

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890023

研究課題名(和文) 大脳皮質抑制性神経回路の秩序構造の解明

研究課題名(英文) Ordered Structure of Inhibitory Circuits in Neocortical Layer 5

研究代表者

酒井 誠一郎(Sakai, Seiichiro)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40709747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：大脳新皮質からの出力を担う5層の興奮性ニューロンは縦一列に並んでマイクロカラムを形成しており、マイクロカラムが皮質情報処理の単位である可能性が提唱されていた。本研究では、抑制性ニューロンがこの神経回路の機能をどのように調節しているのか明らかにするため、皮質5層の抑制性神経回路構造の規則性を調べた。ニューロンの配列構造およびシナプス結合規則を解析した結果、抑制性ニューロンに規則的な神経回路構造は見られなかった。その一方で、マイクロカラムを構成する細胞の種類とマイクロカラム配列の周期性が明らかとなり、皮質情報処理の基盤となる神経回路構造の理解が進んだ。

研究成果の概要(英文)：Subcerebral projection neurons (SCPns) are a major subtype of principal cells in neocortical layer 5, which project axons to subcortical targets. We previously reported that SCPns form periodic columnar clusters termed microcolumns. The microcolumns would behave as functional units in layer 5. It has not been known whether inhibitory neurons (INs) in layer 5 have orderly cell configuration related to the microcolumns. We conducted three-dimensional analysis of the cell configuration and analyzed synaptic connections between SCPns and INs. INs are very sparse and do not show specific configuration patterns or specific connection patterns. On the other hand, cell type specificity and periodic arrangement of the microcolumns were revealed by these experiments.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳新皮質 抑制性ニューロン 局所神経回路 電気生理学 組織学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 大脳新皮質のニューロンは複雑な神経回路網を形成しているが、単純な局所神経回路 (=機能単位) の繰り返しによって皮質回路が構成されており、機能単位の並列情報処理によって皮質機能が実現されている可能性が考えられる。

(2) 皮質5層から橋や上丘等の脳領域、あるいは脊髄に投射する皮質下投射ニューロン (SCPN) は、皮質からの情報出力を担う主要な興奮性ニューロンである。先行研究において、SCPNが縦一列に並んだマイクロカラム構造を構成しており、マイクロカラムが皮質の様々な領野で周期的に配列していることが報告していた。また、神経活動依存的に発現量が増加する c-Fos タンパク質の発現を解析したところ、視覚刺激を行った際にマイクロカラム単位で c-Fos の発現が見られるという研究結果も報告していた (図1; Maruoka et al., *J. Neurosci.* 2011)。この研究結果から、同一マイクロカラムの SCPN が共通の感覚入力を受け取っていることが示唆され、周期的に並んだマイクロカラムが皮質の普遍的な機能単位であり、マイクロカラムの並列情報処理によって皮質の高次脳機能が実現されている可能性を提唱していた。

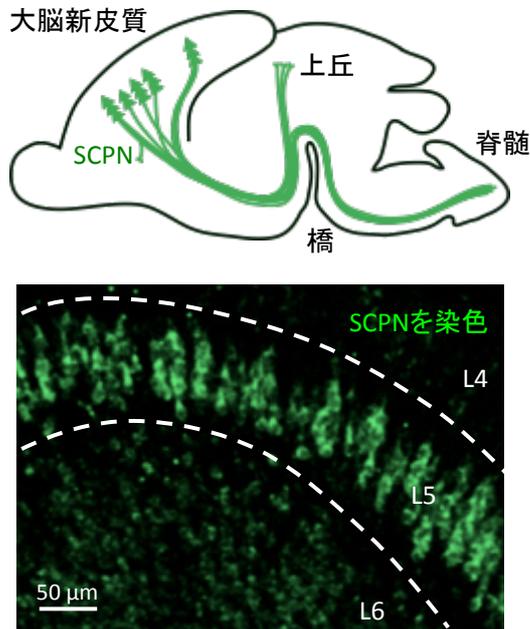


図1 SCPNマイクロカラム

(3) 大脳新皮質の抑制性ニューロンは、形態的および電気生理的特徴の異なる多様な細胞タイプが存在する。皮質の抑制性ニューロンは局所神経回路の活動を調節しており、細胞タイプごとにその機能的役割が異なると思われる。

(4) 皮質の抑制性ニューロンは周囲の興奮性ニューロンを非選択的に抑制しており、局所神経回路全体の活動を調節しているとする研究がある一方で、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンが特定の細胞位置関係にあるという報告もある。抑制性ニューロンが規則的な神経回路を形成しているのかは、依然として議論のある問題であった。

