

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 - 2008
 課題番号：19500287
 研究課題名（和文） 海馬インターニューロンネットワークによるリズム生成機構の解明
 研究課題名（英文） Rhythm generation in hippocampal interneuron networks
 研究代表者
 塚元 葉子（TSUKAMOTO YOKO）
 財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
 研究者番号：90209132

研究成果の概要：研究代表者らは、脳波やてんかん発作に見られるような「脳が作り出すリズム」に興味を持ち、そのリズムがどうやって作られるのかを解明したいと考えている。本研究では海馬組織を取り出し実験的に生かした状態で、電気刺激によってリズム現象を引き起こして、その発生メカニズムを解析した。その結果、海馬に存在する多くの神経細胞のうち、数種類の介在細胞からなる神経ネットワークがリズムを作り出している可能性を見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1020,000	4,420,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：海馬、リズム、介在細胞、神経回路、生理学、脳・神経、GABA、ギャップ結合

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、ニューロンネットワークのリズム生成が基礎と考えられる様々な周波数帯域のリズム活動が観察される。海馬では、覚醒時や睡眠中にシータ波(4-12Hz)、ガンマ波(30-80Hz)、鋭波リップル(80-250Hz)などのリズム現象が観察され、空間認知や記憶の記録・再生・固定などに関与していると考えられている。さらに病的な過興奮状態ではてんかん発作(3-5Hz)と呼ばれるリズム現象が観察される。これらの現象は、いずれもニューロン群が同じタイミングで発火する「同期」と、ニューロンが

形成する律動性すなわち「リズム」を反映したものであると考えられる。この同期的リズム活動の生成機構を細胞レベルまたは局所回路レベルで解明する試みとして、海馬スライス標本において同様の現象を再現するin vitro 実験モデルがいくつか開発されていた。例えば、シータ波やガンマ波活動はムスカリン性アセチルコリン受容体の刺激により持続的に発生させることができ(Konopacki et al. 1987)。てんかん発作についてもスライス標本の長時間低Mg処理(Anderson et al. 1986; Fujiwara-Tsukamoto et al. 2006)、Kチャン

ネル阻害 (Perreault and Avoli, 1991)、GABA_A受容体遮断 (Borck and Jefferys, 1999) などにより広範囲に同期的で律動的な発火活動を出現させることができる。しかしながら、これらの研究におけるいずれの *in vitro* モデルでも、スライス標本内の各種神経細胞がどのように同期し、リズム自体がどのように生成されるのか、という神経メカニズムについての詳細は、いまだ解明されないままであった。

研究代表者らは、成熟ラット海馬 CA1 スライス標本に強い電気刺激 (テタヌス刺激) を与えると、錐体細胞膜電位に数十秒間続く同期的なリズム活動 (afterdischarge) が誘発されることを見出した (Fujiwara-Tsukamoto et al. 2003)。この afterdischarge の実験モデルは、従来の薬物誘発性リズム活動の実験モデルなどと異なり、極端に細胞内外の環境を変えずに誘発することができ、電気刺激により 100% の確率で誘発され、実験者の任意のタイミングで誘発できるという利点を持っている。このような、ニューロンネットワークが作り出す律動的な活動パターンの解析に理想的なモデル系を用いて、研究代表者らは、以下のような事実を解明してきた。

- 1) この afterdischarge の発現には GABA およびグルタミン酸伝達が関与しており、特に介在細胞から錐体細胞への GABA 作動性入力にテタヌス刺激により一過性に興奮性に転じることが必須である (Fujiwara-Tsukamoto et al. 2003)。
- 2) この afterdischarge に貢献度が高く、一過性の興奮性 GABA 伝達を担う介在細胞は、錐体細胞層と多形細胞層に細胞体が存在する介在細胞である (Fujiwara-Tsukamoto et al. 2004)。

これらの研究結果から、介在細胞群と錐体細胞群が興奮性シナプスで相互に結合する「正のフィードバック回路」を形成し、錐体細胞と介在細胞が相互に興奮させ合って同期発火が実現されるというネットワーク機構を提案した。

このように、テタヌス刺激誘発性の afterdischarge という同期的リズム現象に関しては、我々の一連の研究から「同期」と「リズム」のうち前者のメカニズムをほぼ解明することに成功したといえる。次に解決すべき課題は、「リズム生成のメカニズム」であると考えた。同期のメカニズムを探る一連の実験から、この afterdischarge を発現できるスライスの最小幅が 400 ミクロンであり、この最小幅をスライスの CA1 領域のどこから取ってきても同じようにリズム活動が発現することがわかっていた。さらに、海馬 CA1 領域の多形細胞層と錐体細胞層に外科的な切

れ込みを入れてテタヌス刺激をおこなうと、切断箇所の左右で、同じ周波数帯域でありながら同期しない別々のリズムが生成することがわかっていた (Isomura et al. 2003)。これらのことから、同期発火する神経細胞群を律動的に抑制して歩調取りをする特殊な数少ない「ペースメーカー」細胞が存在するというよりは、CA1 領域中のどこにでも普遍的に存在するニューロンネットワークがリズム生成機構を担っていると考えられるほうが妥当であり、そのリズムは多形細胞層と錐体細胞層を介して近傍の領域に伝播し同期が実現されると推察できた。

このような背景から、我々の実験モデルは「リズム生成メカニズム」を解明するのに最適な系であると確信した。「神経系におけるリズム生成」という生理学の古くからのテーマに対し、神経回路・ニューロンレベルでの説明を可能とするモデル実験系のさらなる開発・改良が待たれていた。

2. 研究の目的

1 の項目でも記したように、研究代表者らは海馬 CA1 スライス標本におけるテタヌス刺激誘発性の afterdischarge についてその発生メカニズムを解析し、この同期的な細胞群の一斉発火が錐体細胞と介在細胞がグルタミン酸作動性と興奮性 GABA 作動性伝達の興奮性相互シナプス結合により実現されていることを突き止めた。さらに、この afterdischarge に貢献度が高く、一過性の興奮性 GABA 伝達を担う介在細胞は、錐体細胞層と多形細胞層に細胞体が存在する介在細胞であることを明らかにした。この研究を進める過程において、afterdischarge に関する薬理学的実験を行ったところ、研究開始当初は見落としていたものの、イオンチャネル型グルタミン酸受容体拮抗薬 CNQX と AP5 の存在下においてもテタヌス刺激誘発性の振動性入力があることを見出した。これは、グルタミン酸が遮断されていても GABA 作動性メカニズムのみで律動的な同期発火が惹起され得ることを示す結果であり、よりシンプルな「afterdischarge のプロトタイプ」となるモデル実験系とみなされた。そこで、この現象 (proto-afterdischarge) について、電気生理学、薬理学および組織学的手法を駆使して、リズム生成神経回路を構成するニューロン群を同定し、これらの特性や相互作用を明らかにしたいと考えた。

本研究成果が得られれば、哺乳類脳組織局所神経回路におけるリズム生成機構についてそのニューロンレベルでの説明が可能となり、*in vivo* 脳組織で観察される脳波など生理的リズム活動の生成機構の解明や、側頭葉てんかんなど脳の律動的興奮異常を呈する

病態の解明や治療薬開発にも貢献し得ると予想される。

3. 研究の方法

本研究で行われた全ての実験について、動物の飼養および実験上の処置は、「動物の愛護及び管理に関する法律」をはじめとする関係法令、ならびに東京都神経科学総合研究所動物実験倫理委員会が定める動物実験指針を遵守して行われた。

(1) 海馬スライス標本の作成

ラットをエーテルで麻酔し、断頭した後、海馬組織のみを摘出して低融点アガロースにより固定し、スライス標本作成器を用いて厚さ 400 μ m のスライス切片を作成した。

(2) 電気生理学的記録法

スライス標本を 1 時間以上人工脳脊髄液 (ACSF) 内でインキュベーションした後、ACSF を循環させた実験チャンパー内に白金製スライス押さえ器で固定した。

電気刺激装置に接続した微小ガラス管刺激電極を放線層に刺入し、テタヌス刺激を行った。パッチクランプ用増幅器に接続したパッチ電極を用い、直視下で細胞内記録を行おうとする細胞を狙いをつけてホールセルパッチクランプ記録を行った。フィールド電位はフィールド電極を錐体細胞層に刺入して記録した。

(3) 薬理的解析

グルタミン酸受容体拮抗薬 (CNQX、AP5、キヌレイン酸、MCPG)、GABA 受容体拮抗薬 (ピククリン、CGP55845) やギャップ結合阻害薬 (カルベノキソロン) は、ACSF に溶解して灌流投与した。

(4) 形態学的観察

パッチ電極内液には常にバイオサイチン 5mM を溶解しておき、実験後必ず組織学的形態観察ができるようにした。電気生理学的実験の最後に、正電流 (0.5nA、0.5 秒、1Hz) をかけて細胞にバイオサイチンを負荷し、スライスを 10%ホルマリン溶液にて固定し、DAB を発色基質としたアビジン - ビオチン複合体 (ABC) 法により記録細胞を可視化した。

4. 研究成果

(1) proto-afterdischarge の記録方法の確立

錐体細胞膜電位記録を行う際に用いるパッチ電極内液のクロライド濃度について、GABA 入力に脱分極性に強調されると同時に高クロライド濃度による細胞毒性が少なく長時間の薬理実験に耐え得る最適濃度を検索したところ、40mM であった。したがって、本研究では高クロライドパッチ内液のクロライド濃度を 40mM に調整し、使用することとした。

このパッチ内液を用いて錐体細胞膜電位を記録すると CNQX/AP5 存在下でも afterdischarge より持続時間は短いものの、テタヌス刺激誘発性の律動的な脱分極性入力 (proto-afterdischarge) が明瞭に観察された (図 1)。このように、グルタミン酸伝達が遮断された条件で、細胞内クロライド濃度を人工的に高くした状態で観察される脱分極性入力は、GABA 作動性の入力と考えられるのが妥当であり、これらの入力は介在細胞からのものであると考えられる。

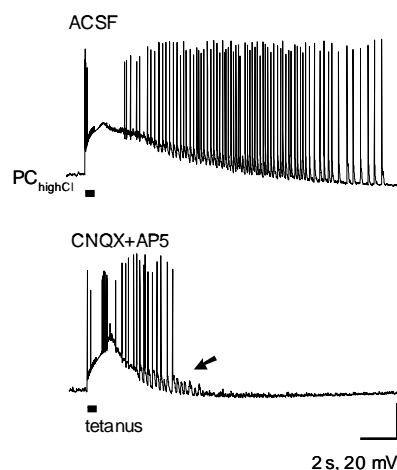


図 1. 高Cl⁻内液を用いて記録したテタヌス誘発性周期的オシレーション

(2) proto-afterdischarge の薬理的性質

高クロライドパッチ内液を用いて薬理学的実験を行ったところ、CNQX と AP5 に加えて、非特異的イオンチャンネル型グルタミン酸拮抗薬キヌレイン酸と代謝調節型グルタミン酸拮抗薬 MCPG を投与しても、proto-afterdischarge は消失しなかった (図 2)。このことから、CNQX や AP5 がグルタミン酸受容体遮断以外の特別な作用を発現して proto-afterdischarge を引き起こした可

能性が否定され、proto-afterdischarge にはグルタミン酸受容体の関与が必須ではないことが明らかとなった。

また、GABA_B受容体拮抗薬CGP55845を投与してもテタヌス刺激誘発性のproto-afterdischargeは消失しなかった(図2)。このことから、afterdischargeと同様、proto-afterdischargeの発現にGABA_B受容体の関与は必須ではないと考えられた。

一方、GABA_A受容体拮抗薬ピククリン、およびギャップ結合阻害薬カルベノキソロンを投与すると、proto-afterdischargeは完全に消失した(図2)。これらの結果から、テタヌス刺激後ある介在細胞ネットワークがグルタミン酸入力非依存的にリズムを生成していると考えられ、錐体細胞へのproto-afterdischargeの発現には「GABA_A受容体の活性化」と「ギャップ結合を介した神経回路」が必須である可能性が示唆された。

