

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650208

研究課題名(和文)機能コネクトミクス基盤技術としてのトポロジー同定下シナプス伝達解析法の開発

研究課題名(英文)Functional connectomics analysis of synaptic transmission using optogenetics

研究代表者

加藤 総夫(Kato, Fusao)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：20169519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：遠く離れた脳構造間のニューロン結合関係の解析を可能にするコネクトミクスに光遺伝学を組み合わせ、投射線維の起始部位を同定した上でのシナプス伝達の機構・様式解析を可能にする「機能コネクトミクス」の確立を目的とした。部位限局的Channelrhodopsin-2 (ChR2) 導入により、脳スライスにおいて、遠く離れた脳部位からの投射線維の効率的活性化に成功した。従来とは異なる切断角のスライスでの特定線維の活性化、TTXと4-APを用いた単シナプス性投射の証明などに成功し、「機能コネクトミクス法」の有用性と実験操作・解釈上の留意点を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim was to develop a method applicable to slice-based analysis of synaptic transmission using optogenetics that can determine the origin of fibers being stimulated. Five to eight weeks after transfecting adeno-associated virus vectors for ChR2 expression into the lateral parabrachial nucleus (LPB) in the dorsal pons of rats, blue light pulses robustly triggered CNQX-sensitive EPSCs in the neurons in the capsular part of the central amygdala recorded in acute slices of distinct angles (coronal and horizontal). These light-evoked EPSCs (leEPSCs) were blocked by TTX but re-appeared by addition of 4-AP, suggesting monosynaptic innervation, and was followed by a large and long-lasting IPSC, indicative of the presence of polysynaptic feed-forward inhibition. This "functional connectomics" technique has advantages in identifying the synaptic properties of long-distance connections, which has been otherwise almost impossible in the conventional electrophysiology setups.

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：光脳科学 神経回路 神経回路 光遺伝学 脳 扁桃体 腕傍核 シナプス

1. 研究開始当初の背景

脳機能はニューロンとその間の結合であるシナプスを基本素子とした神経回路によって実現されている。ニューロンとシナプスは、それぞれ、活動電位とそれによって誘発される化学伝達物質放出によって情報を伝送するがその情報の「意味」は、ニューロンの始点と終点、すなわちどこからどこに情報を伝えているかという「神経トポロジー」にエンコードされている。したがって、脳機能の理解には、どの構造からどの構造に情報が伝えられているか、という"wiring"に関する情報が必須であり、それを網羅的に解明することを目指したコネクトミクスの試みが進められている。

しかし、Brainbow (Lichtman et al, Nat Rev Neurosci, 2008)などのコネクトーム可視化技術だけでは、シナプスにおいて情報が伝えられる機構やその様式、そして及ぼす影響の詳細を明らかにすることはできない。その接続が抑制性か興奮性か、伝達物質と受容体は何か？ 放出確率は高いか低いのか、シナプス後応答はどのくらいの興奮・抑制をシナプス後ニューロンにもたらすのか、そしてそれはどのような可塑性を示すのか、といった「接続様式」の機能情報はまったく得られない。コネクトミクスの次の段階として、これらのシナプス伝達に関する情報もあわせて記述する「機能コネクトーム」を目指す必要がある。

遠く離れた部位間の「神経トポロジー」に関する情報を得る現在ほぼ唯一の方法は、in vivo whole animal での神経活動である。しかしこの方法は、系への介入性に著しい障壁があり、シナプス伝達様式に関する実験的解析がほぼ不可能であるのみならず、脳・脊髄内結合の多様性ゆえに、記録された結合関係が本当に単シナプス性の経路の活性化に起因するのか、あるいは他シナプス性の経路によるのか、そして、記録細胞はどのような細胞なのか、など、系の生理学的特性を理解する基本的な情報を得ることができないという欠点がある。

一方、この 20 年間、シナプス伝達の機能解析において、特定のニューロンのシナプス伝達の高精度な解析と実験的操作を可能にする脳スライス標本を用いた成果が積み上げられてきた。シナプス伝達とその可塑的変化や局所ネットワークでの情報処理などの「脳機能の素過程」ともいべき機能の解析において、脳スライス標本がもたらしたものははかり知れない。だが、脳スライス標本での電気生理学的解析には、そのシナプスがどの構造からどの構造に情報を伝えているのか、という、遠く離れた部位間の「神経トポロジー」に関する情報が得られないという限界がある。数 100 μm 厚内の、切断面にほぼ平行に走行する線維束上に刺激電極を置いて周囲の細胞体や通過線維の刺激の影響を

とりあえず無視しつつ電極周囲の電流分布の特性に基づいて活動電位を発生させることだけが唯一の経路活性化法であり、この方法では、wiring に関する情報が得られないのはもちろんのこと、活性化しているのが本当に標的とする投射路(だけ)なのか明らかにすることができない。大部分の脳構造では、脳スライスの中で特定の脳構造由来の線維のみを刺激するということがそのものが不可能である。本研究はこれらの欠点を克服する方法論を開発確立することを目指して立案された。

2. 研究の目的

脳の構造間の形態学的接続を網羅的に記述しようとする「コネクトミクス」に欠けている「機能」情報を付加した「機能コネクトミクス」の基盤技術開発を目指した。投射元へのチャンネルロドプシン導入と投射先への逆行性トレーサー注入、およびスライス標本での光活性化と電気生理学記録を組み合わせ、シナプス伝達特性と「神経トポロジー」(どの構造からどの構造に情報を伝えているか)の同時解析を可能にする「トポロジー同定下シナプス伝達解析法」を開発・確立することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 外側腕傍核 (lateral parabrachial nucleus, LPB) へのチャンネルロドプシン 2 (ChR2) 発現ベクターの導入

Wistar 系雄性ラット(4週齢)を isoflurane 5% 吸入麻酔下、脳定位固定装置に固定し、LPB (bregma から尾側へ 6.6 mm、外側へ 2.2 mm、腹側へ 7.4-7.2 mm) までハミルトンシリンジ (30 G 針、gastight 10 μl) を吻側から尾側に 15° の角度で刺入した。マイクロシリンジポンプを用いて両側 LPB に、AAV2/5.Synap.hChR2(H134R)-EYFP.WPRE.hGH を 0.75-1 μl 、75 nl/min の速さで注入し、注入後切開創を縫合した。

2) 脳スライス作製

扁桃体(シナプス伝達記録): AAV ベクター注入 5-7 週後、扁桃体を含む急性スライスを作製した。Isoflurane (5%) 深麻酔下に氷冷スライス作製用人工脳脊髄液で経心灌流した後、扁桃体および脳幹を含む脳ブロックを摘出した。脳幹脳ブロックは 4% paraformaldehyde (PFA) 溶液で保存した(注入部位確認用)。扁桃体脳ブロックを 5% agar ガイドブロック内で 1.6% 低融点 agarose で包埋したのち、厚さ 300 μm の冠状断もしくは水平断切片を作製した。32-34 15 分間 incubation 後、灌流用人工脳脊髄液で維持した。

橋腕傍核(光応答記録): AAV ベクター導入 2

週後に LPB を含む急性スライスを作製した。Isoflurane (5%) 深麻酔下で、氷冷したスライス作製用人工脳脊髄液を経心灌流し脳ブロックを摘出した。スライスは扁桃体と同様の方法で作製した。

3) 電気生理記録

ビデオ顕微鏡観察下に扁桃体中心核外包部 (capsular part of the central amygdala, CeC) または LPB を同定し、ホールセルパッチクランプ法で膜電流または膜電位を記録した。細胞内液として、興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current, EPSC) の記録には K-gluconate ベースの人工細胞内液 (120 K-gluconate, 6 NaCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 12 Na₂ phosphocreatine, 2 ATP Mg, 0.5 GTP Na, 5 EGTA, 10 HEPES hemisodium (in mM); pH 7.2; osmolarity, 290-300 mOsm/kg) を、抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current, IPSC) の記録には Cs-gluconate ベースの人工細胞内液 (120 Cs-gluconate, 6 NaCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 12 Na₂ phosphocreatine, 2 ATP Mg, 0.5 GTP Na, 5 EGTA, 10 HEPES hemisodium (in mM); pH 7.2; osmolarity, 290-300 mOsm/kg) を用いた。EPSC は -60 mV、IPSC は +15 mV 膜電位固定化に記録した。EPSC 記録は picrotoxin (100 μM) 存在下に行った。LED 光源 (465 nm; 8.4-12.7 mW(mm)⁻²; duration, 5 ms; LEX2B, Brainvision) を用いて、光刺激によって誘発される興奮性シナプス後電流 (light-evoked EPSC, leEPSC) 及び抑制性シナプス後電流 (light-evoked IPSC, leIPSC) を記録した。

4) 蛍光観察

PFA 固定脳ブロックから LPB を含む厚さ 100 μm の冠状断切片を作製し蛍光顕微鏡 (BX63, Olympus) または共焦点レーザー顕微鏡 (FV300, Olympus) で発現 YFP の蛍光を観察した。また、電気生理記録終了後、扁桃体を含むスライスを 4%PFA 溶液中で保存し、後日観察した。

4. 研究成果

光遺伝学を基盤とした機能コネクティクスの確立を目的として研究を進めた。驚くべきことに、今から3年前に立案計画したこの技術はもはや、いささかも「萌芽的」でも「挑戦的」でもなくなり、本研究計画が当初目指した通り、電気生理学の重要かつ常套的手法となった。特に、当初の計画であった電気穿孔法ではなく、2年目に変更したアデノ随伴ウイルス (AAV) 法による ChR2 遺伝子導入は、平成 25 年に AAV が日本でもクラス 1 で扱えるように指針が改定されたことに伴い、取り扱いが大いに簡略化され、その後の研究進捗を著しく速めた。その結果、光遺伝学を用いた「遠く離れた脳領域の機能的結合を解明す

る」ための方法論的基盤が確立された。本研究で明らかにされたことは主に以下の6つである。

- (1) 軸索終末における十分な発現を得るためには、ChR2 発現に用いる AAV 血清型・プロモーターの最適化が極めて重要である。
- (2) 遠く離れた部位の神経軸索終末への十分な発現には数週間が必要である。
- (3) ChR2 活性化による放出の確率は、電気刺激によるそれと大きく異なる (高放出確率) ため、シナプス前機構の変化によるシナプス可塑性の解析の結果の解釈は慎重にすべきである。
- (4) 単シナプス性の投射の証明には、TTX によるシナプス後電流消失に加え、さらに 4-AP を加えて終末脱分極を生じさせた際に生じる非同期的放出の誘導も必要である (図 1)。

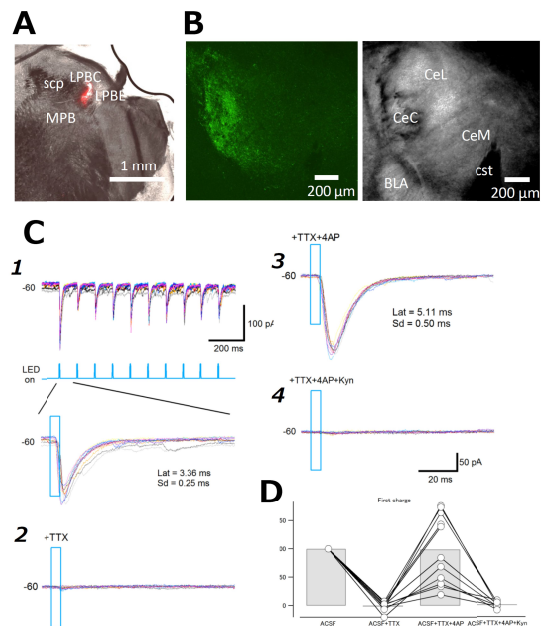


図 1. ChR2 の光活性化によるシナプス伝達誘発
A. ベクター注入 4 日後の扁桃核における DAPI 標識。
B. ベクター注入 7 週後の扁桃体中心核における YFP 発現 (左) と透過像 (右)。
C. 1. CeC ニューロンからの膜電流記録。ChR2 の光活性化 (5 ms, 10 Hz) により EPSC が誘発。2. 光誘発 EPSC は、tetrodotoxin (TTX, 1 μM) で消失した。3. TTX で消失した光誘発 EPSC は、4-aminopyridine (4AP; 100 μM) によって再び出現した。4. この光刺激 EPSC は、キヌレン酸 (Kyn; 3 mM) で完全に消失した。
D. 光誘発 EPSC の総移動電荷に及ぼす薬物の影響のため (n = 11)。

(5) 局所回路近傍に刺激電極を置く電気刺激法と異なり、機能コネクティクス法における投射線維の光刺激は、極めて大きな feed-forward inhibition を生じさせる。この発見は、単純な単シナプス性興奮性伝達機構の分析に基づいて構築されてきた現在の神経生理学的知見の解釈に大幅な再検討が必要であることを示すものである。

(6) 従来の手法では、脳スライスの切断面と神経束の位置関係に依存して特定の求心路上に刺激電極を設置することができない場合が少なからずあった。このような場合においても、本方法では特定の神経核由来の線

維のみを任意のスライスで活性化することが可能である。従来、水平断スライスでは不可能であった腕傍核 - 扁桃体中心核線維の選択的刺激が可能となり、吻尾側の位置によって EPSC の特性が均一ではない事実が示唆された。

以上、本研究によって、「機能コネクトミクス法」が確立され、神経生理学研究に応用可能となるとともに、この手法によって得られた結果の解釈において注意すべきポイントが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM and Kato F, Optogenetic activation of parabrachio-amygdaloid pathway, Neural Circuits underlying Nociception and Pain and their Plasticity, 2013 年 10 月 8 日, Heidelberg, Germany.

2) Kato F, Synaptic potentiation in the central amygdala of painful diabetic neuropathy model, Gordon Scientific Conference: Amygdala in Health & Disease, 2013 年 7 月 23 日, Easton, MA, USA.

3) 加藤総夫, 侵害受容情報と痛み情動記憶を結ぶ腕傍核, 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 17 日, 鹿児島.

4) 加藤総夫, 池田 亮, 篠原 恵, 奥津裕也, 高橋由香里, 丸毛啓史, 脳はどのように痛みの慢性化を知るのか?, 第 6 回日本運動器疼痛学会(招待講演), 2013 年 12 月 8 日, 神戸.

5) Kato F, The 8th International Conference for Neurons and Brain Diseases, 2013 年 7 月 4 日, The central amygdala - where pain meets fear, Singapore.

6) 杉村弥恵, 高橋由香里, 渡部文子, 加藤総夫, 侵害受容扁桃体における腕傍核 扁桃体路の光活性化, 第 91 回日本生理学会大会, 2013 年 3 月 16 日, 鹿児島.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 総夫 (KATO, Fusao)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20169519

(2) 連携研究者

渡部 文子 (WATABE, M. Ayako)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00334277

(3) 研究協力者

高橋 由香里 (TAKAHASHI, Yukari)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20613764

杉村 弥恵 (SUGIMURA, Yae)
東京慈恵会医科大学・大学院
日本学術振興会特別研究員