

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07043

研究課題名(和文) 乳頭体上核-海馬回路の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the supramammillary nucleus-hippocampal circuits

研究代表者

橋本谷 祐輝 (Hashimotodani, Yuki)

同志社大学・研究開発推進機構・准教授

研究者番号：50401906

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)：視床下部に位置する乳頭体上核は海馬の歯状回とCA2へと投射する。この回路は記憶や情動と強い結びつきのあることが示唆されているが、そのシナプス結合様式は詳しく調べられていなかった。本研究では乳頭体上核-歯状回間のシナプス結合を光遺伝学と電気生理学を用いて調べた。その結果、乳頭体上核ニューロンは歯状回の顆粒細胞および抑制性ニューロンとシナプスを形成し、これらのシナプスにおいてグルタミン酸とGABAを共放出することを明らかにした。さらに乳頭体上核の入力が貫通線維入力と同期することで顆粒細胞の発火を上昇させることを明らかにした。以上の結果から乳頭体上核は歯状回の活動を調節することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳頭体上核と海馬で形成される神経回路はこれまで記憶や情動に関して重要な役割を果たすことが示唆されてきた。最近にはさらに睡眠やナビゲーションにも関わることが報告され、乳頭体上核-海馬間神経回路はより多様な脳機能に寄与することがわかってきた。本研究はこういった重要な脳機能を発揮する神経基盤をシナプスレベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The supramammillary nucleus (SuM) of the hypothalamus projects to the dentate gyrus and the CA2 region of the hippocampus. Although the SuM to hippocampus circuits have been implicated in spatial and emotional memory formation, little is known about precise neural connections between the SuM and hippocampus. By using optogenetics and electrophysiology, we found that the SuM neurons project to both granule cells and GABAergic interneurons and co-release glutamate and GABA. We also found that SuM inputs potentiate granule cell firing when temporally associated with perforant path inputs. These results indicate that the SuM modulates dentate gyrus activity by modulating granule cell outputs.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬 乳頭体上核 歯状回 共放出 シナプス可塑性 光遺伝学 神経回路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コネクトームで代表されるように現在、脳の回路地図作成が盛んに行われており、神経回路の詳細な解析がますます重要視されている。脳のなかでも海馬は記憶・学習を担う重要な脳領域であり古くから研究が行われており、海馬の神経回路についても、すでによく調べられている。海馬への主要な入力は大脳皮質の嗅内皮質から海馬歯状回への入力が始まり、歯状回から CA3, CA1 と情報伝達され嗅内皮質に出力される。この古典的な神経回路以外にも近年、様々な回路が見つかった。なかでも最近、長らくその存在が軽視されてきた CA2 が脚光を浴び盛んに研究されている(Dudek et al, Nature Reviews Neurosci, 2016)。さらに嗅内皮質からは興奮性だけでなく抑制性の投射も存在し、海馬情報処理が複数の回路を介して調節を受けていることがわかってきた(Basu and Siegelbaum, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015)。以上のように、これまで調べ尽くされてきたと考えられた海馬でさえ、まだ未知の神経回路が存在する。なかでも長らく存在自体は知られていたがあまり詳しく調べられていなかったのが視床下部に位置する乳頭体上核から海馬への投射である(Segal and Landis, Brain Res, 1974)。乳頭体上核は海馬の中では CA2 と歯状回にのみ投射する極めてユニークな投射パターンを示す(図1)。これまでの研究で、この投射が、記憶・学習と密接な関係にある海馬シータ波の活動を調節することが明らかになっている(Kocsis and Vertes, J Neurosci, 1994)。さらに最近、睡眠との密接な関係も示唆された(Renouard et al, Science, 2015)。しかし、乳頭体上核からの投射線維と海馬間のシナプスにおいて基本的な性質として不明な点が多い。まず、この投射線維が興奮性なのか抑制性なのか、あるいはモノアミン系のニューロモジュレーターなのか明らかでない。さらに CA2 と歯状回の中のタイプのニューロンとシナプス結合するのか不明な点が多い。

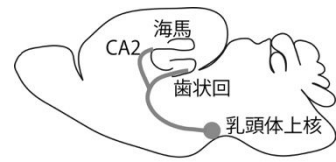


図1 乳頭体上核から海馬への投射

2. 研究の目的

上記の背景をふまえて本研究では、電気生理学的手法、光遺伝学(optogenetics)を駆使して、乳頭体上核-海馬シナプスの機能解析を行う。特に乳頭体上核-歯状回間シナプス結合を明らかにする。さらに乳頭体上核が海馬回路内において、どのようにシナプス可塑性に寄与するのか明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では光遺伝学的手法を用い、乳頭体上核線維を光刺激する。このために光で活性化されるチャンネルロドプシン2(ChR2)をマウスの乳頭体上核にアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて発現させた。ウイルス注射後3週間のマウスの海馬急性スライス標本を作成し、ホールセルパッチクランプ法によって歯状回顆粒細胞から記録を行った。光照射にはLEDを用い5ミリ秒間、顕微鏡の対物レンズを通して、スライスに照射した。歯状回の抑制性細胞から記録する際にはVGAT-Venusトランスジェニックマウスを用い、Venus発現細胞からパッチクランプを行った。また歯状回門に存在する苔状細胞からの記録には細胞体が大きくVenus陰性の細胞からパッチクランプを行った。

4. 研究成果

(1) 乳頭体上核 歯状回神経回路の解析

AAVを用いて乳頭体上核でChR2-eYFPを発現させたところ、過去の文献どおり海馬CA2と歯状回に投射することがわかった。光照射による乳頭体上核線維の刺激で歯状回顆粒細胞および抑制性細胞で起こる反応を調べたところ、両細胞において興奮性のシナプス後電流(EPSC)が測定された。また、このEPSCはグループII代謝型グルタミン酸受容体のアゴニストであるDCG-IVによって抑制されることがわかった。さらに抑制性シナプス後電流(IPSC)に関しても調べたところ両細胞においてIPSCが観察された。興味深いことにEPSC, IPSCの割合を調べたところ顆粒細胞および抑制性細胞の両方で70%を超える高い確率でEPSCとIPSCの両方が記録されることを明らかにした。

(2) 苔状細胞への投射の解析

歯状回門に存在する苔状細胞への投射に関しても調べた。その結果、苔状細胞からの記録では光照射によって EPSC, IPSC ともにほとんど観察されなかった。しかし、2 シナプス性の IPSC がいくつかの細胞で測定された。このことから乳頭体上核はフィードフォワード抑制を苔状細胞に送っていることがわかった。

(3) 乳頭体上核 顆粒細胞 (および抑制性細胞) シナプスにおけるグルタミン酸と GABA 共放出の解析

実験結果(1)から乳頭体上核入力は多くの顆粒細胞 (および抑制性細胞) において EPSC と IPSC の両方を生じさせた。この結果は両細胞が乳頭体上核から興奮性入力および抑制性入力の両方を受け取っている可能性と、同じ神経終末からグルタミン酸と GABA が同時に放出される可能性の2つが考えられた。これらの可能性を検討するために VGlut2-Cre マウス (あるいは VGAT-Cre マウス) を用いて乳頭体上核の興奮性ニューロンあるいは抑制性ニューロン特異的に ChR2 を発現させて実験を行ったところ、どちらのトランスジェニックマウスでも顆粒細胞 (および抑制性細胞) において EPSC と IPSC の両方が記録された (図2)。この結果から乳頭体上核線維神経終末ではグルタミン酸と GABA が共放出されることが明らかになった。

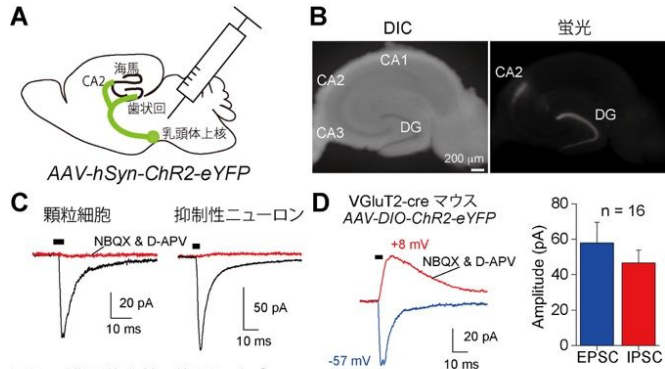


図2 乳頭体上核-海馬シナプス

A. アデノ随伴ウイルスを乳頭体上核に注入しChR2を発現させた。B. 海馬切片。CA2と歯状回 (DG) のみ乳頭体上核からの投射であるeYFPの蛍光が観察された (右)。C. 顆粒細胞および抑制性ニューロンからホールセル記録し、光照射によってEPSCが記録。D. VGlut2-creマウスを使用し、乳頭体上核の興奮性ニューロン特異的にChR2を発現。顆粒細胞においてEPSC (青線) だけでなくGABAによるIPSC (赤線) も同時に記録された。この結果からグルタミン酸とGABAの共放出が示唆された。

(4) 乳頭体上核投射が歯状回情報処理に与える役割

グルタミン酸と GABA が共放出された場合、シナプス後部においてどのような反応が起こるのか調べた結果、顆粒細胞では弱い興奮性入力を引き起こされることがわかった。いっぽう抑制性細胞では約 40%の細胞で発火することがわかった。抑制性入力を阻害した条件で同様の実験を行ったがそれぞれの細胞で有意な差は見られなかった。

