

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06424

研究課題名(和文)モノアミンによる眼球運動系神経積分器の修飾機構

研究課題名(英文) Monoaminergic modulation of the oculomotor neural integrators

研究代表者

齋藤 康彦 (Saito, Yasuhiko)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70290913

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)：脳幹の舌下神経前位核(PHN)とカハール間質核(INC)はそれぞれ水平性、垂直性の視線保持に關与する。本研究ではセロトニン(5-HT)やノルアドレナリン(NA)による修飾様式についてスライスパッチクランプ法を用いて調べた。5-HT投与により3種類の、NA投与により2種類の電流応答がそれぞれ異なる受容体によって活性化され、神経伝達物質が異なるニューロン間で電流応答の割合が異なっていた。さらに、持続的な興奮性シナプス電流応答が5-HT投与により抑制された。以上の研究により、PHNやINCのニューロンやネットワークにおける5-HTやNAによる修飾様式が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視線制御のメカニズムの一つがPHNやINCでの神経修飾機構であり、それを担うものがセロトニンやノルアドレナリンなどのモノアミン作動性入力である。今回の研究により、モノアミンによるPHNやINCニューロンでの電流応答が明らかになり、特にこれまで報告が無かった5-HT3受容体を介する応答が明らかになった。今回の成果により、PHNやINCのニューロンでのモノアミンによる修飾様式が明らかになり、視線制御のメカニズムの解明が大きく進展するものと考えられる。さらに、脳で汎用的に用いられているモノアミンを介した情報変換機構への波及効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：The prepositus hypoglossi nucleus (PHN) and the interstitial nucleus of Cajal (INC), which are involved in the control of horizontal and vertical gaze, respectively. Because the effects of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) on PHN and INC neurons and networks have not been fully clarified, we investigated current responses to 5-HT and NA in different neuron types using slice patch clamp methods. Local application of 5-HT and NA induced three and two different current types, which were caused by activation of different receptors. Furthermore, by examining current responses to 5-HT and NA in different neuron types classified based on the expression of different neurotransmitters, we found that each neuron type showed different current responses. These results clarified the mode of modulations by 5-HT and NA to the PHN and the INC.

研究分野：神経生理学

キーワード：視線制御 セロトニン ノルアドレナリン 舌下神経前位核 カハール間質核 パッチクランプ法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視覚情報を適切に脳に取り込むためには、視線を保持することで視覚対象を網膜上で静止させる必要がある。そのためには視覚対象の方向に眼球位置を保持しなければならないので、外眼筋(眼を動かす筋肉)を支配する運動ニューロンは眼球位置情報を伝播している。一方で、外眼筋運動ニューロンへ投射する橋網様体などの脳幹ニューロンは眼球の速度情報を伝えていることが知られている。よって、脳幹ニューロンから外眼筋運動ニューロンへ信号が伝わる間に速度情報から位置情報への変換が行われなければならない。この速度 - 位置変換は数学的な時間積分に相当するため、この変換に関与する脳領域は「神経積分器」と呼ばれている。

水平系と垂直系の視線保持に関与する神経積分器は異なる領域が担当し、水平系は舌下神経前位核 (Prepositus Hypoglossi Nucleus, 以下 PHN と略す)、垂直系はカハール間質核 (Interstitial Nucleus of Cajal, 以下 INC と略す) が主となる領域である。神経積分器については理論的な研究により様々なモデルが提唱されているが (Goldman et al., *New Encycl Neurosci.* 165-178, 2009)、生体内での神経積分器の実体は不明のままである。したがって、「実際の脳において、神経積分器はどのような神経構築をしており、神経積分器を介した速度位置変換がどのようなメカニズムにより実現されているのか？」ということが本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

神経積分器のメカニズムの一つに神経積分器における修飾機構が示唆されている (Leigh & Lee, *The neurology of eye movements.* Oxford Press, 2015)。神経積分器へはモノアミンの投射がみられ、特に、PHN はセロトニン (5-HT) 作動性投射の主な標的の一つとして知られている。さらに、PHN ニューロンが 5-HT 受容体の異なるサブタイプ (5-HT_{1A} と 5-HT₂) を介して過分極性または脱分極性の電位応答を示すことが報告されている (Bobker & Williams, *Neuron* 2: 1535, 1989; Bobker, *J Neurosci* 14: 2428-2434, 1994)。しかし、5-HT による修飾機構を理解する上で重要となる「異なる 5-HT 受容体サブタイプがどのニューロンに発現しているのか」という点については調べられていない。また、5-HT 受容体の活性化が実際に神経積分器の興奮性ネットワークの活性化に作用を及ぼすのかについて調べた研究は皆無である。

