

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500370

研究課題名（和文）睡眠・覚醒時の脳活動パターンに依存するシナプス可塑性の研究

研究課題名（英文）A study on the synaptic plasticity depending on sleep/wake brain state

研究代表者

黒谷 亨 (Kurotani Tohru)

東京大学・大学院総合文化研究科・民間等共同研究員

研究者番号：50195591

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラットの脳切片標本を用いて睡眠・覚醒時に特異的に現れる神経活動パターンが、脳内の抑制性シナプス伝達にどのような変化を引き起こすかを調べた。パッチクランプ法による薬理実験、2細胞同時記録、あるいはシナプス電流の非定常状態ノイズ解析等により、皮質錐体細胞の樹状突起部、あるいは細胞体部で誘発される抑制性伝達の長期増強・抑圧のメカニズムの一端が、分子・細胞レベルで明らかになった。

研究成果の概要（英文）： In the present study, we used rat brain slice preparations to investigate the sleep/wake-state dependent synaptic plasticity in inhibitory synapses in the neocortex. Pharmacological analyses, dual whole-cell recordings and non-steady state noise analyses revealed the molecular and cellular mechanisms of the state-dependent plasticity induced in inhibitory synapses at the apical dendrite and/or soma of cortical pyramidal neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：睡眠、覚醒、シナプス可塑性、抑制性伝達、カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

我々は何故眠るのだろうか。近年、睡眠の役割として、脳の可塑性現象との密接な関わりが指摘されるようになってきた。我々は、例えば試験勉強などで学習したことが、一夜の睡眠後に整理され、より想起しやすくなるといった体験を通して、睡眠が記憶の定着に一定の影響を与えていることを経験的に知っている。実際、学習した内容が睡眠時に時間圧縮された状態でリプレイされていること、徐波睡眠時に脳波と同じ周波数の刺激を被

験者に与えると、記憶の定着効率が高まるという報告などがなされており、睡眠が記憶・学習といった脳の高次機能に影響を与えている、アクティブな過程であることが示唆されている。これまでに、記憶の獲得(acquisition)、定着(consolidation)や想起(recall)に対する睡眠の影響について、行動、薬理、スライス実験、睡眠・覚醒中の動物の脳からの多点同時記録、あるいは計算論的観点からなど、様々なレベルでのアプローチがなされ、膨大な知見が蓄積されてきた。しかしながら、睡

眠・覚醒時に特異的に現れる神経細胞の活動パターンが、脳内のシナプス伝達に実際どのような可塑的变化を引き起こすのか、またその変化が神経回路網の挙動にどのような影響を及ぼすのかなどについては、睡眠・覚醒中の動物の脳内において、単一神経細胞間のシナプス伝達特性を長時間安定に記録することが困難であるため、知見が乏しい。

我々は、睡眠・覚醒時に大脳皮質の錐体細胞に現れる特異的な膜電位の活動パターンの違いに着目し、それらが錐体細胞へ入力する抑制性シナプス伝達に及ぼす影響を、ラットの大脳皮質スライス標本を用いて調べてきた。睡眠は急速眼球運動(rapid eye movement, REM)を伴うREM睡眠と、non-REM(NREM)睡眠とに二分される。また、NREM睡眠が深くなるにつれ、脳波には周波数が低く、振幅の大きな波が出現する。これを特に徐波睡眠(Slow wave sleep, SWS)と呼ぶ。大脳皮質の錐体細胞の膜電位は、覚醒時、あるいはREM睡眠時にはやや脱分極し、持続的に活動電位が発生している。また徐波睡眠時には膜電位は0.5から1Hz程度でゆっくりと振動し、脱分極のピークで繰り返し発火が生じる。

