

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430002

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の生成機序

研究課題名(英文) Induction mechanisms of sustained neural activity in the neural integrator of the vertical eye movement system

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：視線の保持には水平系は舌下神経前位核(PHN)と垂直系はカール間質核(INC)が関与している。本研究では、INCとPHNの神経回路特性を比較することを目的とした。ニューロンの近傍に高頻度刺激を与えると、INCとPHNのニューロンはともに興奮性シナプス後電流(EPSC)の発生頻度の上昇がみられ、その持続時間に有意な差がなかった。一方で、カルシウム透過型AMPA受容体(CP-AMPA)の拮抗薬投与により減少した持続時間は、PHNに比べINCでは少なかった。以上の結果から、INCとPHNには、持続的なEPSCの発生に必要な局所興奮性神経回路が存在するが、その活性化機構は異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gaze holding is controlled primarily by neural structures including the prepositus hypoglossi nucleus (PHN) for the horizontal gaze and the interstitial nucleus of Cajal (INC) for the vertical gaze. In this study, to verify whether the neural structure of the INC is similar to that of the PHN, we compared the network properties between the INC and PHN. The application of burst stimulation induced an increase in the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic current (EPSCs). The duration of the increased EPSC frequency of INC neurons was not significantly different from that of PHN neurons. The percent of duration reduction induced by a Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors (CP-AMPA) antagonist was significantly smaller in the INC than in the PHN. These results suggest that the local excitatory networks that activated the sustained EPSCs are present both in the INC and PHN, but their activation mechanisms including the contribution of CP-AMPA are different between them.

研究分野：神経生理学

キーワード：視線制御 局所興奮性神経回路 カルシウム透過型AMPA受容体 シナプス後電流 高頻度刺激 パッチ  
クランプ法 スライス標本

## 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。眼球を視覚対象へ向けて視線を保持するために、外眼筋を支配する運動ニューロンは眼球を動かすためのバースト発火に加え、眼球位置に比例した持続的な発火を示す。一方で、眼球運動の発現に関与するプレモーターニューロンは、眼球速度に比例したバースト発火のみを示す。従って、プレモーターニューロンから外眼筋運動ニューロンへ信号が伝えられる間に速度信号が位置信号へ変換されており、速度 - 位置変換は数学的な時間積分に相当するため、この機構は神経積分器と呼ばれている。

眼球運動の生成に関わる信号は、上丘や前庭神経核などを経て、水平成分と垂直成分それぞれが別々の脳幹領域（傍正中橋網様体と内側縦束側間質核）に送られ処理される。それと同様に神経積分器に関わる領域も水平系と垂直系で異なっており、舌下神経前位核（Prepositus Hypoglossi Nucleus, 以下 PHN と略す）とカハール間質核（Interstitial Nucleus of Cajal, 以下 INC と略す）がそれぞれの主な領域であることが示されている。水平系の神経積分器である 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研究が行われてきた。我々も PHN ニューロンの特徴を明らかにするとともに (Shino et al. 2008; Saito et al. 2012; Saito and Yanagawa, 2013)、PHN 内の神経回路特性について、カルシウム透過型 AMPA (CP-AMPA) 受容体の活性化を起点とした興奮性神経回路の活性化が神経積分器の機能に重要であることを明らかにした (Saito and Yanagawa, 2010)。このように、PHN においては *in vitro* の研究をもとに、ニューロン、シナプスレベルの知見が蓄積されている。一方で、垂直系の神経積分器である INC では、*in vivo* 研究はあるものの、ニューロン特性や神経回路構築についてはこれまで全く研究が行われていない。PHN での知見をそのまま INC へ適用できるのであれば問題はないが、脳幹ニューロンから外眼筋の運動ニューロンへ至る神経伝達は水平系に比べると垂直系の方が複雑であり、さらに垂直眼球運動に関わる神経回路については未解明な点もあるために、その適用が疑問視されてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、INC のニューロン特性や神経回路特性を調べ、(1) 我々のこれまでの研究で明らかになった CP-AMPA 受容体の活性化に基づく興奮性神経回路の活性化が、PHN のみならず INC においても見られるのかを明らかにし、(2) INC と PHN との間をつなぐニュー

ロンの同定し、それらの相互作用について明らかにすることを目的とした。これにより、水平系と垂直系の神経積分器の機能的な神経回路構成の違いや相互作用様式を明確にし、神経積分器のメカニズムに迫ることを目指す。

