

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650160

研究課題名(和文) 垂直眼球運動系の速度 位置変換に関するニューロン・シナプス特性

研究課題名(英文) Membrane and synaptic properties of neurons that are involved in the velocity-position transformation in the vertical eye movement system

研究代表者

齋藤 康彦 (Saito, Yasuhiko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70290913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：垂直系の視線制御に関与するカハール間質核(INC)のニューロン特性を明らかにするため、ラットのスライス標本においてINCニューロンからホールセル記録を行い、発火パターンなどの電気生理学的特性を調べた。さらに、INCニューロンから得られた知見を過去に水平系の視線制御に関与する舌下神経前位核(PHN)において得られた知見と比較した。その結果、INCニューロンで観察された発火パターンなどの種類はPHNニューロンのものとほぼ同じであったが、それらの特性をもとに分類したニューロンの分布は異なっていた。以上の結果から、視線制御に関与するニューロン群は水平系と垂直系では異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To characterize neurons in the interstitial nucleus of Cajal (INC) that is involved in controlling vertical gaze, we investigated the electrophysiological properties such as firing pattern of INC neurons using whole-cell recordings in rat slice preparations. Furthermore, we compared the findings obtained from INC neurons to those previously obtained from neurons in the prepositus hypoglossi nucleus that is involved in controlling horizontal gaze. We found that the electrophysiological properties of INC neurons were similar to those of PHN neurons; however, the overall distribution of INC neurons that were classified based on the properties was different from that of PHN neurons. These findings suggest that the neuronal population involved in the gaze control is different between the horizontal and vertical system.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経生理学 視線制御 神経積分器 パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

視覚を適切に働かせるためには、視線をコントロールして視覚対象を網膜上で静止させる必要がある。そのため、眼を動かす筋肉（外眼筋）を支配する運動ニューロン（外眼筋運動ニューロン）は視線保持のために眼球位置信号をもつ。しかし、眼球運動の発現に関与し外眼筋運動ニューロンへ投射している脳幹ニューロンは速度信号を持つ。従って、脳幹ニューロンから外眼筋運動ニューロンへ信号が伝えられる間に速度信号を位置信号へ変換(積分)する機構が必要であり、この機構は神経積分器と呼ばれている。

眼球運動の生成に関わる情報は、上丘や前庭神経核などを経て、水平方向の眼球運動に関する情報と垂直方向に関する情報がそれぞれ別々の脳幹領域（傍正中橋網様体と内側縦束吻側間質核）に送られ、処理される。それに伴うように神経積分器に関わる領域も水平系と垂直系で異なっており、舌下神経前位核 (Prepositus Hypoglossi Nucleus, 以下 PHN と略す) とカハール間質核 (Interstitial Nucleus of Cajal, 以下 INC と略す) がそれぞれの主な領域であることが示されている。

神経積分器については様々なモデルによる理論的考察が行われているが、生体内での実体は明らかでない。実体の解明には、神経積分器の基盤となるニューロンや神経回路の構造や特性に関する基本的情報が必要不可欠である。PHN では最近の *in vitro* 研究の進展によりニューロン特性などの知見が蓄積されつつあり、我々もラットのスライス標本においてホールセル記録を行い、PHN ニューロンの電気生理学的膜特性や特定のスパイク発生様式（発火パターン）に関するイオンチャネルなどを明らかにしてきた (Shino et al., *Eur J Neurosci* 27: 2413-2424, 2008, Shino et al., *Neuroscience* 197: 89-98, 2011)。一方、INC に関しては、これまで *in vitro* の研究が遂行されておらず、そのため、神経回路特性はおろかニューロン特性に関しても全く知見が得られていない。

PHN と INC はともに神経積分器の機能があることから、PHN で得られた知見をそのまま INC へ適用できるのであれば問題はないが、脳幹ニューロンから外眼筋の運動ニューロンへ至る神経伝達経路は水平系に比べると垂直系のほうが複雑であり（垂直系には回旋運動も含まれることが理由の一つである）、垂直眼球運動に関わる神経回路については未だ解明されていないことが多いなどの理由で、その適用が疑問視される。従って、INC に関する知見も独自に作り上げる必要がある。一方で、水平系と垂直系の違いはあれども、同じ機能が脳内での異なる領域に分散されているのは眼球運動系での情報処理シス

テムの特徴である。この特徴を利用して、PHN と INC に共通なニューロン特性やシナプス伝達特性、さらには両者の間で異なる特性を浮き彫りにできれば、神経積分器の研究を PHN のみに絞って進めるよりも相乗効果が見込め、神経積分器の実体解明へ向けてさらに大きな成果が得られることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、INC ニューロンからホールセル記録を行い、そのニューロンに特徴的な電気生理学的膜特性を明らかにするとともに、これまで我々が見出した PHN ニューロンに関する知見と比較することにより、両者の違いや共通点を明らかにし、神経積分器の実体解明に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

生後約3週齢のラットを用いて INC を含む脳幹スライス標本作製する。バイオサイチンを充填したパッチ電極を用いて INC 内に存在するニューロンからホールセル記録を行い、電流通電によって生じる電位応答を調べる。活動電位発生後に生じるスパイク後過分極 (afterhyperpolarization, 以下 AHP と略す) と発火パターンの特徴を明らかにし、INC には何種類の AHP や発火パターンがみられるのかを明らかにする。さらに、AHP 特性や発火パターンによって特定されたニューロンの分布を調べ、多くの INC ニューロンにみられる AHP 特性や発火パターンを明らかにする。電気生理学的実験終了の後、スライスを固定液に浸して固定し、数日後、細胞内注入したバイオサイチンを DAB によって可視化し、記録したニューロン形態を観察する。ニューロン形態については、INC 内における樹状突起の広がりや軸索の走行、分枝様式に注目して解析を行う。

これまでの PHN についての研究では、Wild-type ラットを用いて PHN ニューロン全体の分布を調べるとともに、抑制性ニューロンが小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) プロモーターのもとで Venus という黄色の蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックラット (VGAT-Venus ラット) を用いて抑制性ニューロンに限定した分布も調べてきた。そこで今回の研究においても、Wild-type ラットと VGAT-Venus ラットを用いて、INC ニューロン全体の分布と抑制性ニューロンの分布について明らかにする。

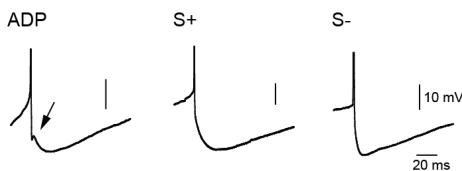
4. 研究成果

(1) INC ニューロンの膜特性

Wild-type ラットからスライス標本作製し、INC に存在するニューロンを任意に選

ホールセル記録を行った。電流通電によって生じる電位応答から AHP 特性や発火パターンを調べた結果、INC ニューロンでは図 1 に示すように AHP は、遅い成分の前にスパイク後脱分極 (afterdepolarization) がみられるタイプ (ADP)、遅い成分のみがみられるタイプ (S+)、速い成分のみのタイプ (S-) の 3 種類に分類され、発火パターンは、スパイク間隔がほぼ一定のタイプ (CON)、スパイクの発生が遅れるタイプ (LAT)、低閾値スパイクがみられるタイプ (LTS)、初めのスパイク間隔のみが広いタイプ (FIL)、スパイクの発生が揺らぐタイプ (OSC) の 5 種類に分けられることが明らかになった。3 種類の AHP と 5 種類の発火パターンは PHN においても観察されるが、PHN においてはさらにもう 1 種類、発火頻度が低いタイプの発火パターン (LFR) がみられる。逆に言うと、LFR タイプは INC では見られないタイプである。

AHP profiles



Firing patterns

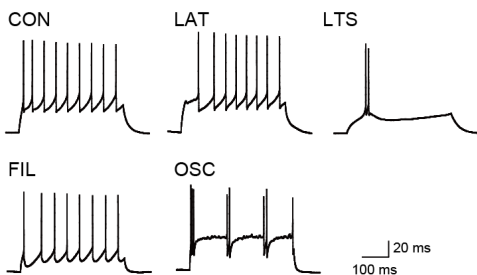


図 1 .INC ニューロンの AHP 特性と発火パターン

記録された INC ニューロン (n = 120) を AHP 特性と発火パターンをもとに分類すると図 2 の上段のようになった。75% 以上の INC ニューロンが ADP タイプを示し、LAT と FIL

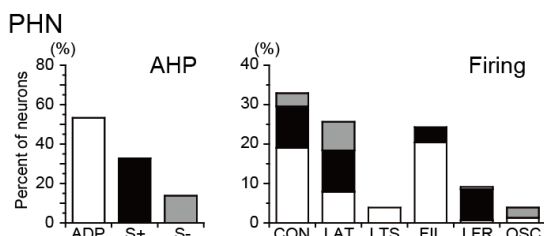
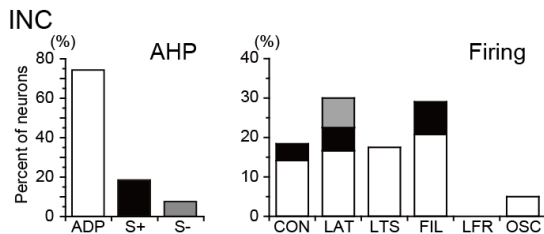


図 2 .INC と PHN のニューロン分布

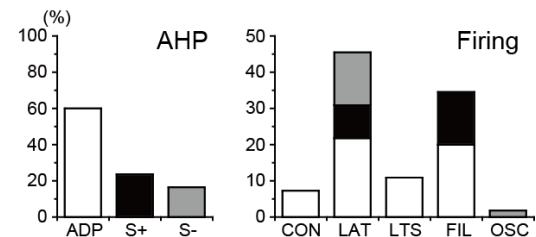
タイプを示すニューロンの割合が多いことが明らかになった。過去に得られた PHN ニューロンについてのデータ (n = 152, Shino et al, 2008) を同様なグラフに表すと図 2 の下段のようになる。上下のグラフを比べると、INC と PHN とともに ADP タイプの割合が高いが、その割合は INC の方が PHN よりも高いことが分かった。また、発火パターンについては先に述べたとおり INC では LFR タイプがみられないのに加え、LTS タイプの割合が PHN に比べて高いことが分かった。

以上のように、INC と PHN のニューロンでは、AHP 特性や発火パターンの種類はほぼ同じであったが、それらを示すニューロンの分布に違いがあることが明らかになった。

(2) INC の抑制性ニューロンの膜特性

VGAT-Venus ラットからスライス標本作製し、蛍光顕微鏡下で蛍光を発するニューロンを同定し、ホールセル記録を行った。上記の研究と同様に AHP 特性や発火パターンを調べた結果、Venus を発現するニューロン (Venus+ ニューロン、n = 55) は 3 種類の AHP 特性と 5 種類の発火パターンのすべてを示した。Venus+ ニューロンの AHP 特性と発火パターンによるニューロン分布 (図 3、上段) を見ると、ADP タイプの割合が INC ニューロン全体 (図 2、上段) に比べ低いことが分かった。また、発火パターンについては、Venus+ ニューロンでは CON の割合が低いことが分かった。この実験において、Venus を発現していないニューロン (Venus- ニューロン、n = 55) についてもホールセル記録を行い (図 3、下段) AHP 特性と発火パターンを調べた結果、ADP タイプの割合が非常に高く、CON タイプのニューロンの割合が LAT タイプに匹敵することが分かった。

Venus+



Venus-

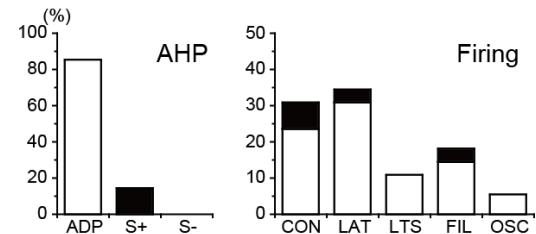


図 3 . Venus+ニューロンと Venus-ニューロンの分布

INC の Venus+および Venus- ニューロンの分布を PHN でのそれらの分布 (Shino et al, 2011) と比較すると、Venus+ ニューロンの AHP の特性は INC と PHN でほぼ同様であったのに対し、INC では Venus- ニューロンの 80%以上が ADP タイプであるのに対し、PHN では S+タイプの割合が高く(60%)、ADP タイプは 38%であった。発火パターンについては、INC と PHN とともに Venus+ ニューロンでは LAT タイプの割合が高いが、INC では FIL タイプの割合は PHN に比べ高かった。Venus-ニューロンでは LAT タイプの割合は INC の方が PHN より高かった。

以上の結果から、Venus+ ニューロンすなわち抑制性ニューロンにおいて、LAT タイプの割合が高いという点で INC と PHN に共通の特徴がみられるものの、全体的には抑制性ニューロンの分布においても INC と PHN では異なっていることが明らかになった。

結語

今回の研究において INC ニューロンの電気生理学的膜特性が初めて明らかになった。過去に得られた PHN での知見と比較すると、INC ニューロンでみられる AHP 特性や発火パターンは PHN でみられるタイプとほぼ同じであるが、それらの特性をもとに分類されたニューロン分布は INC と PHN では異なっていた。このことは INC と PHN では神経積分のストラテジーが異なっている可能性が挙げられる。しかし、今回記録したニューロンのすべてが神経積分器に關与するニューロンとは断言できないため、神経積分器に關与するものに限れば共通のニューロン群が同定できるかもしれない。この点については今後の研究において明らかにしていくつもりである。

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 2 件)

Zhang Y, Kaneko R, Yanagawa Y, and Saito Y. The vestibulo- and preposito-cerebellar cholinergic neurons of a ChAT-tdTomato transgenic rat exhibit heterogeneous firing properties and the expression of various neurotransmitter receptors. European Journal of Neuroscience 39: 1294-1313, 2014. 査読有

Saito Y and Yanagawa Y. Ca²⁺-activated ion currents triggered by ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release control the firing of inhibitory neurons in the prepositus hypoglossi nucleus. Journal of Neurophysiology 109:

389-404, 2013. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

http://genbehavneuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/Yanagawa_Lab/Home.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 康彦 (SAITO YASUHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70290913