従来、この発火パターンの違いに何らかの生理的な意義があるか否かについては、あまり検討されてこなかった。我々は、大脳皮質視覚野のスライス標本において、5層の錐体細胞に電流を注入し、覚醒時のパターンで強制的に活動させると、細胞体部への抑制性伝達が長期的に減弱することを発見した。さらに、徐波睡眠時を模した活動パターンで活動させると、逆に抑制性伝達が長期的に増強することも明らかにした。また、徐波睡眠時、あるいは覚醒時の動物からスライス標本を作成し、実際に徐波睡眠時の方が抑制性シナプス後電流の振幅が大きいことも示した。さらに、この可塑的变化の分子メカニズムについても検討し、覚醒時の脱分極と繰り返し発火によりL型Caチャンネルが活性化されGABAA受容体のエンドサイトーシスが、また徐波睡眠時の低周波振動と発火により、R型チャンネルが活性化されてGABAA受容体のエクソサイトーシスが生じることが明らかとなった(Kurotani et. al., *Neuron*, 57: 905-916, 2008)。

つまり睡眠・覚醒に伴い、錐体細胞の細胞体部への抑制性入力はそれぞれ増強、抑制の両方向に調節されている。その結果として、錐体細胞からの出力は覚醒時に増大し、徐波睡眠時に減少することが明らかになった。これは神経細胞に睡眠・覚醒時に現れる特異的な活動パターンが皮質のシナプス伝達を可塑的に調節していることを示す。

これらの実験事実と、睡眠が脳の可塑性に及ぼす影響に関する先行研究の結果を考え

合わせると、睡眠・覚醒時に特異的な個々の神経細胞の活動パターンが、例えば記憶の定着過程などにも何らかの影響を及ぼすことが強く示唆される。

2. 研究の目的

大脳皮質の個々の神経細胞には、睡眠・覚醒状態に依存して特異的な活動パターンが現れる。その活動パターンが、シナプスレベルでどのような可塑的变化を引き起こすのかについては、限定的な知見しかない。本研究では脳スライス標本内の単一神経細胞を、睡眠・覚醒状態の活動パターンで強制的に発火させる手法を用い、大脳皮質の神経回路網に生じる可塑的变化を分子、およびシナプス伝達レベルで解析し、睡眠・覚醒状態の遷移に伴ってダイナミックに変化する脳内の情報処理過程を明らかにすることを目的とする。

また近年、人の「意識」と脳のdefault mode network (DMN)の活動との間に、重要な関連性のあることが報告されている。意識は睡眠、特にNREM睡眠により消失するため、DMNの活動の性質を調べることにより、睡眠時に生じる記憶の定着のメカニズムの解明につながる可能性がある。我々は、DMNの中で、様々な脳部位と相互に線維連絡を持ち、情報の中継ハブのような働きをすると考えられる、後脳梁膨大部皮質(retrosplenial cortex, RSC)に注目し、それが睡眠・覚醒依存的可塑性に果たす役割を探ってきた。本研究では、2011年度より、皮質内の回路網が未だ不明なRSCの役割を探ることも研究目的に加えた。

3. 研究の方法

生後20-35日令のラット大脳皮質視覚野、および後脳梁膨大部皮質から、堂阪社製マイクロスライサー(Pro7、本研究で購入の主要物品)を用いて、厚さ0.3-0.4mmの標本を作製し、人口脳脊髄液中で灌流する。近赤外微分干渉顕微鏡(IR-DIC)を用いたwhole cellパッチ記録、あるいは細胞外電場電位記録などを行って、皮質内シナプス応答の可塑性や、神経回路網解析を行う(個々の手法の詳細については研究成果欄に記載)。

4. 研究成果

2010年度：我々が発見した、睡眠-覚醒状態に依存する抑制性伝達の可塑的变化は、皮質5層錐体細胞の細胞体部に起こるが、樹状突起部における変化については未解明である。そこで樹状体部の抑制伝達に生じる可塑性現象を調べた。すべての実験は、興奮性伝達の遮断薬であるDNQX、およびDL-AP5を灌流することにより、抑制性反応のみを分離して行った。IR-DIC観察下で、5層の錐体細胞からwhole cellパッチ記録を行い、樹状突

起部に置いたガラス電極から、抑制性伝達物質である GABA を電気泳動的に投与して、それにより生じる抑制性電流を記録した。記録電極からの電流注入により覚醒状態を模した活動パターンで錐体細胞を活動させたところ、GABA に対する応答に、長期増強、および長期抑圧が生じた。しかし、徐波睡眠を模した活動パターンは、GABA 応答に長期的な変化を引き起こさなかった。さらに、薬理的に L 型 Ca チャネルを阻害すると、長期抑圧が起こらなくなり、P/Q 型 Ca チャネルを阻害した場合には長期増強が起こらなくなった (表 1)。

Ca チャネルの種類	細胞体	樹状突起
L 型	長期抑圧	長期抑圧
N 型	—	—
P/Q 型	—	長期増強
R 型	長期増強	—

表 1: Ca チャネルの種類と、そのチャネルからの Ca 流入が各々の部位で引き起こす、抑制性伝達の可塑的変化の種類。

即ち、皮質 5 層の錐体細胞の樹状突起部の抑制性伝達には、徐波睡眠時には可塑的変化が生じないこと、覚醒時には長期増強、および長期抑圧の両方向の変化が誘発されることが明らかとなった。また、それぞれに関与する電位依存性 Ca チャネルは P/Q 型、L 型であることが判明した。

2011 年度: IR-DIC 観察下で、皮質 5 層の錐体細胞と、それにシナプス結合している特定の抑制性ニューロンからペア記録を行い、錐体細胞を覚醒パターンで活動させた場合に、どのような可塑的変化が生じるかを検討した。また、新たな研究対象として、後脳梁膨大部皮質 (RSC) 2 層に存在する錐体細胞の形態学的・生理的特性解析を行った。

(1) 大脳皮質視覚野 5 層の錐体細胞と、その周囲の非錐体細胞 (抑制性細胞と推測) から同時に whole cell パッチ記録を行い、錐体細胞に抑制性シナプス後電流 (IPSC) が生じるペアを探索する。特に、錐体細胞の細胞体部に抑制性シナプスを形成するとされる、fast-spiking neuron と、錐体細胞とのペアに注目した (図 1)。

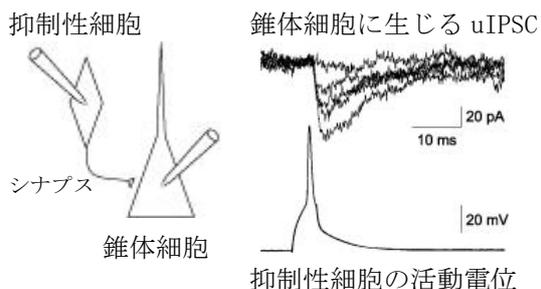


図 1: 錐体細胞にシナプス結合のある抑制性

存在細胞からの同時記録の模式図と、抑制性細胞を発火させたときに錐体細胞に生じる uIPSC の例。

記録電極からの電流注入により覚醒状態を模した活動パターンで錐体細胞を活動させたところ、fast-spiking neuron の単発発火により生じるユニタリ IPSC (uIPSC) の振幅の平均値が減少した。また、前細胞が発火したにも関わらず、後細胞にユニタリ IPSC が生じない確率 (failure rate) が増大した (図 2)。

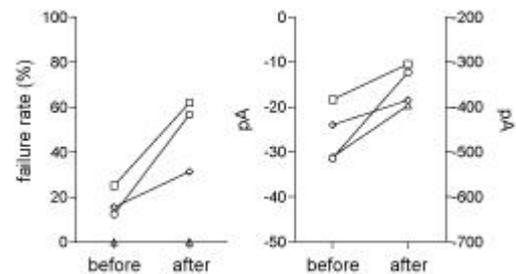


図 2: 抑制性伝達の長期抑圧誘発前後での、fast spiking neuron と錐体細胞間のシナプス伝達の変化。左が failure rate、右がユニタリ IPSC の振幅。4 組の細胞ペアからのデータを表す。

さらに、ユニタリ IPSC に、非定常状態での電流ノイズ解析を適用し、長期抑圧・増強誘発前後における、GABA 受容体の単一チャンネルコンダクタンスと、シナプス後部における受容体数の推定を行った。その結果、長期抑圧、長期増強ともに、誘発後はシナプス後部の GABA 受容体の数がそれぞれ減少、増加することが判明した。これに対し、単一チャンネルコンダクタンスは、方向性を持った変化を示さなかった。つまり、睡眠・覚醒パターンにより誘発される長期抑圧、増強にはシナプス後部の受容対数の変化が寄与することが明らかになった (図 3)。

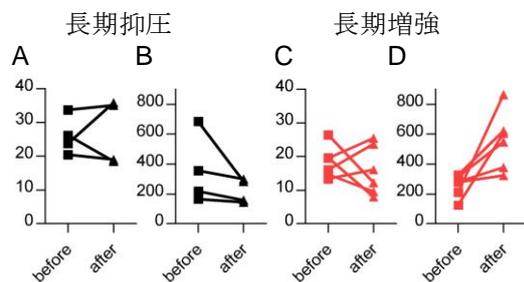


図 3: 長期抑圧、増強誘発前後における、GABA 受容体の単一チャンネルコンダクタンス (A と C、単位 pS)、およびシナプス後部における GABA 受容体数 (B と D、単位、個) の変化を表すグラフ。

これらの結果は、睡眠・覚醒の活動パターンにより引き起こされる抑制性伝達の長期

抑圧・増強が、シナプス後部に生じることを強く示唆する。またこの結果は、我々のこれまでの報告と完全に一致する。

(2) 齧歯類の RSC2 層には、小型の錐体細胞がパッチ状のクラスターを多数形成し、同一クラスター内の細胞の樹状突起は、1 層内でバンドルを形成する。しかし、これらの細胞の生理的特性は、今までほとんど知られていなかった。そこでラットの RSC を含む前額断、あるいは水平断の脳切片標本を作製し、2 層の錐体細胞に対して whole cell 記録法を適用して、発火パターンを記録した。また、パッチピペットから記録細胞に biocytin を注入し、実験終了後に固定・染色し、その形態も解析した。その結果、2-3 層の錐体細胞の 90% 以上が late-spiking と呼ばれる発火パターンを示す、遅延発火型ニューロン (late-spiking neuron, LS neuron) であることが判明した (図 4)。

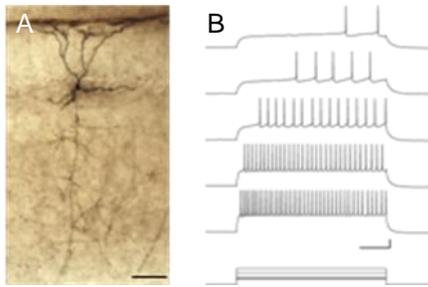


図 4 : A、biocytin により染色した RSC2 層の小型錐体細胞。 B、通電により A の錐体細胞に活動電位を生じさせたときの発火パターン。通電量が少ないときは、発火までに数秒の時間遅れが生ずる。

また、そのパターンを決定づけている K チャネルが、Kv1.1、Kv1.4、Kv4.3 であることを、Gene-chip 解析、in-situ hybridization、single cell RT-PCR、薬理的解析などにより明らかにした (雑誌論文 2)。

2012 年度

RSC の情報処理特性を調べるために、脳切片標本に電場電位の電流源密度解析法 (current source-density analysis, CSD analysis) を適用し、RSC 内の回路網解析を行った。

主に視床からの繊維投射を受ける、RSC1a 層の電気刺激に伴い誘発される電場電位を、皮質の深さ方向へ 50 μ m ごとに記録し、その空間的 2 次微分を計算することにより、興奮性シナプスの皮質内の位置が推定できる。それより、1a 層に入力された視床からの情報が、RSC 内にどのようなシナプス伝達を引き起こすかを知ることができ、視床からの入力

RSC 内でどのような時間・空間的順序で処理・統合されるかを推定できる。

CSD 解析により、RSC1a 層刺激は、まず 2-3 層の錐体細胞が 1 層内で形成する樹状突起バンドルに興奮を引き起こし、続いて 2-3 層から 5-6 層への興奮性シナプス伝達が生じることが明らかとなった。また海馬からは、主に 5 層へ興奮性入力があることも判明した。

