

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

光操作による情動行動を担う脳リズム回路の解明

研究代表者 向井 秀夫 (医学部 生化学)

緒言

情動はコミュニケーションの基礎であり、情動障害は人が『よく生きる』のに必要なコミュニケーションに重大な問題をもたらす。情動を司る脳部位は、主として大脳皮質下のより古い領域であると考えられている。皮質下の領域は重要であるにも関わらず、回路実体も機能的構造についても解明は著しく立ち遅れている。

脳の神経回路の状態に応じて変化し、回路内あるいは回路間の神経細胞同士の有効な連絡を組織するメカニズムとしてリズム活動が挙げられる。脳においてリズム活動は、マクロレベルでは脳波活動、ミクロレベルでは個々の神経細胞においても観察される。リズム活動の生理的な機能として、シナプスにおける可塑的な変化の促進が挙げられる。本研究課題は、扁桃体の情動神経リズム回路の実体的解明を光遺伝学という新たな操作技術を用いることを長期的ゴールを目指したものであるが、本研究期間においては、そのための基礎づくりとして、扁桃体のリズム生成機構に着目し解析を行った。研究代表者らはこれまでに、情動の中心である扁桃体においてロバストナリズム (0.5 ~ 1 Hz) を見出し、これがドーパミンにより制御されることを示している (Oshiro, et al. *Neuropharmacology* 2011)。

扁桃体は側頭葉の内側に位置し、アーモンド (扁桃) のような形状をした脳部位である (図1)。扁桃体は恐怖や不安に関する記憶の傷害であるパニック障害やPTSD、負の情動記憶の影響が考えられるうつ病といった精神疾患の発生メカニズムに関与している可能性が考えられている。負の情動と扁桃体との関連について多くの研究が行われているが、正の情動にも関わっていることも明らかとなっている。

扁桃体が情動的記憶や学習に対して影響を及ぼすよく知られた例としては、恐怖条件付け学習がある。動物に対し、単独で恐怖反応をひき起すショック (無条件刺激) を、音のような直接的に情動に影響を

与えない中立な刺激 (条件刺激) と組み合わせて与え続けると、中立的な刺激であった条件刺激単独に対しても恐怖反応 (血圧の上昇・頻脈など) を示すようになる。恐怖条件付けの成立に伴い扁桃体神経細胞シナプスで長期増強 (Long Term Potentiation: LTP) が形成される。恐怖条件付け学習は動物だけでなくヒトにおいても成立することが示されている。

別の有名な例としてKlüver-Bucy症候群が挙げられる。扁桃体を含む側頭葉に両側性に障害を与えられたサルは、精神盲情動反応の低下・性行動の亢進といった情動状態の変調を示すことが知られている。

以上のように扁桃体は情動的学習・記憶に深く関与しているということ、脳のリズム活動はシナプスの可塑的な変化の促進に関わっていることから、扁桃体におけるリズム活動の生理学的な機能として情動による記憶の固定や促進が強く示唆されている。

扁桃体をさらに詳しく解剖学的に見ると多くの核が存在する。本研究で着目した基底外側核 (BLA) の細胞種は大脳皮質に似た二種類に大別され、大多数 (~ 80%) を占めるグルタミン酸作動性の錐体神経細胞と、残りの (~ 20%) GABA作動性の介在神経細胞

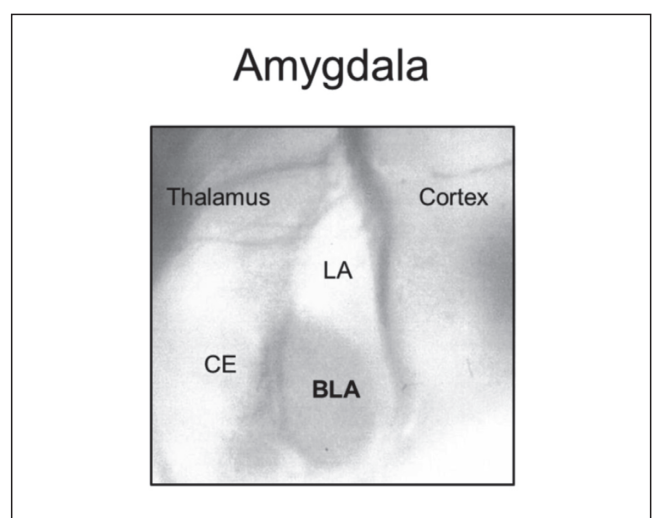


図1.