## 2. 研究の目的

(1) 大脳新皮質の機能単位であると考えられるマイクロカラムの神経活動も抑制性ニューロンによって調節されていると考えられる。マイクロカラムが非常に規則的な構造を有しているため、その機能を調節する抑制性神経回路にも規則的な構造が存在する可能性が考えられる。

(2) マイクロカラムの神経活動を抑制性ニューロンがどのように制御しているのか明らかにする上で、抑制性ニューロンとマイクロカラムの構造的な関係性を明らかにすることがまず重要である。そこで本研究課題では、皮質5層の抑制性ニューロンがマイクロカラムの周期構造に対応した規則的な神経回路を形成しているのか検証した。

(3) マイクロカラムは皮質の機能単位であり、マイクロカラムの並列情報処理によって皮質機能が実現されていると考えられる。機能単位における情報処理を調節している抑制性ニューロンの役割が明らかになることで、皮質機能の理解が進むと期待される。また、皮質の興奮/抑制の活動バランスが自閉症や統合失調症に関わっているという説が提唱されており、皮質抑制性神経回路の機能解明がこれら疾患の病態解明や治療法開発に貢献することも期待される。

## 3. 研究の方法

(1) マウスの橋または大脳新皮質に逆行性神経トレーサーを注入することで、特定の脳部位に軸索投射する興奮性ニューロンを特異的に蛍光標識した。抑制性ニューロンは細胞タイプによって発現タンパク質が異なるため、遺伝子組換えマウスを用いて細胞タイプ特異的に蛍光タンパク質を発現させ標識した。パラホルムアルデヒドで還流固定した脳標本を高濃度のフルクトース溶液に浸けることで透明化し (SeeDB 法)、二光子顕微鏡を用いて運動野・体勢感覚野・視覚野を含む大脳新皮質広範囲を観察した。蛍光ラベルされた細胞の3次元座標を二光子顕微鏡画像から取得し、細胞タイプごとの相対位置関係を解析した。

(2) マウス皮質急性スライス標本を作製し、ホールセルパッチクランプ法によりシナプス後電流の記録を行った。興奮性ニューロンは逆行性神経トレーサーを用いて、抑制性ニューロンは遺伝子組換えマウスを用いて蛍光標識した。ダブルパッチクランプによって特定の細胞タイプ間のシナプス後電流の大きさやシナプス結合の空間分布、およびパッチクランプ記録を行ったニューロンの電気生理的特性を解析した。

(3) アデノ随伴ウイルスベクターを用いてカルシウム感受性蛍光タンパク質 G-CaMP を皮質5層のニューロンに発現させ、二光子顕微鏡で *in vivo* 神経活動の観察を行った。自発的な神経活動パターンおよび視覚刺激を行った際の神経活動パターンを解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 先行研究においては脳の薄切標本を用いてマイクロカラムの構造を解析していたので、皮質の層内におけるマイクロカラム配列の2次元周期性は調べることができていなかった。そこで本研究課題では、透明化脳標本を用いてマイクロカラム構造を3次元で解析することにより、マイクロカラム配列の2次元周期性を明らかにした。マイクロカラムは、視覚野・体性感覚野・運動野を含む広い皮質領野に普遍的に見られ、いずれも細胞1個単位の幅で SCPN が縦一列に並んでいた。また、多くの皮質領野で、マイクロカラムが30-40  $\mu\text{m}$  間隔で周期的に配列しているのが観察された (図2)。マイクロカラムの2次元周期配列は、マイクロカラム間の機能的な結合や皮質情報処理の高次機能単位の構造を反映している可能性も考えられる。マイクロカラムの2次元周期構造と皮質情報処理の関連性が今後の研究で明らかになり、皮質機能の理解がより一層進むと期待される。

