

平成 30 年 9 月 14 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00413

研究課題名(和文)興奮/抑制(E/I)バランス変調モデルから解析する神経回路振動演算

研究課題名(英文)Oscillatory neural circuit calculation with excitation / suppression (E / I) balance modulation model in hippocampus

研究代表者

富永 貴志 (Tominaga, Takashi)

徳島文理大学・神経科学研究所・教授

研究者番号：20344046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はE/I バランスの異常がどのように神経回路情報処理異常を起こしているかを明らかにすることを目的としている。海馬CA1野での - 周期の引き起こす短期可塑性にE/Iの精緻な活性化制御が関与することを示し、初年度に論文として発表した。バルプロ酸投与モデルでのさらなる検証を進めていたが、この - 周期に関する短期可塑性現象に関しては顕著な差を見出すことができなかった。そこで、この現象から引き起こされる可塑的变化の抽出に焦点を絞って研究を進めた。E/Iバランス失調の関連について基礎的なデータを収集できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify how abnormality of E / I balance causes neuronal circuit information processing abnormality with voltage-sensitive dye (VSD) imaging. The precise activation control of E / I was involved in the short-term plasticity caused by the - cycle in the hippocampal CA 1 field. The observation was published as a paper in the first year. We have been proceeding with further verification in valproic acid administration model but no significant difference could be found with regard to this short term plasticity phenomenon with respect to this - cycle. Therefore, we focused on extraction of plastic change caused by this phenomenon and carried out research. I believe that basic data on the relationship of E / I balance disorder have been accumulated.

研究分野：神経科学

キーワード：E/Iバランス 海馬 シータ周期 ガンマ周期 膜電位感受性色素 バルプロ酸

1. 研究開始当初の背景

脳神経回路のシナプスで樹状突起内でも動的な興奮/抑制バランス(E/Iバランス)の制御が行われること(Liu, Nat Neurosci, 2004; Turrigiano, Nelson, Curr Opin Neurobiol, 2000), また局所神経回路で E/I バランスを崩すことによって精神疾患様の行動異常が起こること(Yizhar et al., Nature, 2011)が, 2000年頃から明らかになってきている。すなわち, 神経回路の機能が適切な E/I バランスの維持に依存していることは明らかである。その一方, E/I バランスがどのように局所神経回路の機能を保証しているのかは明確でない。

申請者は厚生労働科学研究費の研究班(H18-H25)において, 妊娠期バルプロ酸投与マウス, 妊娠期ビスフェノール A 暴露マウスで光計測法を用いて海馬神経回路動作を検証し, E/I バランスの変調に起因すると思われる神経回路異常を示す知見を得ている(毒性学会, 2011; 日本神経科学会 2013, 2014; 北米神経科学会 2013, 2014; 一部は submitted)。これらのマウスは行動実験においても異常を示すことがわかっているが, 神経回路動作の異常がどのように行動実験での異常を引き起こすのかは不明である。本研究では, このマウスを用いて E/I バランスの変調が引き起こす病態の神経回路機構を解明する。

脳の情報処理には, 多くの神経の同期的集合的な振動的活動が重要な意味をもっている(Averbeck, Nat Rev Neurosci, 2006; Usrey, Annu Rev Physiol., 1999)。脳の振動的活動は様々な機能的役割を果たしているが, 最も代表的なものは海馬の場所細胞と活動の例だろう(O'Keefe, Hippocampus, 1993)。活動は活動と密接な関連がある(Lisman, Neuron, 2013等)。申請者は, 抑制性入力の高頻度入力(周期)の結果, 抑制性の細胞が長い時間単位で興奮性細胞を一斉に制御し(J Neurophysiol, 2002; Pflugers, 2010), 低周期(周期)の振動的活動を形成することを見出している(in preparation)。そこで, E/I バランスの崩れにより, 影響を受けるのはこの同期的で集合的な振動活動だと考えた。

E/I の相互作用に基づく振動的な神経活動が脳の神経回路のどこで, どのように起こって協調しているかを計測するためには, 回路の動作を多くの点で同時に計測するつまり, 神経回路の活動動態を「見る」技術が必要である。申請者は, このような視点で 2013 年度 Neuro2013 (日本神経科学学会, 日本神経化学学会, 日本神経回路学会, 京都国際会館 6月)において「見て調べる神経回路機能のダイナミクス: 再編成と変調」と題した企画シンポジウムをオーガナイズし, 異なる技術を持つ専門家を集め, 計測上の課題について検討した。その結果, 計測には少なくとも以下の3点のことが出来る必要があることが確認された。

多点同時記録ができ, 複数の細胞から記録が導出し, 同期的活動を計測できること。

記録する細胞の集団の大きさが, 機能的な局所神経回路を網羅できること。同期に必要な閾値下の膜電位応答を記録できること。

2. 研究の目的

本研究では, シンポジウムで確認された課題をふまえ, 本研究申請者らが新規開発した超高速共焦点光学系(J Neurophysiol., 2013)の他, 海馬や嗅内野に関して開発してきた膜電位光計測法(J Neurosci Methods, 2000; Science, 2011; Pflugers, 2010; Neurosci Res, 2009; Science, 1996)の手法を使い, 神経回路機能の異常を閾値下の信号まで含めて「見る」実験系を構築する。

自閉症スペクトラムなどを含む発達障害や, 統合失調症などの特に発達に密接に関係する精神疾患では, 脳の領野間の機能連携の異常が起こっていることが示され, E/I バランスの不全が主な原因と考えられている(e.g. Persico, TINS, 2006; Uhlaas, Neuron, 2012)。本研究で E/I バランスと振動的活動の変調が示されたら, それが精神疾患で示されているような領野間の活動協調に影響を与えるかどうかを検討する必要がある。これにはスライス標本でより広範囲の神経活動を調べるとともに, in vivo 標本でのより自然な状態での皮質活動について検討する必要がある。本研究で用いる薬物投与誘導による病態マウスは遺伝的背景が正常でも異常な神経回路特性を持つ病態モデル動物の一種である。これは, 他の遺伝子改変と組み合わせることが容易である。この利点を活かして, オプトジェネティック技術を導入することにより, in vivo の状態の皮質領野間の機能協調と E/I バランスの変調の関連を調べることが出来る。

3. 研究の方法

[平成 27 年度] 膜電位感受性色素可視化による病態マウスの海馬における E/I バランスの変調と - 周期の神経活動の関連探索(~)

発生発達期の特定の時期, これまでの研究では妊娠中の特定の時期(E12, E13)にバルプロ酸を投与することで成長した仔に行動異常の見られるマウスが得られている。このプロトコルはエピジェネティックな観点から設定されたものなので他の自閉症モデルと条件を比べつつ最もよいプロトコルを確立する。その際, 海馬スライス標本においてトリシナプティック回路を構成する入力経路であるシャーファー側枝, 苔状線維, 貫通線維への刺激に対する膜電位応答において差が見られていたので, これを指標に病態導入プロトコルを設定する。また, ビスフェノール投与についても検討する(連携研究者:種村健太郎と冨永)。

この差は, 通常の ACSF 中での応答と GABA-A 受容体阻害薬を加えた時を比べ発見したものであった。この差の詳細な検討は出来ていないが, 病態モデル動物での GABA-A 受

容体の減弱を示唆すると考えている。パッチクランプ法等の電気生理学的手法で検証する。また、単一細胞での膜電位感受性色素による可視解析を行い、樹状突起のレベルで E/I バランスの変調と膜電気応答の関連を解析する。この際には、申請者が開発した (J Neurophysiol., 2013) 細胞内還流法と超高速共焦点光学系を利用する。(富永)

海馬において特別な意味を持つ 周期 (5Hz) の神経活動には、より高周波の 周期 (100Hz) の神経興奮が関与しており、GABA-A 受容体の特別な活性化が関与している可能性を申請者は見出している (J Neurophysiol, 2002; Pflugers 2010)。このような振動的神経活動に対する E/I バランス変調の効果を同じ病態モデルマウスを使って検討する。(富永)

また、これらの課題と平行して要素技術 ~ の開発に着手する。超広視野の膜電位計測計に関しては、申請者が開発して現在利用している膜電位計測用高開口数顕微鏡 (特許 1999; J Neurosci Method, 2000) を改良して、LED 照明と標本上の広視野ウインドウの新規開発により、より広視野でも均質で高輝度の照明と安定した計測が可能実験系を確立する。また、これと適合する共焦点光学系を開発する。一方、海外研究協力者の Knopfel 教授 (Imperial College London) から膜電位感受性蛋白質を発現するノックイン動物 (論文投稿済) の提供を受け、これを利用した膜電位計測系を立ち上げる (連携研究者: 武藤弘樹と富永)。この基礎技術はすでに子宮内遺伝子導入によって発現させた蛋白について共同研究を進めている。要素技術 に関しては、この遺伝子導入動物での計測を念頭に置いたものだが、要素技術 を適用できるような実験系を構築する。

[平成 28 年度] 海馬傍回や他の領野での振動的神経活動と E/I バランス変調の関連の探索(,)

海馬への信号を送っているのは嗅内野である。海馬にとっての振動的活動の少なくとも一部はこの領域からの入力を受けている。嗅内野と海馬の反響回路については申請者が既に光計測で報告している (Science, 1996) が、この過程で嗅内野の特定周期での活性化が海馬-嗅内野回路の活性化に重要であることを発見した (unpublished)。この嗅内野-海馬での振動的神経活動について E/I バランスに変調を持つ病態マウスでも検討し、単離脳標本を用いた解析も含め、その回路機構を解明する。また、この嗅内野と嗅周囲皮質の活動解析によって、特定の部位が振動子となって振動活動を起こすことを本研究の研究分担者と申請者は見出している (梶原と富永, 北米神経科学会 2012)。この振動的活動と E/I バランスとの関連を探索する。さらに扁桃体との関連についても解析を進める。この解析には要素技術 が用いられる。(梶原と富永)

4. 研究成果

本研究は E/I バランスの異常がどのように神経回路情報処理異常を起こしているかを明らかにすることを目的としている。我々はすでに抑制性信号の高頻度入力 (周期) が低周期 (周期) の振動的神経活動に重要なことを見出しており、これが、E/I バランス失調の主要な神経回路機構であると考えた。これ正しければ E/I バランスが振動制御と領野間の協同を乱すことで脳発生発達に関連する精神疾患の病態を引き起こすと説明することができ、脳情報処理機構の解明、病態解明に結びつく。海馬 CA1 野での - 周期の引き起こす短期可塑性に E/I の精緻な活性化制御が関与することを示し、初年度に論文として発表した。E/I 失調を主な原因とする病態モデルとしてバルプロ酸投与モデルでのさらなる検証を進めていたが、この - 周期に関する短期可塑性現象に関しては

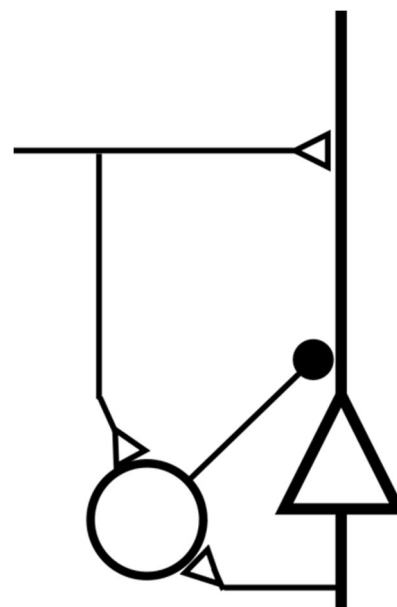
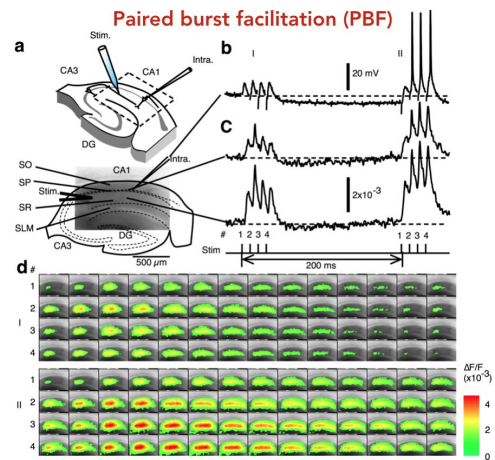


図 1 - 振動的活動が起こす可塑性の例と、その回路モデル

顕著な差を見出すことができなかつた。そこで、この現象から引き起こされる可塑的变化の抽出に焦点を絞って研究を進めた。一方、

他の脳領域での E/I バランスの検討のため、新たに広視野の計測系を構築した。これを使って、海馬と関連する嗅内野 (EC)、嗅周囲皮

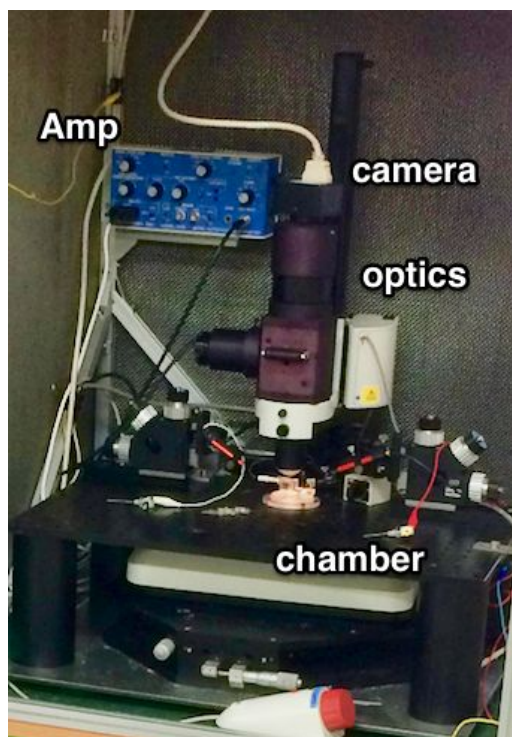


図2 自動化した実験装置の例 最も簡単な構成で、VSD による光計測とアンプ (amp) による電気生理学的計測が自動で行えるようにセットしてある。最小設置面積は 70 x 70 cm で狭い空間にもたくさん設置可能である

質(PC)での E/I バランスの失調と神経興奮伝播パターンの変化を調べた。また、前帯状皮質 (ACC) の興奮伝播パターンも調べることができた。これらはまだバルプロ酸投与モデルでの実際の病態を説明できるだけの知見を集めきれていないが、それぞれ興奮伝播パターンと E/I バランス失調の関連について基礎的なデータを収集できたと考えている。どちらも投稿準備中である。これらの基礎的なデータからの、バルプロ酸モデルでのズレを計測できるようになれば病態の解明に結びつく。また、E/I バランスの脳内での重要性が明らかになる。また、この過程で計測系の自動化を実現し、スループット性が高い実験系 (例図2) を実現できた。今後様々な研究に応用可能である。

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. Yoshimura, H.*, Sugai, T., Kato, N., Tominaga, T., Tominaga, Y., Hasegawa, T., Yao, C., and Akamatsu, T. (2016). Interplay between non-NMDA and NMDA receptor activation during oscillatory wave propagation: Analyses of caffeine-induced oscillations in the visual cortex of rats. *Neural Networks*. 79:141-149 (2016) DOI: 10.1016/j.neunet.2016.03.012
2. Tominaga T* and Tominaga Y (2016). Paired burst stimulation causes GABAA receptor-dependent spike firing facilitation in CA1 of rat hippocampal slices. *Front. Cell. Neurosci.* 10:9. doi: 10.3389/fncel.2016.00009

〔学会発表〕(計 30 件)

1. Tominaga T and Tominaga Y. Voltage-sensitive dye imaging study of the input-dependent GABAergic control of the paired burst facilitation (PBF) in area CA1 of the hippocampus 471.13/G4 Neuroscience Meeting Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2017
2. WAKAYAMA Y, KAMADA S, YAMADA Y, TOMINAGA T, KAJIWARA R Voltage-sensitive dye signal analysis of inhibitory components in mouse perirhinal-entorhinal cortical slices 378.05/H4 Neuroscience Meeting Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2017
3. Tominaga T and Tominaga Y. Activation of GABAA-receptors by high-frequency stimuli causes paired burst facilitations in area CA1 of the hippocampal slice 504.19 / L2 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016
4. M. Koike-Tani, S. Mehta, T. Tominaga, R. Oldenbourg, T. Tani Imaging of polarized light signal changes associated with neuronal activity in mouse hippocampus 300.03 / E7 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016
5. R. Kajiwara, Y. Wakayama, Y. Tominaga, T. Tominaga Network plasticity facilitating the neural excitation propagation between the perirhinal and entorhinal cortices as revealed by voltage-sensitive dye imaging 302.14 / F15 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016
6. T. Luyben, J. Borovac, M. Valencia, M. Khan, T. Tominaga, K. Okamoto Rapid postsynaptic cAMP signaling regulates structural and functional potentiation underlying learning and memory 505.07 / L10 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, Society for Neuroscience, 2016
7. Tominaga T and Tominaga Y A spatio-temporal analysis of the GABAa receptor-dependent and independent membrane potential response to a gamma-band burst stimulus in area CA1 of hippocampal slice: A VSDI study 758.05/B4 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, Society for Neuroscience, 2015
8. 平島 寛司、富永 貴志、富永 洋子、岳 鳳鳴、滝澤 佐季子、横山 忠幸、松本 健、友常 大八郎、佐々木 克典 「膜電位感受性色素(VSD)を用いた光計測技術によるリプログラミングがん細胞膜電位計測法」第17回日本再生医療学会総会 2018.3.21 口頭発表 パシフィコ横浜

9. 富永貴志 「イントロダクション」ワークショップ「個性」創発神経基盤の統合的理解に向けた階層横断的解析(オーガナイザー富永貴志, 郷康広) 2017.12.06 生命科学系合同年次大会 ConBio2017 神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場
10. 富永貴志 「膜電位イメージングの技術支援: 実施例から」新学術領域「個性」創発脳の第2回若手の会・技術講習会 2017.11.21 京都大学楽友会館 2F 会議・講演室 (招待講演)
11. 河野 睦, 世戸 彩華, 石田 正樹, 富永 貴志, 堀 学 ゾウリムシの逃走反応におけるストマチン様タンパク質の役割, 2017/11/18, 第50回日本原生生物学会大会と第1回日本共生生物学会大会 つくば
12. 富永貴志 「ゾウリムシと電気生理学」シンポジウム「ゾウリムシ研究の新潮流」(オーガナイザー 富永貴志, 堀学, 石田正樹) 日本動物学会 2017.09.21 (富山大学)
13. 富永貴志, 富永洋子 「海馬 CA1 野のペアードバーストファシリテーション (PBF) の GABAergic なフィードフォワード, フィードバック調節: 膜電位感受性色素による研究」(Feedforward and feedback-GABAergic control of the paired burst facilitation (PBF) in area CA1 of hippocampus: A voltage-sensitive dye study Takashi Tominaga, Yoko Tominaga) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.20 口頭発表
14. 吉村 弘, 須貝 外喜夫, 加藤 伸郎, 富永 貴志, 富永 洋子, 長谷川 敬展, 姚 陳娟, 赤松 徹也 カフェイン投与により誘発されるラット視覚野オシレーションにおける non-NMDA 受容体と NMDA 受容体の相互交錯的関与 (Interplay between non-NMDA and NMDA receptor activation during caffeine-induced oscillations in the visual cortex of rats) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21
15. 和歌山 ゆうか, 鎌田 翔仁, 山田 悠太, 富永 貴志, 梶原 利一 膜電位イメージングによる嗅周囲皮質の抑制性/興奮性神経活動の層分布解析 (Layer Distribution Analysis of Inhibitory and Excitatory Activity Components in Perirhinal Cortex Using Voltage-Sensitive Dye Imaging) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21
16. 梶原 利一, 和歌山 ゆうか, 富永 洋子, 富永 貴志 神経興奮伝播の促進に關与するマウス嗅皮質神経回路可塑性の膜電位イメージング (Voltage-sensitive dye imaging of the network plasticity facilitating the neural excitation propagation in mouse rhinal cortices) 第40回日本神経科学大会 2017.07.20-2017.07.23) 幕張メッセ, 2017.07.21
17. 富永貴志, 富永洋子 「情動認知行動影響の毒性評価における神経回路機能イメージング法を用いた神経基盤解析」第44回日本毒性学会学術年会 パシフィコ横浜 2017.07.12 シンポジウム招待講演
18. 富永貴志 新学術領域「個性創発脳」第2回領域会議 「個性」創発の神経基盤解析のための神経回路イメージング法と行動様式プロファイリング 御殿場 2017.07.08
19. 富永貴志 「膜電位感受性色素を使った光計測法により神経回路機構を探る—海馬を中心として」第37回 Neuroscience Seminar Tokushima 徳島大学病院 2017.03.06 招待講演
20. Takashi Tominaga Cellular electrophysiology to VSD imaging, International Symposium on Future of Brain Science 2017.03.03 東北大学 招待講演
21. 富永貴志 平成28年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明とその毒性学的評価系構築に資する研究(H27-化学-一般-007)平成28年度班会議プログラム「光計測による神経回路解析の神経毒性評価への応用」東京国際フォーラム会議室G502 20170227
22. 富永貴志 新学術領域「個性創発脳」第1回領域会議 計画研究発表「個性」創発の神経基盤解明にむけた網羅的な神経回路イメージング解析技術の開発 松島, 宮城 2016.12.16
23. 富永貴志 新学術領域「個性創発脳」第1回領域会議 技術講習会膜電位イメージングの技術支援: 実施例から 松島, 宮城 2017.12.16
24. 富永 貴志, 富永 洋子「使える」膜電位感受性色素による神経回路解析法 “Conventional” voltage sensitive dye imaging of neural circuit activity 第54回日本生物物理学会年会(つくば国際会議場)「神経活動イメージングの最先端: 新規ツールとその活用 (Advances in imaging neuronal activity: New tools and applications) オーガナイザー ベアン クン(沖縄科学技術大), 富永 貴志(徳島文理大) 2016年11月25日
25. 小池(谷) 真紀, Mehta Shalin, Oldenburg Rudolf, 富永貴志, 谷 知己 新規偏光顕微鏡を用いたマウス海馬スライスにおけるシナプス活動の非侵襲的計測 Imaging of neuronal activity in mice hippocampal slices by instantaneous polarized light microscopy 第54回日本生物物理学会年会(つくば国際会議場)「神経活動イメージングの最先端: 新規ツールとその活用 (Advances in imaging neuronal activity: New tools and applications) オーガナイザー ベアン クン(沖縄科学技術大), 富永 貴志(徳島文理大) 2016年11月25日
26. 富永貴志 富永洋子 (2016) GABA 依存のペアードバースト促進は海馬 CA1 における新規の NMDA 非依存の短期可塑性である GABA dependent paired burst facilitation (PBF) is a new class of NMDA-independent short-term plasticity in area CA1 of the hippocampal slice. A voltage-sensitive dye study 第39回日本神経科学大会 Neuroscience 2016 パシフィコ横浜 7月20-22日 O2-J-2-3
27. 吉村弘, 富永洋子, 富永貴志 (2016) ラット傍梨状核において大脳皮質脱抑制下で生じるエコー波 Cortical disinhibition-induced echo wave in the EPN of rat 第39回日本神経科学大会 Neuroscience 2016 パシフィコ横浜 7月20-22日 P2-058
28. 富永 貴志 1, 富永 洋子 1, 五十嵐 勝秀 2, 3, 大塚 まき 2, 3, 古川 佑介 2, 菅野 純 2, 種村 健太郎 4 (2015) 膜電位感受性色素による神経回路機能のアッセイ系の構築—海馬スライスとビスフェノール A」Neural circuit functional assay with voltage-

sensitive dye imaging in hippocampal slices; effect of maternal bisphenol A 第 53 回日本生物物理学学会年会 The 53rd Annual Meeting of the BSJ (金沢大学)
29. 富永貴志 内藤豊 (2015)「ゾウリムシの電位感受性 K チャネルのホジキン-ハックスレー型の解析」Hodgkin-Huxley type analysis of voltage-dependent potassium currents in Paramecium 日本動物学会 第 86 回 新潟大会 (口頭発表)
30. 富永貴志 富永洋子 (2015)「海馬スライス標本で CA1 野で見られる 100Hz 刺激によって引き起こされる GABA_A 受容体以外の細胞体近傍での膜電位応答の可視化 VSD-imaging of 100 Hz stimulation induced GABA_A independent perisomatic membrane potential response in area CA1 of hippocampal slice Tominaga T and Tominaga Y」日本神経科学会 2P057 神戸国際展示場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph20/>
<http://dev.main.jp/ttext/TText/TominagaLab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 貴志 (TOMINAGA, Takashi)
徳島文理大・神経科学研究所・教授
研究者番号：20344046

(2) 研究分担者

梶原 利一 (KAJIWARA, Riichi)
明治大学・理工学部・専任講師
研究者番号：60356772

(3) 連携研究者

種村 健太郎 (TANEMURA, Kentaro)

東北大・(連合) 農学研究科・教授

研究者番号：20332322

吉村 弘 (YOSHIMURA, Hiroshi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90288845

武藤 弘樹 (MUTOH, Hiroki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60443040

(4) 研究協力者