

令和元年6月14日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14943

研究課題名(和文) 注意による体性感覚修飾を前脳基底GABA作動性ニューロンに焦点を当て解明する

研究課題名(英文) A study of somatosensory modification by attention that focuses on the basal forebrain GABAergic neuron

研究代表者

太田 桂輔(Ota, Keisuke)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：40610382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大脳皮質に軸索を投射する前脳基底GABA作動性ニューロンに注目した。この神経細胞が注意時に活性化して体性感覚の検出能力を上昇させると仮説を立てた。まず体性感覚刺激-反応(舐める)-正の強化子(水)というオペラント条件づけを基礎として、持続的な注意が働く体性感覚検出課題を構築した。そして、体性感覚刺激の直前に音刺激を与え、体性感覚刺激への持続的注意を促した。続いて広視野2光子顕微鏡を開発した。マウス大脳皮質2/3層から10,000個以上の神経細胞を同時に記録した。本顕微鏡により、GABA作動性ニューロンがどれほど広範囲の大脳皮質神経細胞を抑制しているかを明らかにできるになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳全体に投射する神経系として汎性投射系(セロトニン系、ドーパミン系、アセチルコリン系など)が知られている。汎性投射系はパーキンソン病、うつ病、アルツハイマー病などの精神疾患に関わるものが多く、薬物治療の標的となってきた。本研究では、大脳皮質全域に投射する前脳基底GABA作動性ニューロンに着目している。GABA作動性ニューロンは抑制性細胞の代表的な細胞である。従って、本研究で着目している細胞は大脳皮質全体の過剰な興奮を抑えることができる。このように本研究により精神疾患に関連する新しい汎性投射系を提唱する可能性を持ち、将来的には疾患研究に新しい枠組みをもたらす側面がある。

研究成果の概要(英文)：We focused on the basal forebrain GABAergic neurons projecting to the cortex. Our hypothesis is that these neurons are involved in attention and these activities improve the sensory detection performance. To test this hypothesis, we firstly established a sensory detection task requiring sustained attention. This task was based on the operant conditioning, somatosensory stimulus-response (lick)-positive reinforce (water), and a pure tone was presented just before the somatosensory stimulus. This auditory stimulus induced sustained attention (Hangya et al., Cell, 2015). Next, we developed a wide-field two-photon microscopy, and recorded more than 10,000 neural activities of layer 2/3 excitatory neurons in an awake mouse. This microscopy enables us to clarify the distribution of cortical neurons modulated by the basal forebrain GABAergic neurons.

研究分野：神経生理学

キーワード：前脳基底 大脳皮質 GABA作動性ニューロン 注意

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

### 1. 研究開始当初の背景

数十年に渡り注意に関連する神経細胞として前脳基底部のコリン作動性ニューロンが動物種を問わず研究対象とされてきた。この神経細胞は大脳皮質・海馬・嗅球など広範囲に軸索を伸ばし、アセチルコリンを軸索終末から放出することで脳全体の神経活動を修飾する(汎性投射系)。しかし、前脳基底部にはコリン作動性ニューロン以外にも数多くの種類の神経細胞が存在する。そのため、先行研究で記録されてきた神経細胞がコリン作動性ニューロンとは断定できず、コリン作動性ニューロンと注意との関係は不明確のままであった。しかしながら、近年の光遺伝学的手法を駆使した研究によって、前脳基底部の注意に関わる細胞は非コリン作動性ニューロンであるという定説を覆す結果が示唆された (Hangya et al., Cell, 2015)。

Hangya が同定した非コリン作動性ニューロンとは何か？前脳基底部では GABA 作動性ニューロン(軸索終末から GABA を放出し、シナプス後細胞の活動を抑制する)も大脳皮質など広範囲に軸索を伸ばすことが示唆されている (Kim et al., PNAS, 2015)。この理由から申請者は前脳基底部 GABA 作動性ニューロンに注目してこれまで実験を重ね以下のことを明らかにした(図1)。

1. 前脳基底部 GABA 作動性ニューロンは、大脳皮質の深部に抑制性軸索を投射する。
2. 前脳基底部 GABA 作動性ニューロンは、一次体性感覚野の神経活動を急峻に抑制させ、緩慢に興奮させる。
3. 前脳基底部の PV (パルプアルブミン)、Sst (ソマトスタチン) 陽性細胞は、意外にも一次体性感覚野に投射しない。

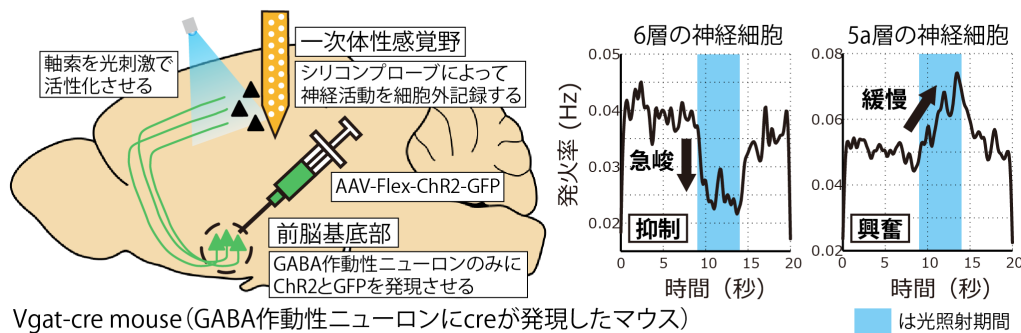


図1 申請者が事前に行った実験とその結果

前脳基底部 GABA 作動性細胞特異的に ChR2 を発現させた。一次体性感覚野にて前脳基底部 GABA 作動性細胞の軸索を青色光で活性化し、一次体性感覚野の神経細胞の活動を記録した。光活性化により神経活動が低下する細胞の他に緩慢に上昇する細胞が存在した。

### 2. 研究の目的

1.で述べたように申請者は大脳皮質に軸索を投射する前脳基底部 GABA 作動性ニューロンを発見した。これは今まで注目されることがなかった前脳基底部の神経細胞である。本研究では、この神経細胞が注意時に活性化して体性感覚の検出能力を上昇させると仮説を立てた。持続注意が働く体性感覚刺激の検出課題をマウスに行わせ、神経活動の記録や光遺伝学的操作により仮説を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

持続的注意が働いた体性感覚刺激の検出課題を確立する。前脳基底部 GABA 作動性ニューロンもしくはシナプス後細胞となる体性感覚野の細胞の神経活動を記録する。光遺伝学を利用して脳基底 GABA 作動性ニューロンの活動を変化させた場合の課題成績を評価する。

### 4. 研究成果

体性感覚刺激 - 反応(舐める) - 正の強化子(水)というオペラント条件づけを基礎として、体性感覚検出課題を構築した。さらに体性感覚刺激の直前に音刺激を与えることで、体性感覚刺激への持続的注意を促す行動課題を構築した (Hangya et al., Cell, 2015)。音刺激は報酬と結びついた体性感覚刺激の予測刺激となる。本行動実験では音刺激から体性感覚刺激が与えられるまでにマウスが反応すると、その試行は終了されマウスは報酬を得られない。実験では2つの音刺激(4kHz音・白色雑音)を用意した。白色雑音後に体性感覚刺激が発生する確率よりも、4kHz音後に体性感覚刺激が発生する確率は高い。4kHz音が提示された場合、音刺激から体性感覚刺激が与えられるまでのマウスの反応が抑制されるという結果を得た。これは4kHz音が与えられた場合、体性感覚刺激が与えられるまで持続的な注意が働いていることを示唆する結果と考えられる。続いて、Vgat-ires-cre mouse を用いて前脳基底部の GABA 作動性ニューロン特異的に ChR2 を発現させた。音刺激から体性感覚刺激の間だけ、この細胞の軸索を一次体性感覚野で活性化した。光刺激あり・なしではマウスの反応速度に差がないという結果を得た。今回の実験では ChR2 発現から行動評価までの期間が開いてしまったため、今後は実験手順をより

最適にして再実験を行う予定である。

前脳基底部 GABA 作動性ニューロンから直接シナプス入力を受ける大脳皮質の神経細胞を同定することを目標として脳スライスをもちいたホールセルパッチクランプの実験系を構築した。大脳皮質の神経細胞は興奮性細胞と抑制性細胞に分けられる。抑制性細胞はさらに発現タンパク・形態・発火特性などによって細分化される。また本研究ではアデノ随伴ウイルスで機能性タンパク質を発現させるためには4週間近くの待ち時間が必要となる。そのことを考慮して通常よりも週齢の高いマウスで脳切片を作製してホールセルパッチクランプ法を行う必要がある (Ting et al., Methods Mol boil., 2014)。この背景を踏まえ、脳スライスを用いた以下の実験を立ち上げた。まずバイオサイチンを充填させた記録電極でホールセルパッチクランプ法により単一神経細胞の発火特性を記録した (図2)。十分な時間だけホールセル状態を形成し続けた後に、脳スライスを PFA により組織固定した。ScaleS (Hama et al., Nat Neurosci, 2015) によって固定脳スライスを透明化した。同時に抗体染色によりバイオサイチンを可視化し、パルプアルブミンまたはソマトスタチンの免疫染色を行った。共焦点顕微鏡によって記録細胞の形態を3次元で観察した (図3)。記録細胞がパルプアルブミン陽性、ソマトスタチン陽性、いずれにも陰性であるかの判断も行った。興奮性細胞にはスパインが見え、Fast spiking neuron はパルプアルブミン陽性であり、Late spiking が観察された細胞はパルプアルブミン・ソマトスタチン陰性であるなど従来の報告通りの結果を得た (図4)。

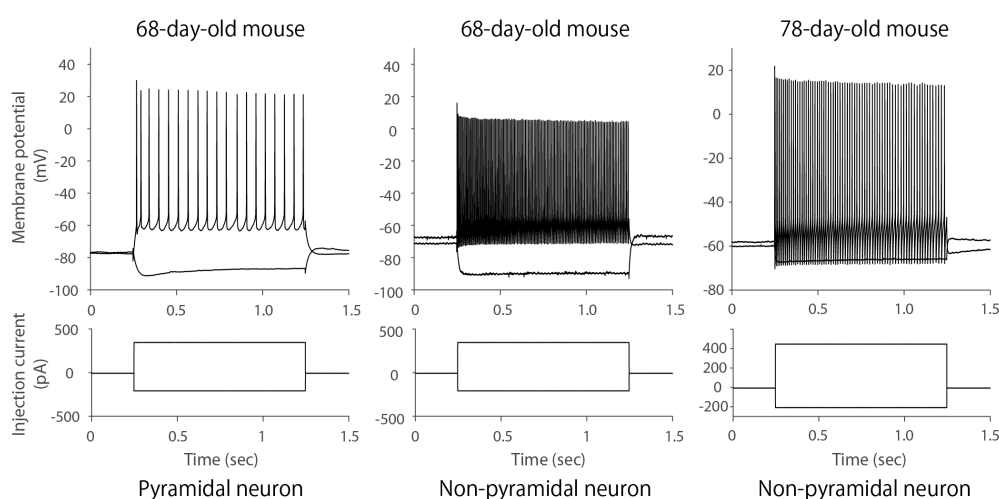


図2 通常よりも高い週齢でホールセルパッチクランプ法により記録した細胞内電位

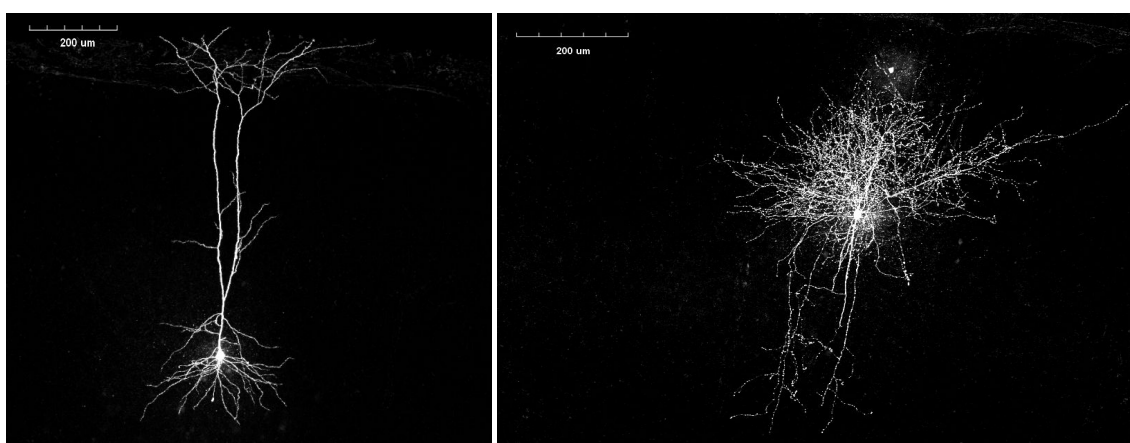


図3 ScaleS を利用して可視化した細胞形態

左：錐体細胞、右：PV 陽性かつ Fast spiking cell (図1右) バスケット細胞と考えられる。

また、GABA 作動性ニューロンがどれほど広範囲の大脳皮質神経細胞を抑制しているかという問いに答えるべく、広視野2光子顕微鏡を開発した。マウス大脳皮質2/3層から10,000個以上の神経細胞を同時に記録することに成功した。