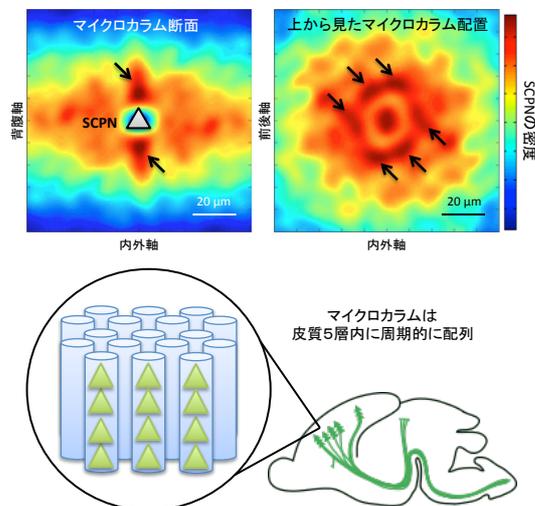


図2 マイクロカラムの3次元構造解析

(2) マイクロカラムを機能単位とした情報処理の様式を解明する上で、周囲に存在する他のタイプのニューロンとマイクロカラムの関係性を明らかにすることが重要である。皮質5層の SCPN 以外の興奮性ニューロンとしては、皮質間投射を行う脳梁投射ニューロン (CPN) が存在する。この細胞タイプの細胞配置規則性に関してはこれまで研究がなされていなかった。本研究課題では、CPN が規則的な細胞配置をとるか、また、SCPN のマイクロカラム構造と関連性について調べた。CPN の細胞配置規則性を解析したところ、SCPN のような明瞭なカラム構造はみられなかった。また、SCPN と CPN の相対位置関係を解析した結果、CPN は SCPN のマイクロカラムからは排除されており、皮質5層においてマイクロカラム間を埋める配置で細胞体が存在することが明らかになった。この結果は、SCPN と CPN は異なる機能単位を構成している可能性、あるいは CPN はマイクロカラム間の情報伝達を担っている可能性を示しており、皮質5層情報処理の基本様式を予測する上で示唆に富む情報が得られた。

(3) 発現タンパク質による抑制性ニューロンの分類において、パルバルブミン (PV) 陽性抑制性ニューロンおよびソマトスタチン (SOM) 陽性抑制性ニューロンが皮質5層に存在する主要な抑制性ニューロンである。これら主要な抑制性ニューロンの細胞配置を解析した結果、いずれの抑制性ニューロンも細胞密度が低く、特定の規則的な細胞配置は見られなかった。

(4) 抑制性シナプス結合の空間的な分布とマイクロカラム構造との関係性を解析した。これまでの報告にあった通り抑制性シナプスの密度は高く、周囲の SCPN と高い確率でシナプス結合が見られた。また、抑制性シナプス後電流の大きさにも特定の規則性は見られず、抑制性神経回路にマイクロカラムと関連する規則的な神経回路構造は見いだされなかった。

(5) マイクロカラムの SCPN が *in vivo* においてどのような神経活動を示すのか明らかにするため、*in vivo* カルシウムイメージングによる活動計測および *in vivo* パッチクランプの実験系を立ち上げた。本研究課題の研究対象である抑制性ニューロンとマイクロカラムの活動の関連性の解析には研究期間内に至らなかったが、今後この実験系を用いて抑制性ニューロンとマイクロカラムの活動関連性の解析を進める予定である。

(6) 本研究課題では、皮質5層に存在するマイクロカラムとの関連性に注目して、抑制性ニューロンが規則的な神経回路を形成しているか解析を行った。抑制性神経回路構造の規則性に関しては、規則的な神経回路構造は

見いだされなかった。In vivo の神経活動など十分な解析が行えていない部分もあるので、マイクロカラムと抑制性ニューロンの関連性に関して引き続き研究を進める予定である。一方で、マイクロカラムの3次元構造解析では、マイクロカラムの2次元周期性と細胞タイプ特異性が明らかになった。今後、この研究結果に基づいて構造と機能の関連性の解析を進めることで、マイクロカラムにおける情報処理の詳細が明らかになると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計7件)

- ① 酒井 誠一郎、細谷 俊彦、大脳新皮質5層マイクロカラムの3次元構造解析、新学術領域研究「メソスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」平成26年度第1回領域班会議、2014年9月29日、静岡県熱海市
- ② 酒井 誠一郎、細谷 俊彦、大脳新皮質5層における規則的な細胞配置の3次元解析、第37回日本神経科学学会大会、2014年9月12日、神奈川県横浜市
- ③ 丸岡 久人、米田 泰輔、酒井 誠一郎、中川 直、佐伯 麻衣、細谷 俊彦、覚醒マウスにおける大脳皮質深層からのカルシウムイメージング、第37回日本神経科学学会大会、2014年9月11日、神奈川県横浜市
- ④ 米田 泰輔、丸岡 久人、酒井 誠一郎、中川 直、細谷 俊彦、マウス一次視覚野5層ニューロンからの慢性2光子イメージング、第37回日本神経科学学会大会、2014年9月13日、神奈川県横浜市
- ⑤ 酒井 誠一郎、細谷 俊彦、透明化脳標本の細胞配置3次元解析、第6回光操作研究会、2014年8月21日、宮城県仙台市
- ⑥ 酒井 誠一郎、大脳新皮質の構造-機能ユニットの探索:マイクロカラムの3次元構造解析、第3回東北脳科学ウィンタースクール、2014年2月15日、宮城県大崎市
- ⑦ 酒井 誠一郎、細谷 俊彦、大脳新皮質5層における規則的細胞配置の3次元解析、新学術領域研究「メソスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」平成25年度第1回領域班会議、2013年9月21日、静岡県熱海市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井 誠一郎 (SAKAI Seiichiro)  
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員  
研究者番号: 40709747