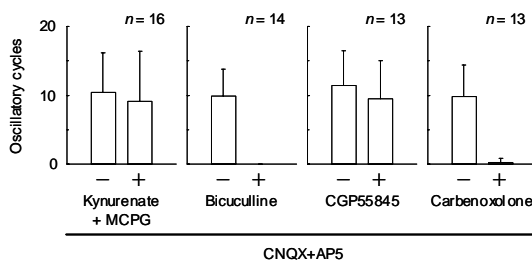


図2 . Proto-afterdischarge の薬理的性質

(3)リズム生成介在細胞ネットワーク構成ニューロンの同定

リズム生成を担う介在細胞ネットワークを構成する介在細胞のサブタイプを同定することを目標として、proto-afterdischarge発生中の各種介在細胞サブタイプの挙動を詳細に検討した。200例を超える介在細胞の活動を電気生理学的に解析した結果、多くの多形細胞層・錐体細胞層の介在細胞では正常ACSF中ではafterdischargeと同期した顕著な発火活動を示すにもかかわらず、CNQX/AP5を投与するとその活動が消失した。しかし、錐体細胞層に存在する高頻度発火特性を持つ介在細胞(バスケット細胞、シャンデリア細胞、バISTRATIFIED細胞など(図3))は、proto-afterdischarge発生中に顕著な同期リズム発射活動を示した。さらに多形細胞層に細胞体の存在するO-LM細胞(図3)も膜電位にproto-afterdischargeと同期した活動を示すものが観察された。これらの結果から、リズム生成に最も貢献度の高い介在細胞サブタイプは錐体細胞層に細胞体が存在する高頻度発火特性を持つニューロンと結論した。

我々は今までに、多形細胞層ならびに錐体

細胞層に細胞体が存在する介在細胞群がafterdischargeの発現に深く関与すると報告した。本研究において、グルタミン酸伝達を遮断してもなお残存する同期的リズム活動(proto-afterdischarge)が、上記の介在細胞群のうち、特に、高頻度発火特性を持ち、錐体細胞層に細胞体を持つ介在細胞サブタイプがリズム生成に深く関与していることを明らかにした。このように、神経回路が作るリズム現象につき、そのリズム発生源をニューロンレベルで同定することは技術的に困難であり、報告が少ないのが現状である。

これらのニューロン同士がどのように化学シナプスあるいは電気シナプスで結合し局所回路を形成しているのか、また、テタヌス刺激によってどのように「リズム生成」が引き起こされるのか、については未だ明らかにできていない。錐体細胞層に細胞体がある介在細胞に狙いを定めてパッチ記録をとるのは、錐体細胞との見分けがつき難い事から大変困難である。そこで、これらの介在細胞を蛍光観察下に可視化できるような遺伝子改変ラットを用いることによって実験効率を高め、これらの問題について、引き続き研究を進める予定である。

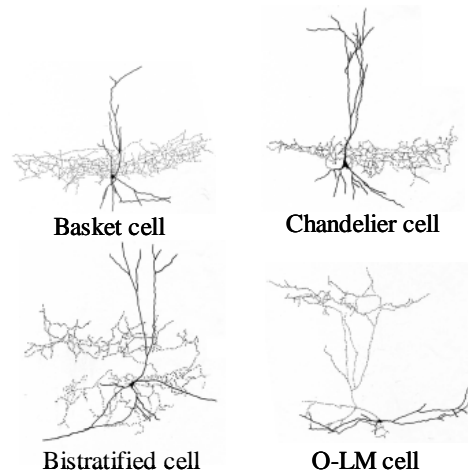


図3 . 介在細胞サブタイプの形態

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)

Isomura, Y., Fujiwara-Tsukamoto, Y., Takada, M. (2008) A network mechanism underlying hippocampal seizure-like synchronous oscillations. *Neurosci. Res.* 61:226-233 査読有り

塚元葉子,磯村宜和. (2008) 海馬神経回路における同期的リズム活動の発生メカニズム. *BRAIN and NERVE* 60:755-762 査読無し

Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y., Imanishi, M., Fukai, T., Takada, M. (2007) Distinct types of ionic modulation of GABA actions in pyramidal cells and interneurons during electrical induction of hippocampal seizure-like network activity. *E. J. Neurosci.* 27: 2713-2725 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

塚元葉子,磯村宜和,今西美知子,深井朋樹,高田昌彦. 海馬スライスにおけるCNQX/AP5抵抗性の同期的振動活動の発生メカニズム. 第31回日本神経科学大会. 2008年7月9日. 東京

塚元葉子,磯村宜和,今西美知子,深井朋樹,高田昌彦. 海馬局所神経回路におけるCNQX/AP5抵抗性の同期的振動活動. 第30回日本神経科学大会. 2007年9月11日. 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚元 葉子 (TSUKAMOTO YOKO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号: 90209130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし