

海馬体介在細胞の生体内機能解析

大阪市立大学大学院医学研究科神経生理学教室

水関 健司

1. 目的

脳の情報処理や記憶のメカニズムを理解するには、脳の構成要素である個々の神経細胞の性質と役割を知ることが重要である。脳の皮質のGABA作動性の抑制性神経細胞である介在細胞（以下、介在細胞と省略）は細胞数では神経細胞全体の約10～20%を占めるに過ぎないが、形態・解剖学的結合・遺伝子発現の異なる様々な種類がある。しかし、各々の介在細胞が生体内でどのような機能や役割を持っているのかはよく分かっていない。そこで本研究は、大規模同時記録法と光遺伝学を組み合わせ、記憶に重要な海馬体の主要な介在細胞であるparvalbumin (PV) 陽性・somatostatin (SM) 陽性・vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 陽性の3種類の介在細胞に焦点をあて、それら各々の介在細胞の生理学的性質、他の細胞種との情報のやり取り、ネットワーク活動との相互作用を定量的に観察し、生体内での役割を明らかにすることを目標とした。

大脳皮質や海馬の介在細胞の細胞数や機能の低下は、脳の過剰興奮や発作を引き起こす可能性があり、てんかん・自閉症・トゥレット症候群・統合失調症・不安障害などに関連すると考えられている。さらに、エピソード記憶や場所記憶に中心的な役割を果たす海馬が正常に機能するためには、海馬の介在細胞が正しく機能することが必要である。将来的に光学を使って脳領域・細胞種特異的に神経活動の制御を行うことにより様々な神経難病を治療することが期待されており、本研究はそのための基盤となることが期待される。

2. 方法

まず、PV・SM・VIP陽性介在細胞の各々に選択的に、光により活性化されるカチオンチャネルChR2またはクロライドイオンポンプNpHRを発現させる。そのために、PV-Cre, SM-Cre, VIP-CreマウスにChR2またはNpHRを発現させるためのアデノ随伴ウイルスを感染させる。次に、ChR2またはNpHRを発現した細胞を同定し、細胞種特異的かつ局所的にそれらの細胞の活動性を人為的に操作しつつ、同時にその他の多数の神経細胞の活動を電気的に記録するシリコンプローブ・光ファイバーアセンブリ法を開発する。この方法を用いて、マウスに海馬依存性の場所課題を行わせている時ならびに記憶に重要な睡眠中に以下の実験を行う。

特定の介在細胞を電気生理学的に同定し、その神経活動を観察する

[Type text]

PV, SM, VIP陽性それぞれの介在細胞に選択的にChR2を発現させ、青色光刺激にロックして発火するChR2陽性の細胞を同定する。次に海馬依存的場所課題中と睡眠中に、ChR2陽性ならびに陰性の多数の神経細胞の活動を細胞外同時記録し、学習や記憶ならびに睡眠によってChR2陽性の介在細胞の活動がどのように変化するかを調べる。また、ChR2陽性細胞間、ならびにChR2陽性と陰性の細胞間の相互作用をCross-Correlogramを用いて解析して、細胞間の情報伝達を調べる。さらに、ChR2陽性細胞の発火とポピュレーションの活動や脳波との相関を調べることにより、神経回路ネットワークにおける特定の介在細胞の役割を明らかにする。

特定の介在細胞の活動を人為的に操作し、周囲の神経細胞や神経回路への影響を観察する

PV, SM, VIP陽性各々の介在細胞に選択的にChR2またはNpHRを発現させ、海馬依存的場所課題中と睡眠中に、それぞれの介在細胞の活動を様々な時間スケールとパターンで人為的に操作する。それと同時に、高密度シリコンプローブを用いて、ChR2やNpHRを発現した標的の介在細胞だけではなく、その近傍のその他の多数の神経細胞の活動と脳波も記録することにより、特定の介在細胞の活動の人為的操作が他の細胞やネットワークに及ぼす影響、さらには行動や学習に対する効果を検討する。

3. 研究成果

まずは、ChR2を発現した細胞を同定し、細胞種特異的かつ局所的にそれらの細胞の活動を人為的に操作しつつ、同時にその他の多数の神経細胞の活動を電氣的に記録するシリコンプローブ・光ファイバーアセンブリ法を開発した。具体的には、NeuroNexus社から購入した32チャンネル（4 シャンク）または64チャンネル（6 シャンク）のシリコンプローブのそれぞれのシャンクに、先を尖らせた光ファイバーを光硬化糊で装着し、Thorlab社から購入したレーザーダイオード(PL450B)を光ファイバに装着した。光ファイバーの先端は、シリコンプローブの記録点から約100マイクロメートルほど離れたところに装着した。

この手法が動くことを確認するために、まずはGABA作動性抑制性神経細胞に広くChR2を発現させているGVAT-ChR2-YFPマウスの海馬に、開発したシリコンプローブ・光ファイバーアセンブリを慢性的に埋め込み、各光ファイバーに450nmの波長の光を当てることにより、光を照射したシャンクから記録している細胞の約10%において、潜時2ミリ秒以内に神経発火率が急速に上昇した。この急速に発火率が上昇した細胞と、同時に記録し発火率が上昇しなかった細胞の波形を比べると、発火率が上昇した細胞の波形の幅は狭く、これまでに報告のある抑制性神経の波形と合致した。さらに、光照射で発火率が短い潜時で上昇した細胞の発火頻度は、そうでない細胞より発火頻度が一般に高く、抑制性の神経細胞であることが示唆された。以上のことから、光遺伝学と、開発したシリコンプローブ・光ファイバーアセンブリを組み合わせることにより、あらかじめ特定の細胞種に細胞を記録している細胞にChR2を発現させておき、大規模同時記録により記録している細胞の中からChR2を発現している細胞を同定することが可能となった。

さらに、PV-Cre, SM-Creマウスの海馬にChR2を発現させるためのアデノ随伴ウイルスを感染させ、上記の方法を用いて、行動中のマウスの海馬から大規模記録法によって同時記録している約100個の

[Type text]

細胞からPV陽性・SM陽性の介在細胞を同定することに成功した。

4. まとめ

光遺伝学と、開発したシリコンプローブ・光ファイバーアセンブリを組み合わせ、特定の細胞種を電気生理学的に同定し、その神経活動を記録する実験系を立ち上げることができた。現在、この方法を用いて、海馬体のPV陽性・SM陽性・VIP陽性の3種類の介在細胞に適用し、マウスに海馬依存性の場所課題を行わせている時ならびに記憶に重要な睡眠中にそれぞれの細胞の活動を記録する実験、ならびにそれぞれの細胞種の活動を抑制または促進して攪拌し、同時に周囲の神経細胞や神経回路への影響を観察する実験をさらに進める予定である。本研究をさらに発展させることによって、海馬体の主要な介在細胞の生体内での機能を明らかにしていきたいと考えている。

5. 発表論文

Kitanishi, T., Ito, H. T., Hayashi, Y., Shinohara, Y., **Mizuseki, K.**, and Hikida, T. (2016). Network mechanisms of hippocampal laterality, place coding, and goal-directed navigation. *J. Physiol Sci.* doi:10.1007/s12576-016-0502-z