

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06524

研究課題名(和文) 垂直眼球運動系の神経積分器における持続的活動を生成するための神経回路メカニズム

研究課題名(英文) Neural network mechanisms for the induction of sustained activity in the vertical neural integrator

研究代表者

齋藤 康彦 (Saito, Yasuhiko)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70290913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：水平性と垂直性の視線保持にはそれぞれ脳幹の舌下神経前位核(PHN)とカール間質核(INC)が関与する。本研究では、視線保持に重要である持続的神経活動の生成メカニズムをPHNとINCとで比較することを目的とした。記録したニューロンの近傍に高頻度刺激を与えると興奮性シナプス後電流(EPSC)の発生頻度が持続的に上昇する現象がみられたが、その持続時間はカルシウム透過型AMPA(CP-AMPA)受容体の拮抗薬投与によりPHNでINCに比べ大きく減少し、一方でNMDA受容体の拮抗薬投与によりINCでPHNに比べ大きく減少した。これらの結果から、PHNとINCでは生成メカニズムが異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視線保持のためには神経活動を維持する必要があり、本研究によって持続的な神経活動が水平系と垂直系で異なるグルタミン酸受容体の働きによって生じていることが初めて示された。この成果により、視線制御のメカニズムの解明に大きく進展するものと考えられ、さらに、持続的な神経活動は短期記憶や認知など様々な脳機能において重要な役割を担っていることが知られていることから、脳で汎用的に用いられている情報変換機構解明への波及効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：Gaze holding in the horizontal and vertical directions is separately controlled via the prepositus hypoglossi nucleus (PHN) and the interstitial nucleus of Cajal (INC), respectively. In this study, we clarified the mechanisms of excitatory network activation in the PHN and INC using whole-cell recordings in rat brainstem slices. The effect of a Ca²⁺-permeable AMPA (CP-AMPA) receptor antagonist on the sustained EPSC response was significantly weaker in INC neurons than in PHN neurons. Meanwhile, the effect of an NMDA receptor antagonist on the sustained EPSC response was significantly stronger in INC neurons than in PHN neurons. These results strongly suggest that these excitatory networks are activated via different synaptic mechanisms: a CP-AMPA receptor-dependent mechanism and an NMDA receptor-dependent mechanism in horizontal and vertical integrators, respectively.

研究分野：神経生理学

キーワード：視線制御 興奮性神経回路 NMDA受容体 シナプス後電流 持続的神経活動 パッチクランプ法 スライス標本

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

視覚情報を適切に脳に取り込むためには、視線を保持することで視覚対象を網膜上で静止させる必要がある。そのためには視覚対象の方向に眼球位置を保持しなければならないので、外眼筋（眼を動かす筋肉）を支配する運動ニューロンは眼球の位置情報をコードしている。一方で、外眼筋運動ニューロンへ投射する橋網様体や前庭神経核などの脳幹ニューロンは眼球の速度情報をコードしていることが知られている。したがって、脳幹ニューロンから外眼筋運動ニューロンへ信号が伝わる間に速度情報から位置情報への変換が行われなければならない。この速度 - 位置変換は数学的な時間積分に相当するため、この変換に関与する脳領域は神経積分器と呼ばれている。

水平系と垂直系の視線保持に関与する神経積分器はそれぞれ異なっており、水平系は舌下神経前位核 (Prepositus Hypoglossi Nucleus, 以下 PHN と略す)、垂直系はカハール間質核 (Interstitial Nucleus of Cajal, 以下 INC と略す) が関与することが知られている。神経積分器については理論的な研究により様々なモデルが提唱されているが (Goldman et al. 2009)、生体内での神経積分器の実体は依然不明のままである。したがって、「実際の脳において、神経積分器はどのような神経構築をしており、神経積分器を介した速度 - 位置変換がどのようなメカニズムにより実現されているのか」ということが本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。この問いに答えるためには、神経積分器を構成するニューロンやネットワークの特性を明らかにし、神経積分器の実体に迫ることが必要不可欠である。