## 3. 研究の方法

実験には Wild-type の Wistar ラットまたは Long-Evans ラットを使用した。生後約 3 週齢のラットを十分な麻酔下において、断頭により脳を取り出し、INC を含む厚さ 400 $\mu$ m の前額断スライス標本を作製した。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、EPSC の頻度が刺激後数秒間にわたって増加するのかを調べる。さらに、CP-AMPA 受容体の選択的阻害薬である 1-naphthyl acetyl spermine (NAS) の投与によって EPSC 頻度に変化が見られるのかを調べる。以上の結果を、PHN から得られた結果と比較検討する。

## 4. 研究成果

細胞外液に GABA<sub>A</sub> 受容体の拮抗薬であるピクトキシン (100  $\mu$ M) とグリシン受容体の拮抗薬であるストリキニン (20  $\mu$ M) を投与し、抑制性シナプス伝達をブロックした状態で、記録した INC ニューロンの近傍にバースト刺激を与えると、図 1 のように刺激前に比べて刺激後には自発性 EPSC の頻度が上昇した。

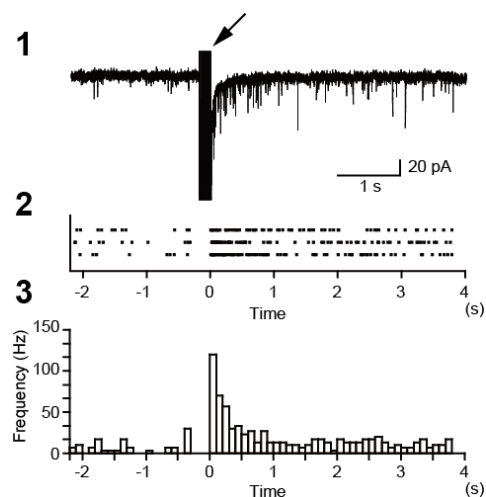
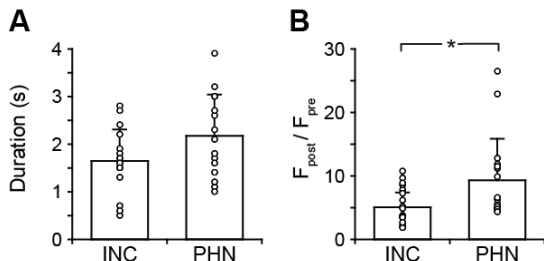


図 1. INC ニューロンで観察されたバースト刺激によって生じる自発性 EPSC の頻度増加

自発性 EPSC のラスター表示 (図 1-2) やヒストグラム (図 1-3) の解析から、このニューロンでは EPSC の頻度上昇は 1.9 秒続くこ

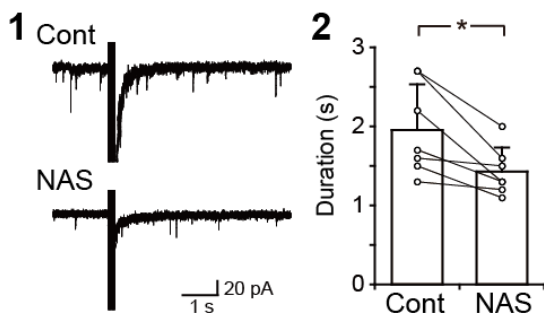
とが分かった。トータル 17 個の INC ニューロンから EPSC 頻度上昇の持続時間を調べたところ、 $1.6 \pm 0.7$  秒であった。この値は同じ数の PHN ニューロンから得られた値( $2.2 \pm 0.9$  秒)と比べると有意な差は見られなかった ( $p = 0.125$ ) (図 2A)。



**図 2 . EPSC 頻度上昇の持続時間 (A) と刺激前後の EPSC 頻度の比 (B) について INC と PHN の比較**

この実験において、刺激後 1 秒間の EPSC の頻度が INC ニューロンでさほど上昇しないことに気が付いた。刺激前の EPSC 頻度は INC ニューロン ( $5.8 \pm 3.6$  event/s) と PHN ニューロン ( $4.2 \pm 2.0$  event/s) で有意な違いがみられなかったが、刺激後の EPSC 頻度を刺激前の頻度で標準化した値を比較したところ、INC ニューロン ( $5.0 \pm 2.4$ ) は PHN ニューロン ( $9.3 \pm 6.5$ ) より有意に低かった ( $p = 0.016$ )。

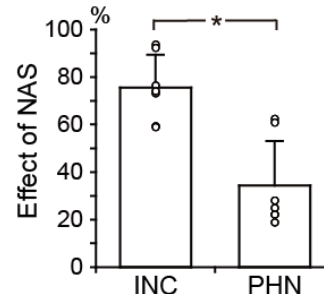
次に、INC で観察されたバースト刺激後の自発性 EPSC の頻度上昇が CP-AMPA 受容体の活性化によるものかを検討するため、NAS の投与による頻度上昇の変化を調べた。その結果、NAS の投与によって EPSC 頻度上昇の減少がみられた (図 3-1)。7 個の INC ニューロンで調べた結果、頻度上昇の持続時間は、コントロールでは  $2.0 \pm 0.2$  秒であったが INC 投与により  $1.4 \pm 0.1$  秒となり有意に減少した ( $p = 0.011$ )。



**図 3 . EPSC の頻度上昇に対する NAS の効果**

従って、INC ニューロンで観察されたバースト刺激後の EPSC 頻度上昇は PHN ニューロンと同様に CP-AMPA 受容体の活性化が必要であることが示唆された。

しかし、NAS によって減少した持続時間のパーセントを INC と PHN のニューロン間で比較したところ、PHN では  $75.5 \pm 13.9\%$  も減少したのに対し、INC では  $34.3 \pm 19.0\%$  であった (図 4)。INC の減少の割合は PHN の割合に比べ有意に低かった ( $p = 0.0087$ )。このことから、EPSC の頻度上昇における CP-AMPA 受容体の関与は PHN に比べ INC では低いことが示唆された。



**図 4 . EPSC 持続時間の NAS による減少の割合について INC と PHN の比較**

以上の結果と、これまでのニューロン特性の解析の結果を合わせると、INC と PHN では同じ神経素子からなるがその分布が異なっており、INC と PHN にはともに局所興奮性回路が存在するが、その活性化機構に違いがあることが示唆された。

#### 結語

今回の研究において INC における興奮性神経回路の活性化機構が PHN と異なる可能性を初めて明らかにしたことにより、研究目的の (1) は達成された。神経積分器の活性化機構は水平系と垂直系で異なっている可能性が示唆されたことは、今後の神経積分器のメカニズム解明に大きく貢献するものと考えられる。しかし、研究目的 (2) について、PHN や INC へのトレーサの注入実験を行ったが、目的の脳領域に限局して注入することが困難で、スライス標本でニューロンを同定できるだけの十分な実験手技の確立に至らなかった。このことは今後の研究でさらに創意工夫を凝らして、目標を達成できるよう努力を続けたい。

#### 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)

Saito Y\*, Zhang Y, and Yanagawa Y. Electrophysiological and morphological properties of neurons in the prepositus hypoglossi nucleus that express both ChAT and VGAT in a double-transgenic rat model. European Journal of Neuroscience 41:

1036-1048, 2015. 査読有

Zhang Y, Yanagawa Y, and **Saito Y\***. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in medial vestibular and prepositus hypoglossi nuclei neurons showing distinct neurotransmitter phenotypes. *Journal of Neurophysiology* 115: 2649-2657, 2016. 査読有

**Saito Y\*** and Yanagawa Y. Distinct response properties of rat prepositus hypoglossi nucleus neurons classified on the basis of firing patterns. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.03.003>, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

Zhang Y, Yanagawa Y, and **Saito Y** (2014) Distinct expression patterns of nicotinic receptor subtypes in neurons exhibiting distinct neurotransmitter phenotypes in the medial vestibular and prepositus hypoglossi nuclei. 第37回日本神経科学大会 2014年9月11日、横浜

**Saito Y** and Yanagawa Y (2015) Different firing response properties of the rat prepositus hypoglossi nucleus neurons that exhibit distinct firing patterns. 第38回日本神経科学大会 2015年7月28日、神戸

Sugioka M and **Saito Y** (2016) Purinergic modulation of neuronal activity in the prepositus hypoglossi nucleus. 第93回日本生理学会大会 2016年3月22日、札幌

Sugioka M and **Saito Y** (2016) Modulation of neuronal activity via ATP in rat prepositus hypoglossi nucleus. 第39回日本神経科学大会 2016年7月20日、横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~1phy/>

## 6. 研究組織

### (1) 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