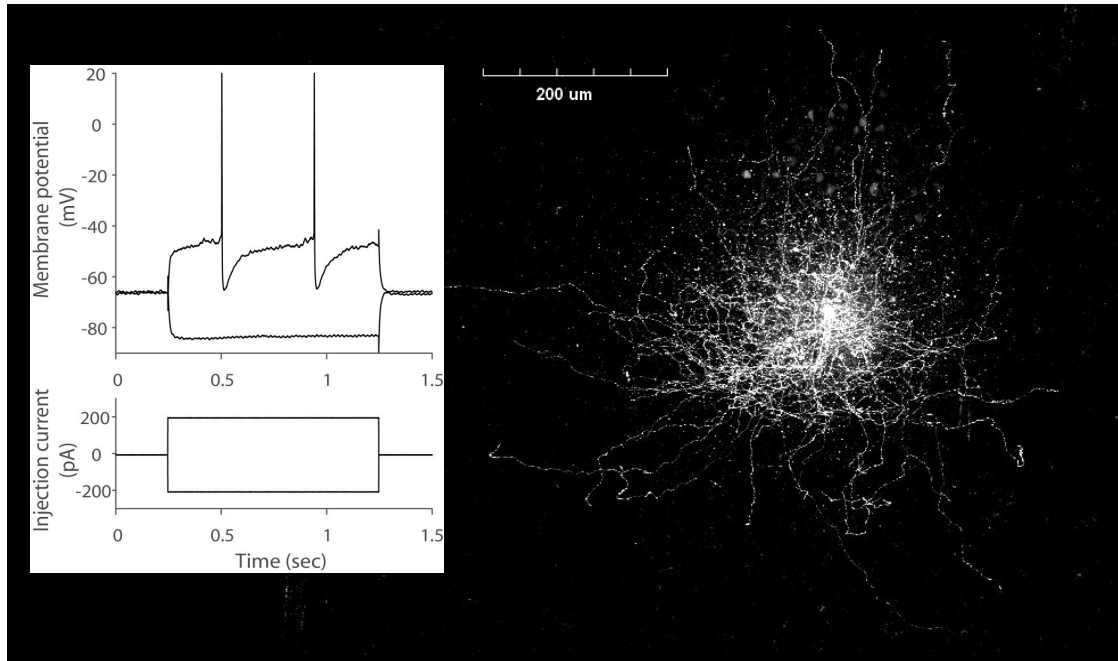


図4 ScaleS を利用して可視化したニューログリアフォームセル

左：膜電位特性 Late spiking が観測された

右：ScaleS によって可視化された形態 PV 陰性かつ Sst 陰性であることが免疫染色によっても確かめられた

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 太田 桂輔, 大石 康博, 鈴木 崇之, 伊東 翼, 大泉 匡史, 小田川 摩耶, 松原 智恵, 小林 碧, 大出 孝博, 小林 憲太, 大倉 正道, 中井 淳一, 宮脇 敦史, 青西 亨, 村山 正宜, 広視野二光子顕微鏡による単一細胞解像度の in vivo イメージング, 第 41 回 日本神経科学大会, 神戸コンベンションセンター, 2018 年

2. 太田 桂輔, 大石 康博, 鈴木 崇之, 伊東 翼, 伊藤 圭基, 大泉 匡史, 小田川 摩耶, 松原 智恵, 小林 碧, 大出 孝博, 日置 寛之, 小林 憲太, 大倉 正道, 中井 淳一, 宮脇 敦史, 青西 亨, 村山 正宜, Wide-field two-photon microscopy with cellular resolution for in vivo calcium imaging, 次世代脳 2018 年度冬のシンポジウム, 一橋大学 一橋講堂 学術総合センター, 2018 年

3. 太田 桂輔, 鈴木 崇之, 伊東 翼, 小田川 摩耶, 宮脇 敦史, 大出 孝博, 青西 亨, 村山 正宜, 広視野二光子顕微鏡による単一細胞解像度 In vivo カルシウムイメージング, 第 95 回 日本生理学会大会, サポートホール高松、高松シンボルタワー, 2018 年

〔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：

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。