胞に分類される。錐体神経細胞の軸索はBLA内外の神経細胞に対して投射が見られる一方、GABA作動性の介在神経細胞は局所神経回路の制御において重要な役割を果たしている。

ラット扁桃体基底外側核の錐体神経細胞よりホールセルパッチ記録を行うと、自発的、周期的(0.5～1 Hz程度)振幅の大きい抑制性シナプス後電位/電流(inhibitory postsynaptic potentials/currents; IPSP/Cs)が観察される(抑制性ネットワークリズム)。

このような扁桃体リズムは上述のように生理学的に重要な機能が想定され、かつ疾患との関連も考えられる重要性にも関わらず、その生成機構や神経伝達物質による調節機構については(一部が解明されつつあるものの)、依然として多くの点が不明である。

扁桃体におけるリズム生成メカニズムを明らかにするためには、シナプスレベルでの解析が容易な*in vitro*脳スライス標本を用いたパッチクランプ記録法を用いることが将来の光操作における基礎的な知見の蓄積にとっても有効であると考えられる。

そこで本研究は、扁桃体を含む脳スライス標本においてリズム神経活動が報告されている基底外側核(BLA)錐体神経細胞よりホールセルパッチクランプ法を用いて記録を行い、神経修飾物質によるリズム調節作用、またリズム生成に関与すると思われるイオンチャンネルの作用をシナプスレベルで明らかにすることを目的とした。さらに、リズムの制御において重要な役割を果たすと考えられる介在神経細胞の種類を明らかにするため、介在神経細胞を蛍光タンパク質を用いて可視化した遺伝子改変動物を用い、介在神経細胞からの直接記録を試みた。

材料と方法

すべての実験は埼玉医科大学動物実験指針に従い、埼玉医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。実験動物の使用数は必要最小限となるよう努めた。

実験動物には10～19日齢の両性VGAT-Venusラット(群馬大学大学院・医学系研究科・遺伝発達行動学教室の柳川右千夫教授より供与)を用いた。このVGAT-Venusラットは、介在神経細胞に黄色蛍光タンパク質の一種であるVenusを発現させ可視化し、介在神経細胞より選択的に記録を行うことを容易にした遺伝子改変ラットである。

ラットの麻酔はイソフルランを気化させた麻酔ガスにより行った。反射の消失を確認したのちに断頭を行い、脳を損傷しないようできる限り素早く脳を摘出した。脳は直ちに95% O₂ / 5% CO₂混合ガスで飽和した氷冷Na-Choline Chloride置換液中で冷却したのち、ろ紙上に移し中脳よりも前の部分を冠状断で除いた。続いてスライサーのチャンバー上に脳を固定し、チャンバー内を95% O₂ / 5% CO₂混合ガスに

て飽和した氷冷Na-Choline Chloride置換液で満たし、扁桃体を含む冠状断脳スライス(厚さ400 μm)標本を作成した。スライスはさらに左右に切断し、人工脳脊髄液(aCSF: artificial cerebrospinal fluid; 組成: 120 mM NaCl, 3 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 15 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂)を回復液として、95% O₂ / 5% CO₂混合ガスで満たされたチャンバー内にて室温で1時間以上静置した。その後スライスを正立型顕微鏡のステージ上のチャンバーへ移し、IR-CCDカメラを通じて細胞体を確認しながらホールセルパッチ記録を行った。記録中は95% O₂ / 5% CO₂混合ガスで飽和した人工脳脊髄液を34～35℃に保って灌流した。記録電極はガラスキャピラリーを電極プレーで加熱して作成、電極抵抗は3～5 MΩ程度とした。電極内液の組成は以下の通り: 150 mM K-methanesulfonate, 5 mM KCl, 0.1 mM K-EGTA, 5 mM Na-HEPES, 3 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na-GTP (pH = 7.4)。

神経細胞からの記録は基底外側核(BLA)より行った。パッチクランプアンプ(Axon Instruments: Axopatch 200B)を用いて膜電位および膜電流を測定し、データはADコンバータ(Axon Instruments: Digidata 1322A)を介してコンピュータへ送信しソフトウェアを用いて取り込んだ。

錐体細胞の同定は、大きな細胞体、錐体様の形状、電気生理学的性質によって行った。実際にBL錐体神経細胞で観察された脱分極パルス刺激により生じる特徴的な発火パターン(時間経過と共に発火頻度が低下するパターン)は、先行研究によって示されている特徴とよく一致した。本研究に用いた灌流液・電極内液の条件において、電位を-45 mVに固定することで、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス後電流(EPSC: excitatory post-synaptic current)は内向き電流として、GABA_A受容体を介した抑制性シナプス後電流(IPSC: inhibitory post-synaptic current)は外向き電流として測定されるようにした。

GABA作動性介在神経細胞は、軸索終末から神経伝達物質としてGABA(ガンマ-アミノ酪酸)を放出し出力先の細胞に対して抑制性の伝達を行う。扁桃体においてVenusによる蛍光を持つ細胞がGABA作動性介在神経細胞であることは以前に確認されている。介在神経細胞の同定は、Venusによる蛍光および錐体神経細胞の場合と同様に、脱分極パルス刺激(240 pA, 700 ms)によって生じる発火パターン(Burst/Stutter/Regular/Fast firing)を用いて行った。

結果

扁桃体基底外側核錐体神経細胞からホールセルパッチクランプ法を用いて記録を行うと、複数のIPSCが同期して入力し、積み重なった“Composite IPSC”が

見られた(図2, 図3左). この巨大複合 IPSCは自発的かつ周期的に生じており, 記録時間中を通して(約1~2時間) 0.5~1 Hz程度の頻度で安定して記録された.

記録を行った錐体神経細胞に対するカルバコール(CA)の直接作用を観察したところ, 固定電位(-45 mV)においてCA(10 μM)を灌流することによって, 巨大複合 IPSCが非同期状態に分解することが見出された(図3右). さらにこの後CAの入っていない灌流液で10分間程度CAを洗い流すことによってほぼ完全に巨大複合 IPSCが回復することが判明した.

次に, T型Ca²⁺チャンネルの阻害剤であるmibefradil(20 μM)(図4)とNNC55-396(50 μM)を用いて, 錐体神経細胞のIPSCリズムにおける影響を見た. 2つの阻害剤はリズムの振幅には大きな影響を与えない一方, 振動数を減少させた.

最後に, GABA作動性介在神経細胞の種類を直接ホールセルパッチクランプを行って同定した. 脱分極パルス(240 pA, 700 ms)を加えた時の応答(図5)によって分類を行うと, 12細胞中Regular-firing細胞7個,

Burst-firing, Stutter-firing, Fast-firingが各1個, いずれにも当てはまらない細胞が2個であった(表1).

考 察

我々の研究を含む知見から, 扁桃体の抑制性リズムの発生機構の候補としては, まずGABA作動性の介在神経細胞に対してグルタミン酸作動性の興奮性入力 がされ, 介在神経細胞において周期的な活動電位が生じることで抑制性の神経伝達物質であるGABAの周期的な放出が生じ, それが錐体神経細胞へと伝達

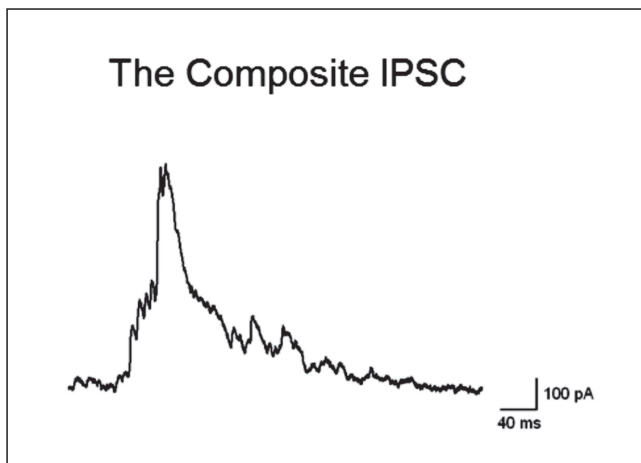


図 2.

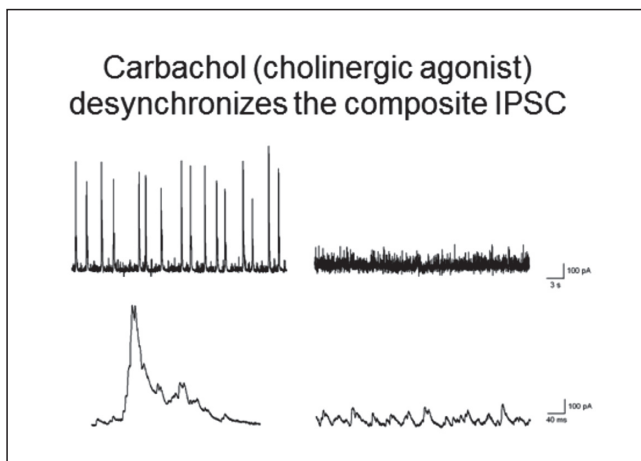


図 3.

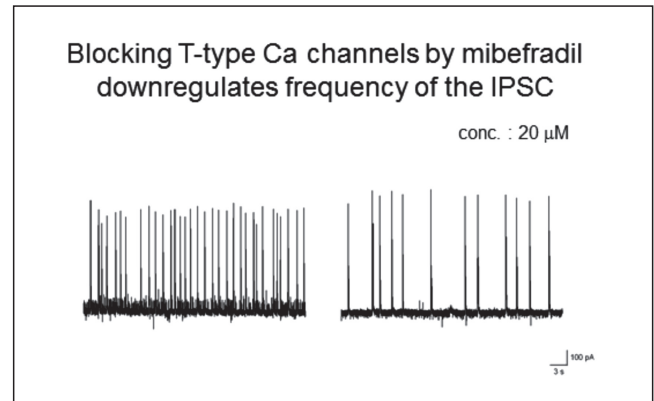


図 4.

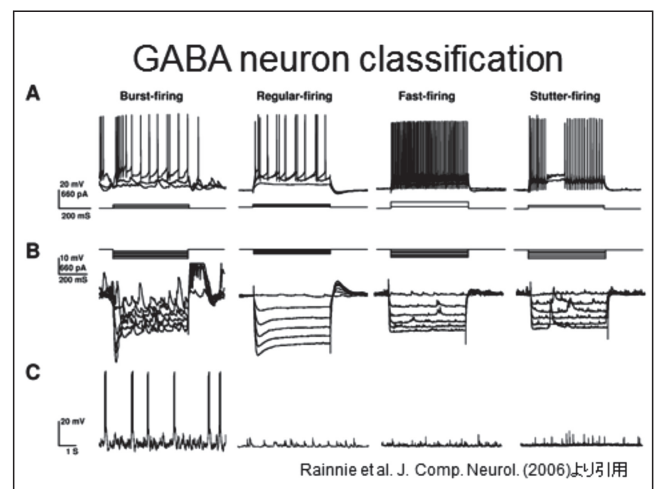


図 5.

表 1.

		GABA neuron summary					
		Burst-firing	Regular-firing	Fast	Stutter	Others	
Periodic AP burst	(+)	1	5	1	1	1	
	(-)		1			1	
	(±)		1				
total		1	7	1	1	2	12

されることによって周期的なIPSC活動が生じているというものが考えられている。

本研究においても複数のIPSCが同期して入力し、積み重なった“Composite IPSC”が見られた。この巨大複合IPSCは生成には複数のIPSC入力が同期して生じると考えられる。アセチルコリン性の刺激物質であるカルバコールの直接作用によって、巨大複合IPSCが非同期状態に分解され、巨大複合IPSCは比較的小さい振幅の個々のIPSCから成ることが改めて確かめられた。この過程は可逆であり、洗い流しによってほぼ完全に巨大複合IPSCが回復することから、行動下でも何らかの要因でアセチルコリンなどの扁桃体内での増加が起きて同期状態が非同期状態に遷移することで、情動学習に影響が及ぶ『窓』のような状態が現出するという機構の存在が推測される。

T型Ca²⁺チャンネルの阻害剤であるmibefradilとNNC55-396は両者共にリズムの振幅には大きな影響を与えない一方、振動数を減少させるという結果を与えたが、振幅と振動数が独立に影響を受ける状況というのは今まで知られておらず、新しい結果と言える。今後他の濃度やチャンネル阻害剤を試すなどで解明が進

むことが期待される。

GABA作動性介在神経細胞の種類はRegular-firing細胞が12個中7個と比較的多数を占めたので、今後神経化学的な同定を併用することでリズム発生機構に迫ることができる可能性がある。また、持続的にバースト発火するBurst-firing細胞が数は少ないものが見いだされたことで、少数の抑制性入力のリズムを生成する可能性も残っている。これらの追究には光遺伝学が適しているので、今後必要な整備が行われればより深い結果が得られるであろう。

以上のことから、本研究によって扁桃体抑制性リズムの解明に一步近づくことができたと考えられる。さらに研究が進むことでリズム機構の詳細と行動との因果関係が明らかになることを期待したい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導頂きました医学部生化学・村越隆之教授に厚く御礼申し上げます。また研究代表者の生化学在籍中、様々な面でサポートして下さいました教室の皆様に深く感謝申し上げます。