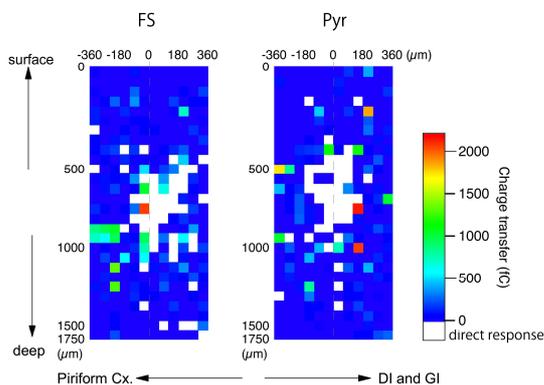


図 1 Pyr ならびに FSN におけるレーザー照射誘発性シナプス応答の代表例。得られたシナプス応答の積分値をカラーコード化し図示した。

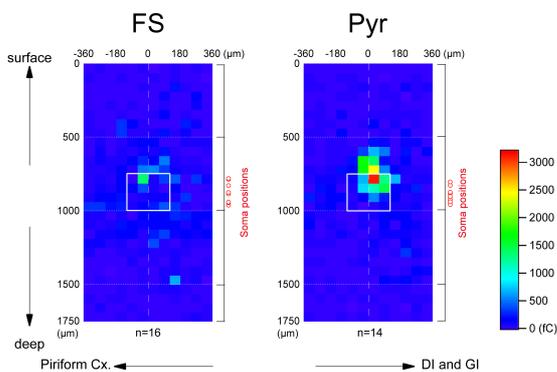


図 2 無顆粒皮質第 V 層 Pyr ならびに FSN におけるレーザー照射誘発性シナプス応答の平均積分値。同様に積分値をカラーコード化し図示した。

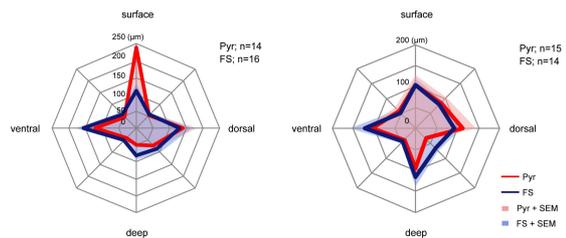


図 3 第 V 層上層ならびに中間層に位置した Pyr ならびに FSN において、レーザー照射誘発性シナプス応答より得られた平均積分値より作成されたレーダーグラフ。

< 引用文献 >

Jasmin, L.Rabkin, S. D.Granato, A.Boudah, A.Ohara, P. T. Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature* 424, 2003 316-320.

Kawaguchi, Y.Kubota, Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex*, 7, 1997, 476-486.

Yamamoto, T. Shimura, T. Sako, N. Yasoshima, Y. Sakai, N. Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res.*, 65, 1994, 123-137.

Koyanagi, Y. Yamamoto, K. Oi, Y. Koshikawa, N. Kobayashi, M. Presynaptic interneuron subtype- and age-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission by beta-adrenoceptors in rat insular cortex. *J. Neurophysiol.* 103, 2010, 2876-2888.

Yamamoto, K. Koyanagi, Y. Koshikawa, N. Kobayashi, M. Postsynaptic cell type-dependent cholinergic regulation of GABAergic synaptic transmission in rat insular cortex. *J Neurophysiol*, 104, 2010,1933-1945.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 1件)

山本清文, 小林真之, 越川憲明, *Laser*

scanning photostimulation 法を用いた島領
野無顆粒皮質の局所回路の同定, 第 130 回日
本薬理学会関東部会, 2014 年 7 月 5 日, 星薬
科大学 百年記念館 (東京都, 品川区)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/g.pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 清文 (YAMAMOTO, Kiyofumi)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 30609764

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし