

令和元年6月3日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07013

研究課題名(和文)異なる大脳皮質錐体細胞サブタイプの線条体への投射様式

研究課題名(英文)Synaptic innervation manners from cortical pyramidal subtypes to striatum

研究代表者

大塚 岳 (Otsuka, Takeshi)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・助教

研究者番号：10390692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：回転かごを用いた足場バーのボタン学習をラットに行わせた。一次運動野から局所電場電位を記録した結果、学習中にオシレーション活動が発生しており、光操作によって増強された。また、学習中の動物に光操作を行うと錐体細胞サブタイプに依存して学習形成に影響が見られた。特定の錐体細胞サブタイプが学習形成に重要な役割を担っていることが示唆される。皮質から線条体へのシナプス投射様式についてスライス標本を用いて解析した。錐体細胞サブタイプに依存して線条体で異なる情報処理を行っていることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質を構成する細胞は形態学的・生理学的に多様であり、また情報出力する脳領域に依存してサブネットワークを形成している。脳の高次機能を理解するには、多様な大脳皮質の結合回路の機能的役割とネットワーク活動の動的な制御機構について、皮質が情報を出力する脳領域と関連して明らかにすることが必要不可欠である。本研究は、皮質の皮質下構造への多様な情報出力と高次機能を関連して理解することを目標としており、脳の高次機能を理解するには上で重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The cortex outputs information to several brain areas through different sets of pyramidal cells (PC). It has been shown that cortical PCs form subnetworks, depending on pyramidal projection subtypes. However, it remains unknown how individual PC subnetworks concern in cortical information processing and the high order brain functions. Here, I investigated the effects of optogenetic manipulations of each PC subtype activities on motor pattern learning. Pattern learning task was examined using forced wheel running system. Time courses of learning formation were affected by optogenetic manipulations of specific PC subtypes, suggesting that oscillatory activities induced by specific L5 PC subtype contribute to formation of the motor learning. I also examined innervation manners to the striatum which plays crucial roles for motor learning. I found different innervation pattern to striatal cells depending on cortical cell types, suggesting different information processing in the striatum.

研究分野：神経科学

キーワード：線条体 大脳皮質 錐体細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能を担う大脳皮質は、多様な領域に出力を行っている。皮質からの情報が、どのように皮質下領域に出力され、また学習などによってどのように調節されるのかを明らかにすることは、脳の高次機能を解明する上で必要不可欠である。研究代表者は、これまでに皮質において投射先で分類される錐体細胞サブタイプ間の結合回路を解析し、投射先に対応したサブネットワークを同定した。また、主要な介在細胞である Fast-Spiking (FS) 細胞は、錐体細胞とサブタイプ非依存的に相互結合をすることがわかった。スライス標本を用いた神経活動の光操作実験では、錐体細胞サブタイプに依存してオシレーション活動が発生した。オシレーション活動は脳の高次機能と関係していると考えられている。しかし、皮質錐体細胞サブタイプがどのように皮質の神経活動に寄与し、皮質下領域に情報出力を行い、また学習などの高次機能に関与しているのか明らかではない。

2. 研究の目的

皮質運動野の5層錐体細胞は、脊髄に投射する (PT) 細胞と対側皮質に投射する (IT) 細胞の2つに主に分類される。PT と IT 細胞は、皮質局所回路では層内・層間でサブネットワークを形成している。錐体細胞サブタイプに依存して誘発されるオシレーション活動の運動学習への関与を検討する。また、これらの2種類の5層錐体細胞サブタイプは同側の線条体に強く投射していることが知られている。PT と IT 細胞の同側線条体への投射様式と運動学習による調節機構を明らかにし、皮質 大脳基底核系における運動学習の錐体細胞サブタイプによる制御機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

皮質錐体細胞サブタイプ選択的に神経活動を光操作するために子宮内電気穿孔法を用いてチャンネルロドプシン (ChR2) やアーケロドプシン (eArch) をラットに遺伝子導入した。ラットでは胎生 17 日目に電気穿孔法を行うと 2/3 層錐体細胞に、また胎生 14 と 15 日目に導入を行うと 5 層 PT と IT 細胞にそれぞれ選択的に目的のタンパクを発現させることができることが研究代表者の先行実験でわかっている。運動学習としては、回転カゴを用いた。足場バーの間隔を変え、バー間隔のパターン学習を行わせた。足場バーからの脱落回数を学習の指標とした。学習中の動物の皮質神経活動は慢性用シリコンプローブ電極を用いて記録した。また、刺激用光ファイバークニューラを挿入し、学習中に特定の錐体細胞サブタイプを光操作した。

スライス実験では線条体からホールセル記録を行い、ChR2 を発現させた神経終末を光刺激することによって誘発されるシナプス電流を解析した。線条体の投射細胞は、淡蒼球内節・黒質に投射する直接路 (ドーパミン受容体 D1 陽性細胞) と淡蒼球外節を介した間接路 (ドーパミン受容体 D2 陽性細胞) に分かれる。単一細胞 RT-PCR 法を用いて D1、D2、サブスタンス P、エンケファリンの発現から記録した投射細胞のタイプを同定した。

4. 研究成果

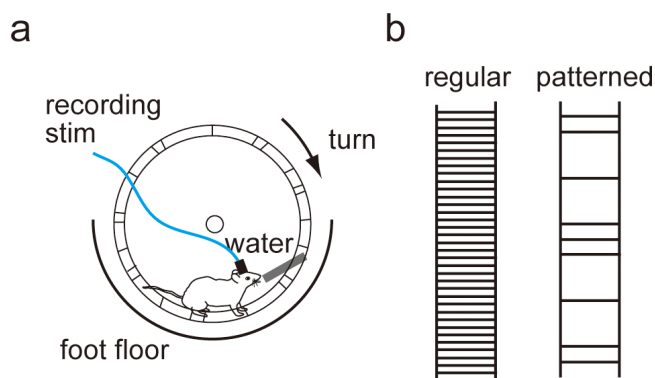


図-1 a) 回転カゴを用いた強制運動学習。
b) 足場バーの間隔を変えパターン学習させる。

錐体細胞サブタイプの運動学習への寄与を検討するために、回転カゴを用いたパターン学習をラットに行わせた。足場バーの間隔を一定にした回転カゴで慣らした後、間隔を不規則にした配列に変え、給水を制限した動物にパターン学習を行わせた (図-1)。1 トライアルを 3 分間とし、5 トライアル/日、行わせた。その結果、トライアルを重ねるごとに足場バーからの脱落回数が減少し、パターン学習が形成された (図-2)。学習中の皮質運動野の神経活動

を解析するために、一次運動野 (前肢領域) にシリコンプローブ電極を挿入し、慢性記録を行った。その結果、局所電場電位 (LFP) において 35Hz 程度の周波数のオシレーション活動がパターン学習中に発生していることがわかった。また、学習形成の後期では、オシレーション活動のパワーが形成初期と比べて弱くなったことから、このオシレーション活動が学習の形成に関与していることが示唆される。スライス標本を用いた光刺激実験では、錐体細胞サブタイプに依存してオシレーション活動が発生することが研究代表者の実験でわかっている。錐体細胞サブタイプのオシレーション活動への寄与を *in vivo* で検討するために、ChR2 を 2/3 層錐体細胞

に発現させた動物に光刺激を学習中に行った。その結果、スライス実験と同様に光刺激に対して LFP のオシレーション活動のパワーが増強された。従って、生体においても錐体細胞サブタイプ依存的にオシレーション活動が発生していることが示唆される。錐体細胞サブタイプの学習形成への寄与を検討するために、2/3 層、5 層 PT、IT 錐体細胞選択的に ChR2 を発現させた動物

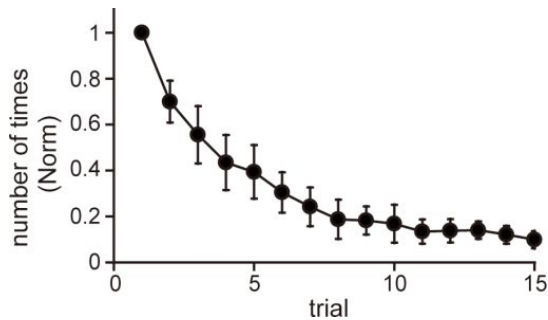


図-2 前肢の足場バーからの脱落回数。トライアルを重ねると減少した。

物にスライス実験と同様にランプ形の光刺激を学習中に行った。その結果、2/3 層と 5 層 PT 錐体細胞サブタイプを刺激した場合に学習形成が早くなった。さらに、eArch を遺伝子導入した動物を用いて錐体細胞サブタイプの神経活動を選択的に抑制し、学習形成への効果を検討した。その結果、5 層 PT 細胞を抑制した場合のみ学習形成が遅くなり、2/3 層や IT タイプの錐体細胞の抑制では効果が見られなかった。ChR2 (興奮) の結果と合わせ、5 層 PT 錐体細胞サブタイプがオシレーション活動の発生に関与しており、

り、運動学習の形成に重要な役割を担っていると考えられる。

皮質 大脳基底核系は、運動の学習や制御を担っている。皮質運動野は大脳基底核の入力核である線条体に強く投射している。皮質錐体細胞サブタイプ依存的に発生するオシレーション活

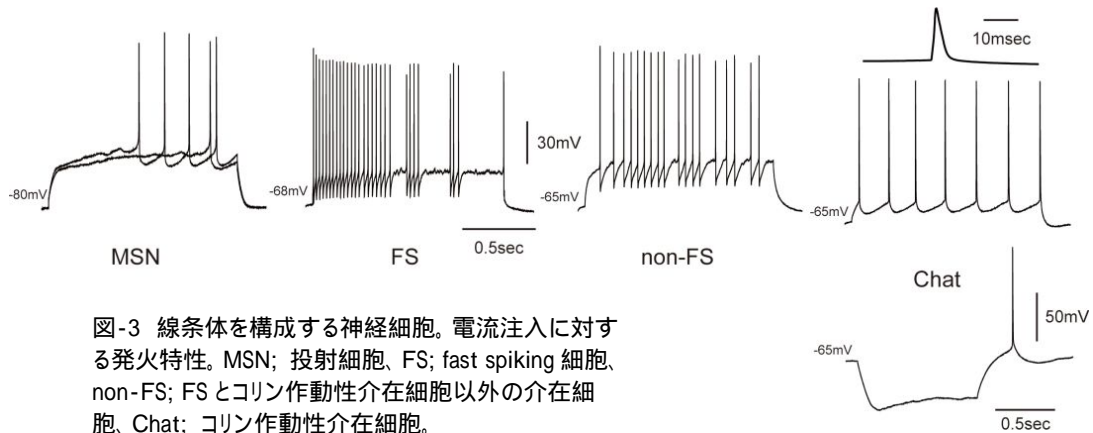


図-3 線条体を構成する神経細胞。電流注入に対する発火特性。MSN; 投射細胞、FS; fast spiking 細胞、non-FS; FS とコリン作動性介在細胞以外の介在細胞、Chat; コリン作動性介在細胞。

動と学習形成の機構を理解するために、皮質 線条体シナプス投射様式を検討した。ChR2 を片側運動野に錐体細胞サブタイプ選択的に発現させたラットから脳スライス標本を作製し、錐体細胞サブタイプごとに線条体細胞へのシナプス投射様式を解析した。線条体は、投射細胞と介在細胞から構成されている。ホールセル記録において、電流注入に対する発火応答パターンから細胞タイプを同定した(図 3)。また、線条体投射細胞は、淡蒼球内節・黒質に投射する直接路 (D1 陽性細胞) と淡蒼球外節を介した間接路 (D2 陽性細胞) に投射する細胞の 2 種類に分類されるが、記録後に単一細胞 RT-PCR 法を行い、D1 受容体、D2 受容体、サブスタンス P、エンケファリンの発現から記録した投射細胞のタイプを同定した。波長 470nm のレーザー光を 3 ミリ秒間、線条体スライスに照射し、ChR2 を発現させた神経終末を刺激することでシナプス伝達を誘発し、線条体細胞への入力を解析した(図 4)。その結果、線条体の主要な細胞タイプである投射細胞 (D1、D2 受容体陽性)、FS 細胞、non-FS 細胞、Chat 陽性細胞において 2/3 層や 5 層から神経終末への光刺激によって誘発されたシナプス入力がみられた。5 層錐体細胞サブタイプ間では、線条体への投射様式に違いは見られなかったが、2/3 層と 5 層錐体細胞間で

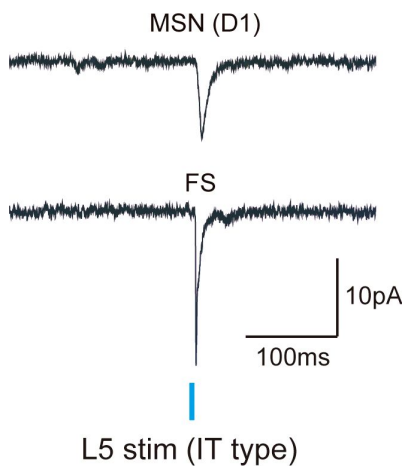


図-4 皮質から線条体へのシナプス電流。線条体で同時に 2 個の細胞からホールセル記録を行い、光刺激をした(青線)。

は、線条体細胞へのシナプス投射様式を解析した。線条体は、投射細胞と介在細胞から構成されている。ホールセル記録において、電流注入に対する発火応答パターンから細胞タイプを同定した(図 3)。また、線条体投射細胞は、淡蒼球内節・黒質に投射する直接路 (D1 陽性細胞) と淡蒼球外節を介した間接路 (D2 陽性細胞) に投射する細胞の 2 種類に分類されるが、記録後に単一細胞 RT-PCR 法を行い、D1 受容体、D2 受容体、サブスタンス P、エンケファリンの発現から記録した投射細胞のタイプを同定した。波長 470nm のレーザー光を 3 ミリ秒間、線条体スライスに照射し、ChR2 を発現させた神経終末を刺激することでシナプス伝達を誘発し、線条体細胞への入力を解析した(図 4)。その結果、線条体の主要な細胞タイプである投射細胞 (D1、D2 受容体陽性)、FS 細胞、non-FS 細胞、Chat 陽性細胞において 2/3 層や 5 層から神経終末への光刺激によって誘発されたシナプス入力がみられた。5 層錐体細胞サブタイプ間では、線条体への投射様式に違いは見られなかったが、2/3 層と 5 層錐体細胞間で

は介在細胞への投射に違いがみられた。さらに、連続して光刺激を行い、シナプス入力の本質を解析した。その結果、皮質錐体細胞タイプに依存してシナプス電流の振幅の比が、同一の線条体細胞タイプでも異なっていた。特に線条体 FS 細胞へのシナプス入力は、2/3 層と 5 層からの入力で性質が異なり、2/3 層からの入力は振幅の比が減少を示したが、5 層からの入力では増強を示した。これらの結果は、2/3 層と 5 層の皮質からの入力に対して線条体では異なる情報処理を行っていると考えられる。今後、運動学習との関連を明らかにしたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kawaguch Y., Otsuka T., Morishima M., Ushimaru M., and Kubota Y., Control of Excitatory Hierarchical Circuits by Parvalbumin-FS Basket Cells in Layer 5 of Frontal Cortex., J. Neurophysiol., 査読有、印刷中、2019.

Kaneko N., Herranz-Pérez V. †, Otsuka T. †, Sano H. †, Ohno N. †, Omata T. , Nguyen H. B. , Thai T. Q. , Nambu A. , Kawaguchi Y. , Garcia-Verdugo J. M. , and Sawamoto K. , New neurons use Slit-Robo signaling to migrate through the glial meshwork and approach a lesion for functional regeneration. Science Advances, 査読有、 Dec 12;4(12)、2018、eaav0618. (†, equal contributor)

〔学会発表〕(計 3 件)

大塚 岳 皮質回路におけるオシレーション活動と運動学習 大脳基底核機能研究会、2018

Otsuka T. and Kawaguch Y., Cortical pyramidal cell-subtype dependent motor learning and oscillatory activities., 日本神経科学学会、2017

Otsuka T. and Kawaguch Y., Oscillatory activities in the cortical networks., 国際神経局所回路会議、2016

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、研究者個人に帰属されます。