2-3 層の LS 細胞群への入力信号は、その遅延発火特性により、時間遅延を受ける可能性が指摘されている。即ち、RSC においては、視床からの感覚入力が様々な時間遅延を受けた後に 5 層へと中継され、5 層の大型錐体細胞によって、海馬からの記憶情報と統合される可能性がある。これは、複数の事象の時間的な順序の記憶・想起に重要な役割を果たすと考えられる (図 5、雑誌論文 1)。

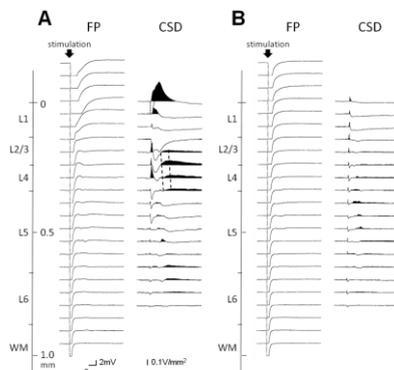


図 5 : 1a 層刺激により RSC 内に誘発される電場電位と、その CSD 解析結果。L1~L6 は皮質 1 層から 6 層を、WM は白質を示す。FP : 電場電位、CSD : 電流源密度。トレースの黒く塗りつぶされた部分が、皮質内の電流源の位置と大きさ、およびタイミングを表す。A、正常人工脳脊髄液中での解析結果。B、興奮性シナプス伝達遮断薬存在下での解析結果。A で顕著だった電流源がほぼ消失している。このことから、A の電流源が興奮性シナプス伝達由来であることがわかる。

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 2 件)

(1) Nixima K, Okanoya K, Kurotani T. Current source-density analysis of intracortical circuit in the granular retrosplenial cortex of rats: A possible role in stimulus time buffering. Neuroscience Research, in press, doi: 10.1016/j.neures.2013.02.008. [Epub ahead of print]

(2) Kurotani T, Miyashita T, Wintzer M, Konishi T, Sakai K, Ichinohe N, Rockland KS. Pyramidal neurons in the superficial layers of rat retrosplenial cortex exhibit a late-spiking firing property. *Brain Structure and Function*, 218(1):239-54, 2013. doi:10.1007/s00429-012-0398-1.

〔学会発表〕 (計 7 件)

(1) Nixima K, Kurotani T, Okanoya K. Analysis of the functional intracortical circuit in rat granular retrosplenial cortex. Program No. 148.13. 2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.

(2) Kurotani T, Nixima K, Yuki S, Okanoya K. Can granular retrosplenial cortex of rats encode temporal orders? Program No. 809.04. 2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.

(3) 黒谷 亨, 結城 笙子, 仁木 島健一, 岡ノ谷 一夫. 後脳梁膨大部皮質破壊はラットにおける恐怖痕跡条件付けを阻害する. 第 35 回日本神経科学大会, 2012 9.18-21, (名古屋)

(4) 仁木 島健一, 黒谷 亨, 岡ノ谷 一夫. ラット後脳梁膨大部皮質における神経回路網解析. 第 35 回日本神経科学大会, 2012 9.18-21, (名古屋)

(5) 黒谷 亨, 睡眠・覚醒状態に依存する脳の可塑性: スライス標本を用いた評価, 生理学研究所 第二回睡眠研究会, 2012 7.5-6 (名古屋) (研究会、招待講演).

(6) 黒谷 亨, 睡眠覚醒状態に依存した大脳皮質シナプス伝達の可塑的变化, 日本睡眠学会第 37 回定期学術集会, 2012 6.30 (横浜) (シンポジウム、招待講演)

(7) 黒谷 亨, 境和久, 一戸紀孝, 岡ノ谷 一夫, Kathleen S Rockland ラット後脳梁膨大部皮質 2 層の遅延発火性錐体細胞-形態学的解析-. 第 34 回日本神経科学大会 こころの脳科学, 2011 9.14-17, (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒谷 亨 (Kurotani Tohru)

東京大学・大学院総合文化研究科・民間等
共同研究員

研究者番号: 50195591