最後に顆粒細胞への主要な入力線維である貫通線維と乳頭体上核入力における連合性を調べた。貫通線維はガラス電極によって細胞外刺激し、これを光照射による乳頭体上核入力刺激と組み合わせた。その結果、入力が連合すると顆粒細胞の発火頻度が上昇することがわかった。特に乳頭体上核入力が 20 ミリ秒以内のタイミングで貫通線維入力に先行すると発火頻度の上昇が起った。膜電位変化の解析によって、この発火頻度上昇のメカニズムとして2つの入力の時間的加重によることがわかった。以上のことから乳頭体上核入力は貫通線維入力と同期することによって顆粒細胞の興奮を調節することが明らかになった (図3)。

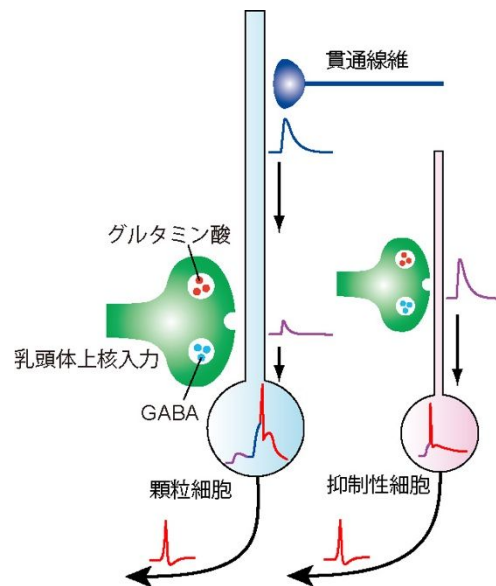


図3. 結果の要約図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimotodani Y, Karube F, Yanagawa Y, Fujiyama F, Kano M	4. 巻 25
2. 論文標題 Supramammillary nucleus afferents to the dentate gyrus co-release glutamate and GABA and potentiate granule cell output.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2704-2715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.11.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hashimotodani Y, Nasrallah K, Jensen KR, Chavez AE, Carrera D, Castillo PE.	4. 巻 95
2. 論文標題 LTP at Hilar Mossy Cell-Dentate Granule Cell Synapses Modulates Dentate Gyrus Output by Increasing Excitation/Inhibition Balance.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 928-943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2017.07.028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen S, Weitemier AZ, Zeng X, He L, Wang X, Tao Y, Huang AJY, Hashimotodani Y, Kano M, Iwasaki H, Parajuli LK, Okabe S, Teh DBL, All AH, Tsutsui-Kimura I, Tanaka KF, Liu X, McHugh TJ.	4. 巻 359
2. 論文標題 Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 679-684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aag1144.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Hashimotodani, Yuchio Yanagawa, Masanobu Kano
2. 発表標題 Optogenetic characterization of the supramammillary nucleus to the dentate gyrus synaptic connections
3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本谷祐輝、柳川右千夫、狩野方伸
2. 発表標題 乳頭体上核から海馬歯状回への神経投射の解析
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本谷祐輝、Pablo E. Castillo
2. 発表標題 海馬歯状回の再帰性回路におけるシナプス可塑性の役割
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田淵詠梨、坂場武史、橋本谷祐輝
2. 発表標題 乳頭体上核 歯状回顆粒細胞シナプスにおける短期可塑性の解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuya Kuboyama, Takafumi Inoue, Yuki Hashimotodani, Takuya Itoh, Tohsuke Suzuki, Aya Tetsuzawa, Ryo Kinoshita, Yosuke Ohtsuka, Ren Takara, Tohru Miyazawa, Pooja Gusain, Masakiyo Tawata, Masanobu Kano, Maki Yamada
2. 発表標題 NMDA receptor-dependent molecular plasticity in dendritic spines of the cerebral cortex after somatosensory stimulation
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuya Kuboyama, Takafumi Inoue, Yuki Hashimoto-dani, Takuya Itoh, Tohsuke Suzuki, Yosuke Ohtsuka, Ryo Kinoshita, Pooja Gusain, Masanobu Kano, Shigeo Okabe, Maki Yamada
2. 発表標題 AiCE mouse: A novel tool to probe LTP-related change in dendritic spines
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 橋本谷祐輝、菅谷佑樹、狩野方伸（10章担当） 森泰生、尾藤晴彦編	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 356
3. 書名 脳神経化学:脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか	

1. 著者名 橋本谷祐輝（分担執筆） 廣川信隆編	4. 発行年 2018年
2. 出版社 クバプロ	5. 総ページ数 409
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー2018	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----