水平系の PHN については、古くからの *in vivo* 研究に加え、90 年代初めからスライス標本を用いた *in vitro* の研究が行われてきた。研究代表者らもスライスパッチクランプ法により PHN のニューロンやネットワークの特性について研究を行ない、位置情報をコードする持続的な神経活動の生成には、カルシウム透過型 AMPA 受容体 (CP-AMPA 受容体) のを介した興奮性神経回路の活性化が重要であることを明らかにした (Saito and Yanagawa 2010)。このように PHN についての知見が蓄積されているのに対し、垂直系の INC については *in vitro* での研究がこれまで全く行われていなかった。そこで、研究代表者らは最近 INC の研究に着手し、INC のニューロンやネットワークの特性を明らかにした (Saito et al. 2017)。特に、PHN でみられた興奮性神経回路が INC にも存在するののかという問いに対し詳細に検討した結果、INC にも持続的な神経活動を生成する興奮性神経回路が存在することが明らかになった。しかし、興奮性神経回路の活性化には CP-AMPA 受容体の関与は低いことが示されたことから、INC における興奮性神経回路の活性化メカニズムは PHN とは異なる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまでの研究成果により INC の興奮性神経回路の活性化メカニズムは PHN とは異なる可能性が示唆されたことから、本研究では「INC では持続的に神経活動がどのようなメカニズムにより活性化されているのか?」という問いに対して答えを得ることを研究目的とした。これにより、INC における視線制御のメカニズムに迫るとともに水平系と垂直系の神経積分器の違いについて示唆が得られるものと考えられる。

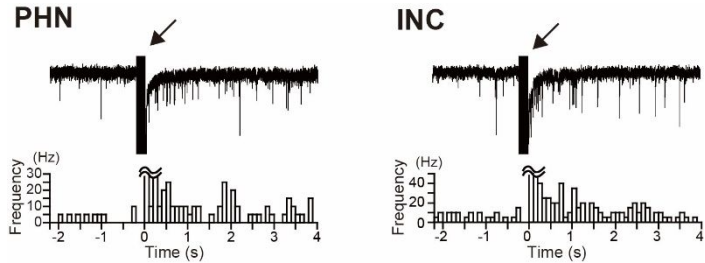
3. 研究の方法

本研究は研究代表者が所属する研究機関の動物実験委員会で承認済みである (承認番号: 11277、12252)。実験には Wild-type の Long-Evans ラットを 30 匹使用した。生後 18 - 21 日齢のラットを十分な麻酔下におき、断頭により脳を取り出し、PHN または INC を含む厚さ 400 μ m の前額断スライス標本を作製した。PHN または INC 内に存在するニューロンからホールセル記録を行い、抑制性シナプス伝達を薬理的にブロックした状態で、記録されたニューロンの近傍に一過性の高頻度電気刺激 (バースト刺激、100 Hz、20 パルス) を与えた。バースト刺激の前後での自発性シナプス後電流 (EPSC) を記録し、刺激後に EPSC の頻度が上昇する持続時間や刺激後 1 秒間の EPSC 頻度を調べた。さらに、CP-AMPA 受容体の選択的阻害薬である 1-naphthyl acetyl spermine (NAS) や NMDA 受容体の選択的阻害薬である D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV) の投与することによって EPSC 頻度や持続時間に変化が見られるのかを調べた。また、CP-AMPA 受容体や NMDA 受容体に分布を調べるために、カイニン酸 (AMPA 受容体の作動薬) や NMDA をニューロンに局所投与することで得られる電流応答を PHN と INC で比較した。

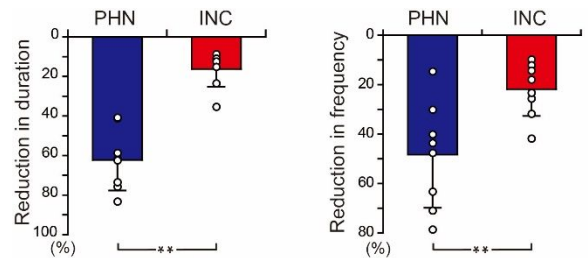
4. 研究成果

PHN と INC それぞれのニューロンからホールセル記録を行い近傍にバースト刺激を与えたところ、刺激前に比べて刺激後には自発性 EPSC の頻度が上昇し、その上昇が数秒にわたって続く「持続的 EPSC 応答」が PHN と INC 両方においてみられた (図 1)。

(図 1) PHN と INC のニューロンで観察されたバースト刺激によって生じる自発性 EPSC の頻度上昇
上段は EPSC のトレース、下段は EPSC の発生頻度をヒストグラムで表したグラフ。矢印はバースト刺激を与えた箇所を示す。

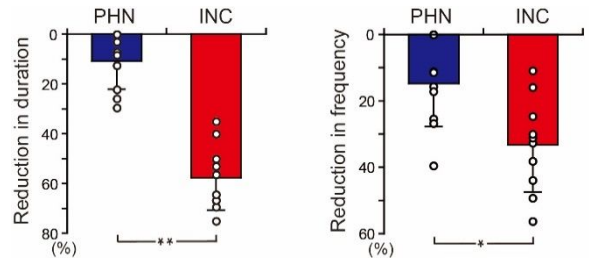


この持続的 EPSC 応答がみられたニューロンに CP-AMPA 受容体の選択的阻害薬である NAS を投与したところ、PHN と INC のニューロン共に EPSC 頻度上昇の持続時間や EPSC 頻度が減少した。この減少した割合を PHN と INC で比較したところ、持続時間と頻度の両方において PHN の減少の割合が INC より大きかった (図 2)。この結果から持続的 EPSC 応答への CP-AMPA 受容体の関与は PHN の方が INC より大きいことが示された。



(図 2) NAS 投与によって EPSC 頻度上昇の持続時間と EPSC 頻度が減少した割合について PHN と INC の比較

一方で、持続的 EPSC 応答がみられたニューロンに NMDA 受容体の選択的阻害薬である APV を投与しても PHN と INC のニューロン共に EPSC 頻度上昇の持続時間や EPSC 頻度が減少した。この減少した割合を PHN と INC で比較したところ、今度は持続時間と頻度の両方において INC の減少の割合が PHN より大きかった (図 3)。この結果から持続的 EPSC 応答への NMDA 受容体の関与は INC の方が PHN より大きいことが示された。

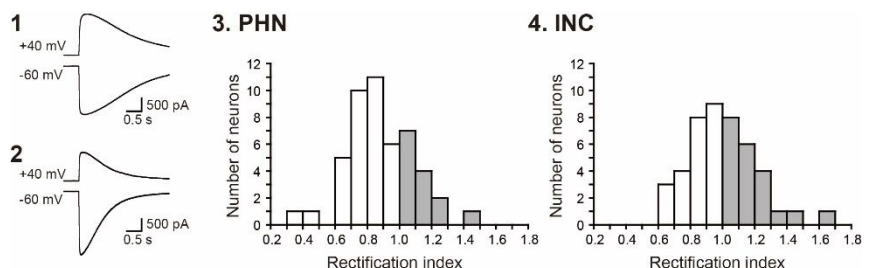


(図 3) APV 投与によって EPSC 頻度上昇の持続時間と EPSC 頻度が減少した割合について PHN と INC の比較

AMPA 受容体にはカルシウム透過型と非透過型が存在するが、その違いは膜電位を -60mV と $+40\text{mV}$ に固定したときにカイニン酸投与によって生じる電流応答の比 (rectification index: RI) が 1 より小さいときはカルシウム透過型、1 以上の時はカルシウム非透過型と判断できる (Ozawa et al. 1991)。そこで、PHN と INC のニューロンにおいて RI 値を求めてヒストグラムを作製した結果 (図 4)、RI < 1 のニューロンの割合は PHN で 70.8% ($n = 48$) だったのに対し INC では 53.3% ($n = 45$) であり、PHN と INC の RI の分布は有意に異なっていた ($p = 0.01$)。この結果から、CP-AMPA 受容体を発現するニューロンは INC に比べて PHN において多いことが示唆された。

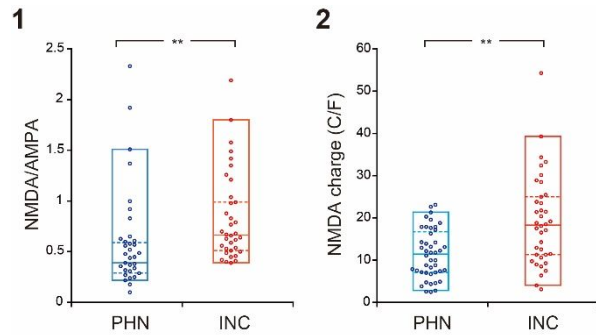
(図 4) PHN と INC における RI の分布

トレース 1、2 はそれぞれ RI > 1、RI < 1 となるトレースを示す。3、4 は PHN と INC の RI の分布を示したヒストグラム。



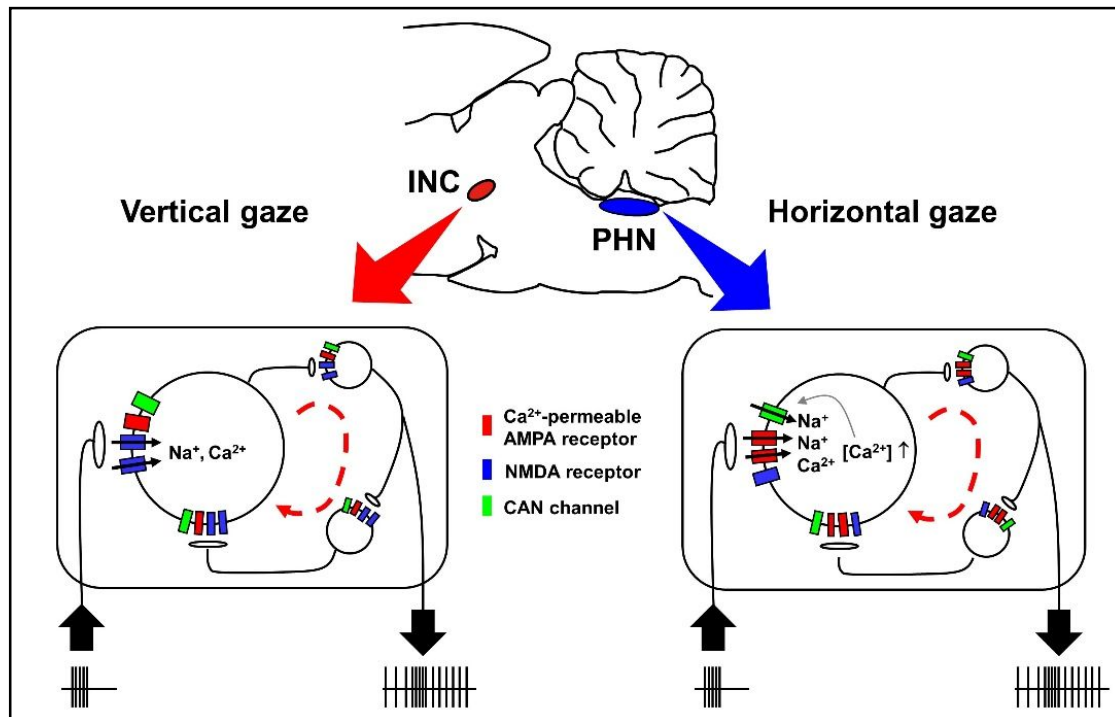
次に、NMDA 受容体を介して生じる電流応答が PHN と INC のニューロン間で異なるのかを調べるために、NMDA 受容体を介する電流応答と AMPA 受容体を介する電流応答の比 (NMDA/AMPA) を比較した (図 5 - 1)。NMDA 受容体を介する電流応答は膜電位を $+40\text{mV}$ に固定して NMDA 投与によって、また、AMPA 受容体を介する電流応答は膜電位を -70mV に固定してカイニン酸投与によ

て求めた。その結果、NMDA/AMPA の値は INC ニューロン (0.82 ± 0.44 , $n = 38$) の方が PHN ニューロン (0.56 ± 0.45 , $n = 44$) より有意に大きかった ($p < 0.0001$)。さらに、NMDA 受容体を介する電流の面積から NMDA 受容体を介する電荷量も求めて比較したところ (図 5-2) INC ニューロン (19.2 ± 8.2 C/F) の方が PHN ニューロン (11.8 ± 5.6 C/F) より有意に大きかった ($p < 0.0001$)。これらの結果から、NMDA 受容体の発現量または NMDA 受容体のコンダクタンスは INC ニューロンの方が PHN ニューロンより大きいことが示唆された。



(図 5) 1. NMDA 応答と AMPA 応答の比、2. NMDA の電荷量における PHN と INC の比較

以上の結果から、持続的 EPSC 応答は、PHN では CP-AMPA 受容体の活性化により生じ、INC では NMDA 受容体の活性化により生じることが明らかになった。これにより、視線保持に重要な興奮性神経回路の活性化は水平性と垂直性では異なるシナプス伝達機構により制御されていることが示唆された (図 6)。



(図 6) 水平性と垂直性の視線保持にかかわる興奮性神経回路の活性化機構の違い

< 引用文献 >

Goldman et al. New Encycl Neurosci. 165-178, 2009
 Ozawa et al. J Neurophysiol 66: 2-11, 1991
 Saito and Yanagawa, J Neurosci 30: 15735-15746, 2010
 Saito et al. eNeuro 4, ENEURO.0180-17.2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sugimura Taketoshi, Saito Yasuhiko	4. 巻 529
2. 論文標題 Distinct proportions of cholinergic neurons in the rat prepositus hypoglossi nucleus according to their cerebellar projection targets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1541 ~ 1552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.25035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamuro Kazuhiko, Yoshino Hiroki, Ogawa Yoichi, Okamura Kazuya, Nishihata Yosuke, Makinodan Manabu, Saito Yasuhiko, Kishimoto Toshifumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Juvenile Social Isolation Enhances the Activity of Inhibitory Neuronal Circuits in the Medial Prefrontal Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.00105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eura Nobuyuki, Matsui Takeshi K., et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Brainstem Organoids From Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Keiju, Yoshino Hiroki, Ogawa Yoichi, Yamamuro Kazuhiko, Kimoto Sohei, Noriyama Yoshinobu, Makinodan Manabu, Yamashita Masayuki, Saito Yasuhiko, Kishimoto Toshifumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Maternal Immune Activation Affects Hippocampal Excitatory and Inhibitory Synaptic Transmission in Offspring From an Early Developmental Period to Adulthood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.00241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morisaki Yudai, Nakagawa Ichiro, Ogawa Yoichi, Yokoyama Shohei, Furuta Takanori, Saito Yasuhiko, Nakase Hiroyuki	4. 巻
2. 論文標題 Ischemic Postconditioning Reduces NMDA Receptor Currents Through the Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and KATP Channel in Mouse Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10571-020-00996-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishitani Ai, Kunisawa Naofumi, Sugimura Taketoshi, Sato Kazuaki, Yoshida Yusaku, Suzuki Toshiro, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Asano Masahide, Saito Yasuhiko, Ohno Yukihiro, Kuramoto Takashi	4. 巻 1706
2. 論文標題 Loss of HCN1 subunits causes absence epilepsy in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 209 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Shohei, Nakagawa Ichiro, Ogawa Yoichi, Morisaki Yudai, Motoyama Yasushi, Park Young Su, Saito Yasuhiko, Nakase Hiroyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Ischemic postconditioning prevents surge of presynaptic glutamate release by activating mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the mouse hippocampus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yasuhiko, Sugimura Taketoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Different Activation Mechanisms of Excitatory Networks in the Rat Oculomotor Integrators for Vertical and Horizontal Gaze Holding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0364-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Yue, Yanagawa Yuchio, Saito Yasuhiko	4. 巻 120
2. 論文標題 Firing responses mediated via distinct nicotinic acetylcholine receptor subtypes in rat prepositus hypoglossi nuclei neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1525 ~ 1533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00168.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugioka Miho, Saito Yasuhiko	4. 巻 48
2. 論文標題 Purinergic modulation of neuronal activity in the rat prepositus hypoglossi nucleus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3354 ~ 3366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sugimura T, Saito Y
2. 発表標題 Neural connections between oculomotor neural integrators and vestibulo-cerebellum.
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugimura T, Saito Y
2. 発表標題 The neural connections between the oculomotor neural integrators and the vestibulo-cerebellum
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学会大会 合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saito Y
2. 発表標題 NMDA receptor-mediated activation of excitatory networks in rat interstitial nucleus of Cajal.
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugimura T、Saito Y
2. 発表標題 The neural connections between the oculomotor neural integrators and the vestibulo-cerebellum.
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugimura T、Saito Y
2. 発表標題 The distribution of the oculomotor neural integrator neurons that project to the vestibulo-cerebellum.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>第一生理学講座研究業績 http://www.naramed-u.ac.jp/~1phy/company.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	杉村 岳俊 (Sugimura Taketoshi) (60812526)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関