

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06926

研究課題名（和文）大脳皮質味覚野における局所神経回路の動作原理解明

研究課題名（英文）Neuronal circuit mechanisms in the cortical taste area

研究代表者

豊田 博紀 (Toyoda, Hiroki)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：00432451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：島皮質においてはニコチン性受容体が発現しているが、局所神経回路の動作に及ぼす影響は不明な点が多い。本研究では、ニコチン性受容体の活性化によりマウス島皮質ニューロンのシナプス活動がどのように修飾されるかを検討した。その結果、島皮質第III層およびV層錐体細胞において誘導されるシナプス長期増強は抑制され、一方、第VI層錐体細胞において誘導されるシナプス長期増強は促進されることが明らかになった。以上のことから、マウス島皮質におけるシナプス活動は、ニコチン性受容体の活性化により層特異的に制御されることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、島皮質に発現しているニコチン性受容体が、層特異的にシナプス活動を制御していることを明らかにした。ニコチン性受容体が、島皮質局所神経回路の動作に及ぼす影響については不明な点が多く残されており、これまで層特異的に検討した研究はなかったため、学術的意義が高いといえる。本研究により、島皮質により媒介される高次脳機能の発現メカニズムの一端が明らかになるものと期待される。また、島皮質が関与するニコチン性受容体を介して生じる疾患、例えばニコチン依存症の発症機構の解明に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined how nicotine modulates synaptic activities in pyramidal neurons of the mouse insular cortex. We found that activation of nAChRs differentially modulates synaptic activities in layer III, V and VI pyramidal neurons of the insular cortex. In layer III and V pyramidal neurons, activation of nAChRs depressed synaptic potentiation while in layer 6 pyramidal neurons, activation of nAChRs enhanced synaptic potentiation. Thus, activation of nAChRs layer-specifically modulates synaptic activities in the mouse insular cortex, which may be important to perform physiological functions such as learning, memory and pain.

研究分野：神経科学

キーワード：島皮質 ニコチン受容体 局所神経回路 シナプス可塑性 錐体細胞 EPSC IPSC dopamine

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔内に存在する味蕾からの味情報は、脳幹から視床後内側腹側核を介して島皮質(大脳皮質第一次味覚野を含む領域)へ送られ、嗅覚・体性感覚・聴覚などの感覚と統合される。一方、脳内に蓄積された味情報は前頭皮質によって読み出され、島皮質へ送られる。このように、島皮質は末梢からの味情報を受けるだけでなく、脳に蓄積された味情報の想起に関与しているため、味覚の受容や認知において非常に重要な脳部位である。

島皮質は視覚野や体性感覚野とは解剖学的に異なる特徴を有し、視覚野や体性感覚野は、6層構造を持つ顆粒皮質により構成されるが、島皮質は、6層構造を持つ顆粒皮質、第IV層の構造が不完全な不全顆粒皮質および第IV層を欠く無顆粒皮質から構成される。これまでの細胞外記録法や光学計測法を用いた研究により、ラット島皮質では、味覚刺激に応答するニューロンは、主に顆粒皮質および不全顆粒皮質に存在することが示されている。また、島皮質の顆粒皮質および不全顆粒皮質では、味刺激に応答するニューロンだけでなく、侵害受容、内臓感覚、温・冷覚、触覚に応答するニューロンが存在する。いわゆる「味」とは、食物の味そのものだけでなく、「歯ごたえ」や「舌触り」、「熱い・冷たい」といった感覚情報や香辛料等による痛覚情報が統合されることにより生じるため、島皮質における様々な感覚情報の統合が、味の受容や認知のために重要であると考えられる。しかし、高次脳機能を司る島皮質が、どのような神経回路で構成されているか、さらには、どのような局所神経回路により味情報が処理されているかは極めて重要な問題であるにも関わらず、その詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ニコチン性アセチルコリン受容体が島皮質におけるシナプス活動に及ぼす影響を検討し、島皮質における味覚情報処理の神経基盤を明らかにすることを目的とする。そのため、以下の項目について検討する。

- (1) 島皮質第III、V、VI層錐体細胞における興奮性および抑制性シナプス伝達が、ニコチン性受容体の活性化によりどのように修飾を受けるかを検討する。
- (2) 島皮質第III、V、VI層錐体細胞におけるシナプス長期増強が、ニコチン性受容体の活性化によりどのように修飾を受けるかを検討する。
- (3) 島皮質第III、V、VI層錐体細胞や抑制性神経細胞にニコチンのパフ投与を行い、ニコチン性受容体が発現しているか否かを検討する。
- (4) (2)において、シナプス長期増強がニコチン性受容体の活性化により修飾を受けることが見出された場合、ニコチン性受容体と相互作用をもつことが知られる他の神経伝達物質受容体(例えばドーパミン受容体)の役割について検討する。

### 3. 研究の方法

生後21~35日齢のC57BL/6マウスを使用した。イソフルレン麻酔下で断頭後、直ちに脳を摘出し、氷冷人工脳脊髄液中に5分間浸漬した。そして、マイクロスライサーを用いて島皮質を含む厚さ300 $\mu$ mの冠状断脳幹スライス標本作製した。室温の人工脳脊髄液中で1時間以上スライス標本を回復させた後、人工脳脊髄液を持続的に灌流させた記録用チャンバーへ標本を移し、島皮質ニューロンの細胞体を赤外線微分干渉顕微鏡弱拡大視野(100倍)にて同定した。顕微鏡下(600倍)にて、島皮質錐体細胞および抑制性神経細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。電気信号は、パッチクランプ用増幅器(Axopatch 700B)にて増幅し、専用ソフトウェア(Axograph X)を用いて解析した。人工脳脊髄液は、126 mM NaCl、10 mM D-glucose、26 mM NaHCO<sub>3</sub>、2.0 mM CaCl<sub>2</sub>、1.0 mM MgCl<sub>2</sub>の組成とした。興奮性シナプス後電流(EPSC)の記録の際、パッチ電極内には、カリウムを主成分とする溶液(132.5 mM K-gluconate、8.5 mM KCl、14 mM Na-gluconate、10 mM HEPES、2 mM Mg-ATP、

0.3 mM GTP- $\text{Na}_3$ , 0.2 mM EGTA)を充填した。IPSCの記録の際、パッチ電極内には、セシウムを主成分とする溶液(130 mM Cs-gluconate, 10 mM CsCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP- $\text{Na}_2$ , 0.4 mM GTP- $\text{Na}_3$ , 10 mM HEPES and 0.2 mM EGTA)を充填した。島皮質の第 III、V、VI 層錐体細胞において、通電によって生じる EPSC (eEPSC)を記録した。刺激用の金属電極は、記録した錐体細胞から ~200  $\mu\text{M}$  の位置に設置した。eEPSC は、-70mV の膜電位固定下で、 $\text{GABA}_A$  受容体拮抗薬の非存在下で記録した。シナプス長期増強は、細胞を脱分極(+30 mV)させながら、2 Hz の刺激を 80 発与えて誘導した。シナプス長期増強誘導刺激前から刺激直後まで、計 5 分間ニコチン(10  $\mu\text{M}$ )を灌流投与し、シナプス長期増強に対する効果を検討した。また、シナプス長期抑制は、細胞を脱分極(45 mV)させながら、1 Hz の刺激を 300 発与えて誘導した。シナプス長期抑制誘導刺激の間、計 5 分間ニコチン(10  $\mu\text{M}$ )を灌流投与し、シナプス長期抑制に対する効果を検討した。記録細胞から 20-30  $\mu\text{m}$  離れた位置にパフ電極を設置し、気圧式微量注出装置(Picopump PV820)を用いてアトロピン(0.5  $\mu\text{M}$ )存在下でアセチルコリン(1 mM)を 200 ミリ秒間投与した。シナプス長期増強の評価は、シナプス長期増強誘導刺激前 5 分間の振幅の平均と誘導刺激後 25-30 分の振幅の平均値を比較した。検定には paired/unpaired t-test および ANOVA Tukey-kramer 法を使用した。各検定の有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 自発性興奮性シナプス後電流および自発性抑制性シナプス後電流に対するニコチン性受容体活性化の影響

島皮質第 III 層錐体細胞から記録される自発性興奮性シナプス後電流の頻度および振幅は、ニコチン性受容体の活性化により変化しなかった。しかし、島皮質第 V 層および VI 層錐体細胞から記録される自発性興奮性シナプス後電流の頻度および振幅は、ニコチン受容体の活性化により有意に増加した。こうした増加は、7 型ニコチン受容体拮抗薬である MLA (methylylcaconitine) により抑制されなかったが、4/2 型ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬である DH E (dihydro beta erythroidine) により抑制された。これらの結果から、第 III 層錐体細胞へのグルタミン酸作動性シナプス入力、ニコチン性受容体の活性化により変化しないが、島皮質第 V 層および VI 層錐体細胞へのグルタミン酸作動性シナプス入力は、4/2 型ニコチン性受容体の活性化により増加することが明らかになった。一方、島皮質第 III、V、VI 層錐体細胞から記録される自発性抑制性シナプス後電流の頻度および振幅は、ニコチン性受容体の活性化により有意に増加した。こうした増加は、MLA により抑制されなかったが、DH E により抑制された。これらの結果から、島皮質第 III、V、VI 層錐体細胞への GABA 作動性シナプス入力は、4/2 型ニコチン性受容体の活性化により増加することが明らかになった。

##### (2) シナプス長期増強に対するニコチンの影響

島皮質第 III、V、VI 層錐体細胞で誘導されるシナプス長期増強に対するニコチンの効果を検討した。島皮質第 III 層および V 層錐体細胞で誘導されるシナプス長期増強は、ニコチン性受容体の活性化により抑制された。こうしたニコチン性受容体の活性化によるシナプス長期増強抑制効果は、 $\text{GABA}_A$  受容体の拮抗薬である bicuculline や picrotoxin および DH E により抑制された。これらの結果から、ニコチン性受容体の活性化によるシナプス長期増強抑制効果は、4/2 型ニコチン性受容体の活性化によって生じる GABA 作動性シナプス伝達の増大により引き起こされる可能性が明らかになった。一方、第 VI 層錐体細胞で誘導されるシナプス長期増強は、ニコチン性受容体の活性化により促進された。こうしたニコチン性受容体の活性化によるシナプス長期増強促進効果は、DH E により抑制された。これらの結果から、ニコチン性受容体の活性化によるシナプス長期増強促進効果は、4/2 型ニコチン性受容体の活性化により生じることが明らかになった。

##### (3) 島皮質ニューロンにおけるニコチン性受容体電流

島皮質ニューロン(錐体細胞、FS 細胞、非 FS 細胞)において、ニコチン性受容体電流を観察した。殆どの島皮

質第 3 層錐体細胞において、ニコチン性受容体電流は観察されなかったが、第 V 層錐体細胞では、7 型の脱感作が速いニコチン性受容体電流が観察された。第 VI 層錐体細胞では、脱感作が遅い 4 2 型のニコチン性受容体電流が観察された。島皮質第 III、V、VI 層では、約半数の FS 細胞において、7 型のニコチン性受容体電流が観察された。また、島皮質第 III、V、VI 層では、殆どの非 FS 細胞において、ニコチン性受容体電流が観察され、4 2 型ニコチン性受容体を発現していた。一部の非 FS 細胞において、7 型のニコチン性受容体電流が観察された

#### (4) ニコチンによるシナプス長期増強抑制作用に対するドーパミン受容体の役割

線条体や側坐核ではニコチン受容体の活性化によりドーパミンの放出が増大し、シナプス長期抑制が亢進することが示されている。このため、第 V 層錐体細胞で観察されたニコチン性受容体の活性化によるシナプス長期増強抑制効果において、ドーパミン受容体がどのような役割を果たすかについて検討した。ニコチンとともに、ドーパミン D1 受容体拮抗薬 (SCH23390; 10  $\mu$ M) またはドーパミン D2 受容体拮抗薬 (sulpiride; 50  $\mu$ M) を灌流投与すると、ニコチン性受容体の活性化によるシナプス長期増強抑制効果が有意に抑制された。また、ニコチンとともに SCH23390 を灌流投与すると、ニコチン性受容体の活性化によるシナプス長期増強抑制効果が抑制されたが、ニコチンとともに sulpiride を灌流投与した際は、有意な変化は認められなかった。これらの結果から、島皮質第 V 層錐体細胞において誘導されるシナプス長期増強は、ニコチン性受容体とドーパミン D1 受容体の相互作用により抑制されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Toyoda Hiroki, Fujinami Yozo, Saito Mitsuru, Maeda Yoshinobu, Kang Youngnam	4. 巻 452
2. 論文標題 Increased vertical dimension of occlusion for varying periods differentially impairs learning and memory in guinea pigs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 114547 ~ 114547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2023.114547	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 -

1. 著者名 Tanaka Yuto, Sato Hajime, Toyoda Hiroki, Saito Mitsuru, Maeda Yoshinobu, Kang Youngnam	4. 巻 129
2. 論文標題 The mechanism for regulating the isometric contraction of masseter muscles is involved in determining the vertical dimension of occlusion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 211 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00301.2022	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 -

1. 著者名 Toyoda Hiroki, Fujinami Yozo, Saito Mitsuru, Maeda Yoshinobu, Kang Youngnam	4. 巻 452
2. 論文標題 Increased vertical dimension of occlusion for varying periods differentially impairs learning and memory in guinea pigs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 114547 ~ 114547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2023.114547	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 -

1. 著者名 Tanaka Yuto, Sato Hajime, Toyoda Hiroki, Saito Mitsuru, Maeda Yoshinobu, Kang Youngnam	4. 巻 129
2. 論文標題 The mechanism for regulating the isometric contraction of masseter muscles is involved in determining the vertical dimension of occlusion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 211 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00301.2022	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Toyoda Hiroki, Won Jonghwa, Kim Wheedong, Kim Hayun, Davy Oscar, Saito Mitsuru, Kim Doyun, Tanaka Takuma, Kang Youngnam, Oh Seog Bae	4. 巻 16
2. 論文標題 The Nature of Noradrenergic Volume Transmission From Locus Coeruleus to Brainstem Mesencephalic Trigeminal Sensory Neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 841239 ~ 841239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2022.841239	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 該当する

1. 著者名 Saito Mitsuru, Tanaka Chie, Toyoda Hiroki, Kang Youngnam	4. 巻 24
2. 論文標題 Subcellular Localization of Homomeric TASK3 Channels and Its Presumed Functional Significances in Trigeminal Motoneurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 344 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010344	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 Toyoda Hiroki, Koga Kohei	4. 巻 23
2. 論文標題 Nicotine Exposure during Adolescence Leads to Changes of Synaptic Plasticity and Intrinsic Excitability of Mice Insular Pyramidal Cells at Later Life	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 34 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010034	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 Nishibe Mariko, Toyoda Hiroki, Hiraga Shin-ichiro, Yamashita Toshihide, Katsuyama Yu	4. 巻 32
2. 論文標題 Synaptic and Genetic Bases of Impaired Motor Learning Associated with Modified Experience-Dependent Cortical Plasticity in Heterozygous Reeler Mutants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 504 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhab227	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 -

1. 著者名 Toyoda H	4. 巻 10・1
2. 論文標題 CB1 cannabinoid receptor-mediated plasticity of GABAergic synapses in the mouse insular cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64236-5	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 Toyoda H, Katagari A, Kato T, Sato H	4. 巻 22・1
2. 論文標題 Intranasal Administration of Rotenone Reduces GABAergic Inhibition in the Mouse Insular Cortex Leading to Impairment of LTD and Conditioned Taste Aversion Memory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010259	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 Toyoda H, Kawano T, Sato H, Kato T	4. 巻 164
2. 論文標題 Cellular mechanisms underlying the rapid depolarization caused by oxygen and glucose deprivation in layer III pyramidal cells of the somatosensory cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.03.003	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 豊田博紀, 早田敦子, 片桐綾乃, 山田雅治, 田熊一敞, 加藤隆史
2. 発表標題 間歇的低酸素負荷が発達期の脳皮質体性感覚野ニューロンの神経活動に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田博紀, 早田敦子, 片桐綾乃, 山田雅治, 田熊一敞, 加藤隆史
2. 発表標題 発達期大脳皮質体性感覚野ニューロンにおいて間歇的低酸素負荷がシナプス活動に与える影響
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊田博紀, 姜英男
2. 発表標題 青斑核ニューロンの自己抑制障害による過興奮がアルツハイマー病を誘引する可能性と咀嚼によるその緩和
3. 学会等名 認知症と口腔機能研究会第2回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田博紀, 河野奨, 佐藤元, 加藤隆史
2. 発表標題 マウス大脳皮質ニューロンにおいて虚血により誘導される急速脱分極のメカニズム
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / 第1回CJK国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田博紀
2. 発表標題 島皮質局所神経回路の活動制御におけるニコチン性アセチルコリン受容体の役割
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田博紀, 佐藤元, 加藤隆史
2. 発表標題 マウス島皮質シナプス長期増強におけるニコチンおよびドーパミン受容体の役割
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊田博紀, 佐藤元, 加藤隆史
2. 発表標題 マウス島皮質シナプス可塑性におけるニコチンおよびドーパミン受容体の役割
3. 学会等名 第43回日本神経科学大回
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊田博紀
2. 発表標題 島皮質神経回路の機能調節を担うニコチン性受容体の役割
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	佐藤 元  (Sato Hajime)  (10432452)	明海大学・歯学部・講師   (32404)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	加藤 隆史  (Kato Takafumi)  (50367520)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関