2. 研究の目的

本研究では、神経積分器がモノアミンによりどのように修飾を受けるのかを明らかにすることで神経積分器のメカニズムに迫ることを目的とする。そのために、(1) 5-HT 受容体サブタイプとニューロンタイプとの関係を調べ、5-HT によってどのニューロンでどのような修飾を受けるのかを明らかにする、(2) 5-HT 受容体の作動薬や阻害薬の投与による興奮性ネットワーク活性の変化を調べ、神経積分器への 5-HT による修飾様式を明らかにする。さらに最近、研究代表者らは PHN と INC でノルアドレナリン (NA) に対して電流応答を示すニューロンの存在を新たに見出したことから、(3) NA という異なるモノアミンによる神経積分器への修飾様式について明らかにする。以上 3 つを本研究の目的達成のためのテーマとする。

3. 研究の方法

本研究の動物実験については「動物実験計画書」を本学の動物実験委員会へ、組換え DNA 実験については「組換え DNA 届出実験計画書」を組換え DNA 実験安全委員会へ提出し、それぞれ承認を受けた (動物実験承認番号: 12252、12781、組換え DNA 実験承認番号: 届出 159-2)。実験には Wild-type の Long-Evans ラット、抑制性ニューロンが Venus の蛍光を発する VGAT-Venus トランスジェニックラット、コリン作動性ニューロンが tdTomato の蛍光を発する ChAT-tdTomato トランスジェニックラットと VGAT-Venus ラットを掛け合わせた二重トランスジェニックラットの 3 種類のラットを使用した。生後 18 - 21 日齢のラットをイソフルランによって十分な麻酔下におき、断頭により脳を取り出し、PHN または INC を含む厚さ 250 μ m または 400 μ m の前額断スライス標本作製した。蛍光顕微鏡下で蛍光ラベルを観察し、PHN では Venus と tdTomato の両方を発現していないものをグルタミン酸作動性ニューロン、Venus のみを発現しているものを抑制性ニューロン、tdTomato のみを発現しているものをコリン作動性ニューロンと同定した。また、INC では Venus を発現していないものをグルタミン酸作動性ニューロン、Venus を発現しているものを抑制性ニューロンと同定した。それら同定したニューロンからホールセル記録を行い、定電流通電によって生じる発火パターンを調べたのち、-75mV に膜電位を固定した状態で 5-HT または NA を細胞体近辺に局所的に投与することで生じる電流応答を調べた。さらに、5-HT または NA の受容体の作動薬や拮抗薬を用いて、電流応答に関与する受容体を同定した。生じる電流応答は、グルタミン酸作動性、抑制性、コリン作動性ニューロン間または発火パターンの異なるニューロン間で違いがあるかについても調べた。興奮性ネットワーク活性については PHN または

INC 内に存在するニューロンからホールセル記録を行い、抑制性シナプス伝達を薬理的にブロックした状態で、記録されたニューロンの近傍に一過性の高頻度電気刺激（バースト刺激、100 Hz、20 パルス）を与えた。バースト刺激の前後での自発性シナプス後電流（EPSC）を記録し、刺激後に EPSC 頻度の上昇がみられる持続時間や刺激後 1 秒間の EPSC 頻度を調べ、5-HT や NA 投与により持続時間や EPSC 頻度に変化が生じるのかを調べた。

4. 研究成果

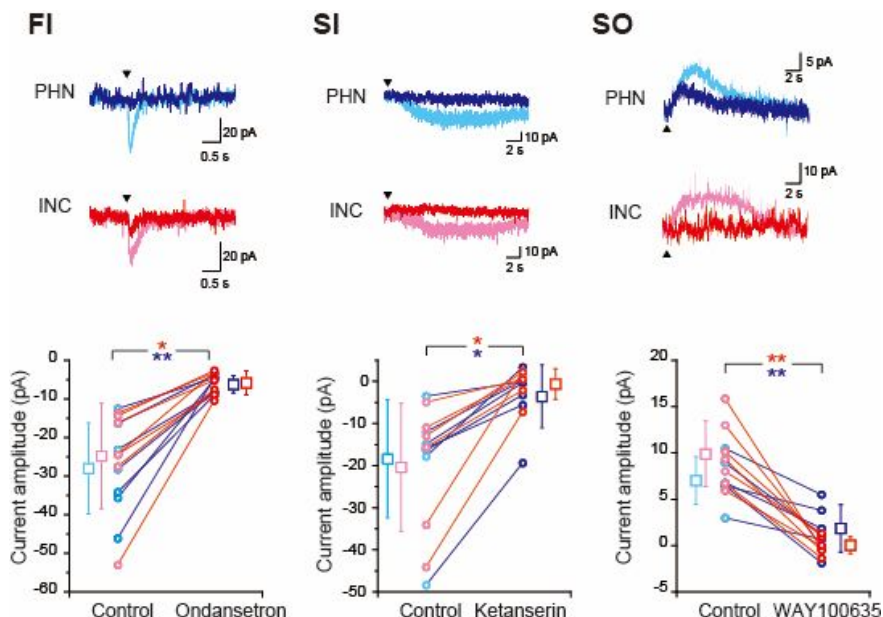
(1) 5-HT によって生じる電流応答

PHN または INC ニューロンからホールセル記録を行い、5-HT を局所投与したところ、PHN と INC とともに、1) 速い内向き電流 (FI)、2) 遅い内向き電流 (SI)、3) 遅い外向き電流 (SO) の 3 種類のいずれかの電流応答が観察された (下図、逆三角印は 5-HT 投与のタイミングを示す)。

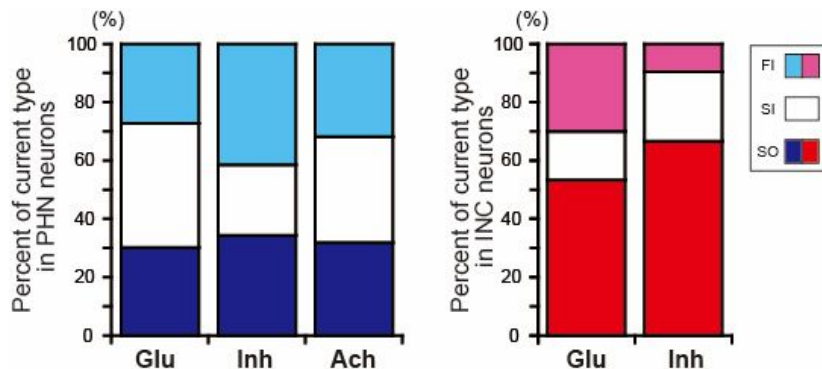


それぞれの電流について、5-HT 受容体の拮抗薬を用いた薬理的解析を行ったところ、FI は

ondansetron (10 μ M) によって阻害されたので、イオンチャネル共役型受容体の 5-HT₃ 受容体を介する応答、(2)と(3)の電流はそれぞれ ketanserin (1 μ M)と WAY100635 (0.5 μ M)によって阻害されたので、代謝型受容体である 5-HT₂ 受容体と 5-HT_{1A} 受容体を介する応答であった (右図上、阻害剤投与前後のトレース。濃い色のトレースは阻害剤投与後のものを示す。右図下、阻害剤投与前後の個々のニューロンの電流変化とその平均値 \pm SD を示したグラフ)。 (2)と(3)の電流やそれに関連する受容体については先行研究の知見を確認したものであったが、(1)の電流はこれまで PHN や INC において報告がなく、本研究により初めて明らかにされた。



これらの電流応答とトランスジェニックラットにより同定したニューロンタイプとの関係については、右図に示すように、PHN ではグルタミン酸作動性は SI を示す割合が高く、抑制性は他のニューロンに比べ FI の割合が高かった。一方、INC ではグルタミン酸作動性は SO の割合が高く、抑制性ニューロンも SO の割合が高かったが、FI の割合が非常に低かった。



(上図、PHN (左) と INC (右) のそれぞれのニューロンタイプにおける 3 種類の電流応答の割合を示したグラフ。Glu: グルタミン酸作動性、Inh: 抑制性、Ach: コリン作動性)。

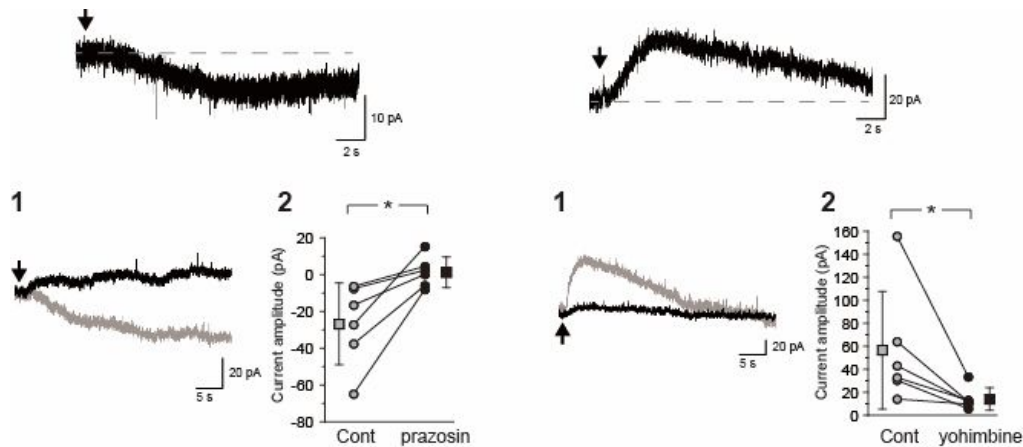
また、発火パターンの異なるニューロン間での 5-HT によって生じる電流応答を調べた結果、

PHN では一過性のバースト発火を示すタイプ (LTS) は主に SI を示し、発火頻度が低いタイプ (LFR) は主に SO を示し、はじめのスパイク感覚のみが広がるタイプ (FIL) は主に FI を示した。スパイク間隔がほぼ一定のタイプ (CON) とスパイクの発生が遅れるタイプ (LAT) では SI の割合が高く、イレギュラーな発火を示すタイプ (OSC) では SI を示さなかった。一方、INC では、LAT、LTS、FIL のほとんどは SO を示し、CON と OSC の半数以上は内向き電流 (SI または FI) を示した。

以上の結果から、5-HT によって生じる電流応答は神経伝達物質が異なるニューロン間や発火頻度の異なるニューロン間で異なっており、その違いは PHN と INC で異なっていた。これらの知見から、5-HT による投射は水平と垂直方向の視線制御に異なった修飾をしている可能性が示唆された。

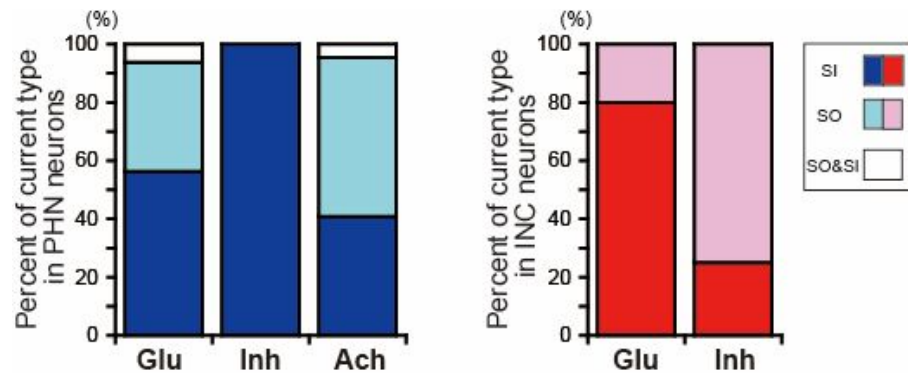
(2) NA によって生じる電流応答

PHN または INC ニューロンからホールセル記録を行い、NA を局所投与したところ、PHN と INC ともに、1) 遅い内向き電流 (SI) または 2) 遅い外向き電流 (SO) のいずれかの電流応答が観察された。さらに、SI と SO はそれぞれ prazosin (1 μ M) と yohimbine (1 μ M) でブロックされたことから、SI は α 1 アドレナリン受容体、SO は α 2 アドレナリン受容体を介した応答であることが明らかになった。(下図、印は NA 投与のタイミングを示す。1) α 1 または α 2 アドレナリン受容体の阻害剤投与前 (薄い色) と投与後 (濃い色) のトレースを示す。2) 阻害剤投与前後の個々のニューロンの電流変化とその平均値 \pm SD を示したグラフ)



これらの電流応答とトランスジェニックラットにより同定したニューロンタイプとの関係について調べたところ、下図に示すように、PHN ではグルタミン酸作動性やコリン作動性は SI と SO がほぼ半数ずつであったが、抑制性は全て SI を示した。一方、INC ではグルタミン酸作動性は SI の割合が低く、抑制性ニューロンは SO の割合が高かった。

(右図、PHN(左)と INC(右)のそれぞれのニューロンタイプにおける 2 種類の電流応答の割合を示したグラフ。Glu: グルタミン酸作動性、Inh: 抑制性、Ach: コリン作動性)

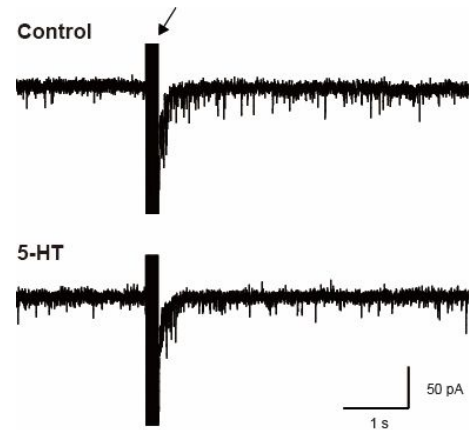


また、発火パターンの異なるニューロン間での NA によって生じる電流応答を調べた結果、PHN では OSC タイプは NA による電流応答を示さなかった。他のタイプは電流応答を示したが、発火頻度の低いタイプ (LFR) のほとんどが SO を示し、他のタイプは SI の割合が高かった (特に、LAT と FIL タイプの多数は SI を示した)。INC でも OSC タイプは NA による電流応答を示さなかった。また、CON と LAT タイプは SI の割合が高く、LTS タイプは SO の割合が高かった。INC の

FIL タイプでは SI と SO がほぼ等しかった。以上の結果から、5-HT と同様に、NA によって生じる電流応答は神経伝達物質が異なるニューロン間や発火頻度の異なるニューロン間で異なり、その違いも PHN と INC 間で異なっていた。このことから、NA は水平と垂直方向の視線制御に異なった修飾をしている可能性が示唆された

(3) 5-HT による興奮性ネットワークの修飾様式

PHN のニューロンからホールセル記録を行い近傍にバースト刺激 (右図矢印) を与えたところ、刺激前に比べ刺激後には自発性 EPSC の頻度が上昇し、その上昇が数秒にわたって続く「持続的 EPSC 応答」が PHN と INC 両方においてみられた (右図、上のトレース)。この状態で 10 μ M の 5-HT を含んだ外液を 5 分間還流したところ、刺激直後の EPSC 頻度が減少し、EPSC 頻度の上昇が短時間で消失した (右図、下のトレース)。このような 5-HT による持続的 EPSC 応答の抑制現象は INC においても観察された。



5-HT の局所投与に実験 (研究成果 (1)) により、5-HT に対し内向き電流 (興奮に働く) や外向き電流 (抑制に働く) を示すニューロンが観察された。しかし、今回の実験で 5-HT 投与により EPSC 頻度や持続的 EPSC 応答が抑制されたことから、5-HT によって外向き電流を示すニューロン、つまり、5-HT_{1A} 受容体を発現しているニューロンが持続的 EPSC 応答の基となる興奮性ネットワークに参画している可能性が示唆された。この可能性を検証するためには、5-HT を 5-HT_{1A} 受容体の拮抗薬である WAY100635 と共に投与することで持続的 EPSC 応答の抑制が阻害されるか、また、5-HT_{1A} 受容体の作動薬を投与することで 5-HT 投与したときと同様な現象がみられるのかを明らかにする必要がある。

本研究成果は下記の国際雑誌にて発表した。* は責任著者。

研究成果 (1)

Saito Y*, Sugimura T.

Serotonergic current responses of neurons in rat oculomotor neural integrators.
Journal of Neurophysiology 129: 399-409, 2023

研究成果 (2)

Saito Y*, Sugimura T.

Noradrenergic current responses of neurons in rat oculomotor neural integrators.
Journal of Neurophysiology 2024 in press

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Yasuhiko, Sugimura Taketoshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Serotonergic current responses of neurons in rat oculomotor neural integrators	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 399 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00452.2022	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 Kitano Koichi, Yamashita Akinori, Sugimura Taketoshi, Okayasu Tadao, Sakagami Masaharu, Osaki Daisuke, Kitahara Tadashi, Saito Yasuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Behavioral and Immunohistochemical Evidence for Suppressive Effects of Goshajinkigan on Salicylate-Induced Tinnitus in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 587 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci12050587	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 Sugawara Shiori, Nakaya Yuka, Matsumura Sachie, Hirose Kensuke, Saito Yasuhiko, Kaneko Ryosuke, Kobayashi Masayuki	4. 巻 506
2. 論文標題 Neural Subtype-dependent Cholinergic Modulation of Neural Activities by Activation of Muscarinic 2 Receptors and G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium Channel in Rat Periaqueductal Gray Neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2022.10.012	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 Okamura Kazuya, Yoshino Hiroki, Ogawa Yoichi, Yamamuro Kazuhiko, Kimoto Sohei, Yamaguchi Yasunari, Nishihata Yosuke, Ikehara Minobu, Makinodan Manabu, Saito Yasuhiko, Kishimoto Toshifumi	4. 巻 33
2. 論文標題 Juvenile social isolation immediately affects the synaptic activity and firing property of fast-spiking parvalbumin-expressing interneuron subtype in mouse medial prefrontal cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 3591 ~ 3606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhac294	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 Furuta Takanori, Nakagawa Ichiro, Yokoyama Shohei, Morisaki Yudai, Saito Yasuhiko, Nakase Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Melatonin-Induced Postconditioning Suppresses NMDA Receptor through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore via Melatonin Receptor in Mouse Neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3822 ~ 3822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23073822	査読の有無 無
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 Saito Yasuhiko, Sugimura Taketoshi	4. 巻 126
2. 論文標題 Distinct purinergic receptor-mediated currents of rat oculomotor integrator neurons characterized by different firing patterns	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00209.2021	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 Toritsuka Michihiro, Yoshino Hiroki, Makinodan Manabu, Ikawa Daisuke, Kimoto Sohei, Yamamuro Kazuhiko, Okamura Kazuya, Akamatsu Wado, Okada Yohei, Matsumoto Takuya, Hashimoto Kazumichi, Ogawa Yoichi, Saito Yasuhiko et al.	4. 巻 150
2. 論文標題 Developmental dysregulation of excitatory-to-inhibitory GABA-polarity switch may underlie schizophrenia pathology: A monozygotic-twin discordant case analysis in human iPS cell-derived neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105179 ~ 105179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2021.105179	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 Hirose Kensuke, Nakaya Yuka, Kitano Kohei, Saito Yasuhiko, Kaneko Ryosuke, Yanagawa Yuchio, Yamamoto Kiyofumi, Shirakawa Tetsuo, Kobayashi Masayuki	4. 巻 473
2. 論文標題 Differential regulation of medium spiny and cholinergic neurons in the nucleus accumbens core by the insular and medial prefrontal cortices in the rat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pflügers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1911 ~ 1924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-021-02634-y	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Taketoshi Sugimura, Yasuhiko Saito
2. 発表標題 Indirect pathway from the rat interstitial nucleus of Cajal to the vestibulo-cerebellum
3. 学会等名 日本生理学会100回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Minobu Ikehara, Kazuhiko Yamamuro, Yuki Noriyama, Yasuhiko Saito, Manabu Makinodan
2. 発表標題 Effects of neuromodulation on local prefrontal circuits and the relevant behaviors in mice.
3. 学会等名 日本生理学会100回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤康彦
2. 発表標題 「視線保持のメカニズムからめまいの原因を紐解く」 - 神経積分器における興奮性回路の活性化機構について -
3. 学会等名 第81回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taketoshi Sugimura, Yasuhiko Saito
2. 発表標題 Indirect connection from the rat interstitial nucleus of Cajal to the vestibulo-cerebellum revealed by trans-synaptic tracing
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良県立医科大学 生理学第一講座ホームページ 業績欄
<https://www.naramed-u.ac.jp/~1phy/company.html>

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	杉村 岳俊 (Sugimura Taketoshi) (60812526)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	

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
---------	---------