

博士論文（要約）

論文題目 前帯状皮質を起点とする神経投射の解析

氏名 五十嵐 ひかる

【緒言】

前帯状皮質(anterior cingulate cortex: ACC)は、多様な脳機能に関与する脳領域である。齧歯目における ACC 興奮性神経の活性化は場所嫌悪性を惹起する¹ほか、ヒトにおいては侵害刺激を予測することで ACC の活性化が起こることが報告されている²。一方で、ACC は認知や報酬関連行動に関わることも報告されている。他者への報酬譲渡の際に ACC が活性化することがサルで報告されている³ほか、ヒトの ACC への電気刺激は物事への意欲を向上させるといった報告も存在する⁴。このような多様な脳機能に ACC が実際どのように関わっているかについては、未だ不明な点が多い。ACC はいくつかの脳領域に投射があることも報告されている。このような背景から私は、ACC を起点とする特定の神経投射に着目して解析を行えば、特定の機能に関わる神経回路メカニズムを明らかにできるのではないかと考えた。そこで私は「ACC が担う異なる情報は、神経投射によって分類されている」と仮説を立て、齧歯目による光遺伝学的手法を用いて検討を行った。

【結果・考察】

1. ACC は様々な脳領域に投射する

ACC からの神経投射を組織学的に観察するため、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてラット ACC の興奮性神経細胞に Channelrhodopsin-2(ChR2)-eYFP を導入した。ChR2-eYFP を CaMKII α プロモーターの下流に接続した AAV ベクターを ACC に投与することで、神経終末の eYFP 蛍光により投射先を同定した(代表図; 図 1B, E)。投与から少なくとも 6 週間以上が経過後に、免疫組織化学法を用いて全脳レベルでの解析を行った。その結果、前障(図 1D)、側坐核、視床、扁桃体基底外側核、中脳水道周囲灰白質(PAG, 図 1F)などの領域で eYFP の蛍光が観察された。

PAG は活性化により痛みを抑制することが知られている。ACC もまた痛みに関わることが報告されている脳領域のため、特に ACC-PAG 経路に着目して以下の実験を行った。ACC への ChR2-eYFP 導入により、PAG の中でも特に背側で強い蛍光が観察された。また、マウス背側 PAG に逆行性トレーサーである Fluoro-Gold を注入し(図

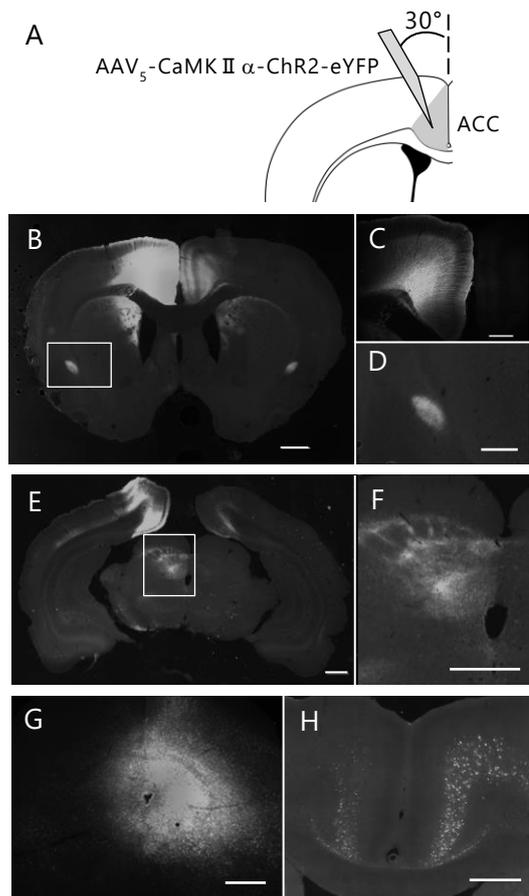


図 1. ACC を起点とする神経投射

(A) 実験模式図 (B) ChR2-eYFP 投与位置を含む冠状切片 (C) (B) における投与位置(=ACC)拡大図 (D) (B) における投射先(=前障)拡大図 (E) 投与位置を含む冠状切片 (F) (E)における投射先(=PAG)拡大図 (G) PAG における Fluoro-Gold 投与位置 (H) Fluoro-Gold による ACC の逆行性標識。Scale bar = 1 mm (B, E), 500 μ m (C, D, F-H).

1G)、ACC 神経細胞が標識されるかの検討を行った。Fluoro-Gold を注入してから 2 週間以上が経過した後に ACC を蛍光観察したところ、トレーサー注入と同側の第 V, VI 層において Fluoro-Gold 陽性の細胞が多く観察された(図 1H)。これらの結果から、ACC 第 V, VI 層神経細胞は背側 PAG に対して投射を送っていることが同定された。

2. ACC 神経細胞は PAG 神経細胞と興奮性シナプスを形成する

光遺伝学的手法、および電気生理学的手法を用い、ACC 神経細胞が PAG 神経細胞とシナプスを形成しているかを検証した。ACC の興奮性細胞に ChR2-eYFP を導入し、6 週間以上が経過した後に PAG を含む脳スライス標本を作製した。ChR2 は青色光の照射によって Na⁺チャンネルが開き、発現した神経細胞を興奮させるはたらきを持つ光感受性イオンチャンネル受容体である。ChR2 は神経終末にも発現し、特定波長の光刺激によりシナプス伝達を引き起こす。そこで背側 PAG 神経細胞からパッチクランプ記録を行い、光を照射した際の応答を観察した(図 2A)。PAG に波長 473 nm の青色光を照射し、PAG に投射する ACC 神経終末を活性化させたところ、興奮性シナプス後電流が観察された(図 2B)。一方、抑制性シナプス後電流は光刺激を行っても観察されなかった。これらの結果から、ACC 神経細胞は背側 PAG 神経細胞に対して直接的に興奮性投射を送っていることが示された。

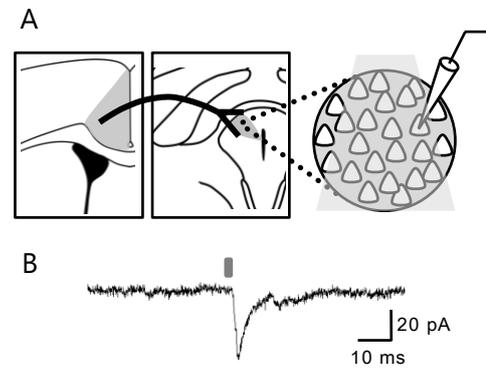


図 2. ACC-PAG 経路活性化により記録されるシナプス後電流
(A) 実験模式図。ACC に ChR2-eYFP を導入し、その投射先である PAG に光を照射して記録を行う (B) PAG を光刺激した際の興奮性シナプス後電流代表波形。黒いバーの部分が光刺激のタイミング

3. ACC-PAG 経路の活性化は運動量を増加させる

ACC-PAG 経路の活性化が行動学的にどのような変化を引き起こすかについて、オープンフィールド試験を用いて検討を行った。ACC に ChR2-eYFP を導入し、光ファイバーを通じて PAG に波長 473 nm の青色光を照射した(ChR2 群, 図 3A)。これにより、*in vivo* で ACC-PAG 経路を活性化させた。コントロール群として、eYFP のみを導入、発現したマウスを用いた(eYFP 群)。光刺激の強度決定のため、まず 3 種類の刺激強度を用いて検討を行った。白い壁のフィールドにマウスを入れ、2.5 分ごとに光照射の有無を切り替えて 20 分間行動を観察した。この結果、9 mW の刺激強度で運動量が増加する傾向が見られた。そこで、9 mW の光刺激で以下の検討を行った。光刺激あり(=ON)となし(=OFF)のセッションを 3 回繰り返し、各セッションの移動距離を算出した結果、ChR2 群は eYFP 群と比較して光照射時に有意に移動距離が増加した(図 3B, C)。光照射を行わない時間帯では、移動距離に有意な差はみられなかった。また、マウスの探索行動の指標の一つである立ち上がり行動の頻度をカウントした。フィールド壁際でのマウスの立ち上がり回数をカウントした結果、pre から 1 回目の光刺激において ChR2 群で光照射時に立ち上がり行動が有意に増加した(図 3E)。eYFP 群ではそのような傾向はみられなかった。また、不安の指標であるフィールドでの中央滞在時間に有意な差は見られなかった(data not shown)。これら

の結果から、ACC-PAG 経路の活性化は探索意欲増加に伴う運動量の増加を引き起こす可能性が示唆された。

【総括】

本研究は、(1) ACC が脳内で多数の脳領域に対して投射を送ること、(2) 特に PAG に対しては ACC 第 V,VI 層から背側に興奮性の投射を送ること、(3) ACC-PAG 経路の活性化は運動量の増加を惹起することを明らかとした。ACC が投射を送る他の領域の一つに扁桃体基底外側核(BLA)が挙げられる。実験者は修士論文において、ACC-BLA 経路の活性化はオープンフィールド試験において行動変化をもたらさないことを報告している。一方本研究では、ACC-PAG 経路の活性化により同試験で行動変化が見られた。このことから、2つの神経投射は異なる情報を担っていることが示唆される。ACC はこれまで、異なる多数の行動に関連することが報告されている。本研究は、同一領域に存在する神経細胞が神経投射先により異なる情報を担うことを示す一つの知見を提供するものである。

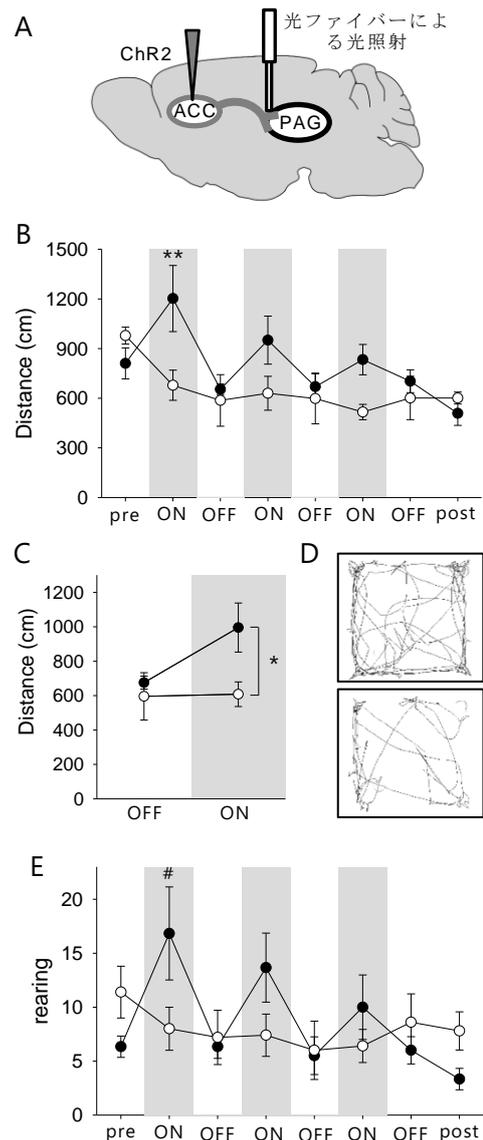


図3 ACC-PAG 経路活性化による運動量変化

(A) ACC-PAG 経路刺激の模式図 (B) 移動距離の経時変化。ONセッションで継続的に光刺激を行う (光刺激; ≥ 10 mW, 20Hz, duration = 5 msec, 473nm) (C) OFF, ONのセッションにおける平均移動距離 (D) ChR2 群における ONセッション、OFFセッションの代表軌跡。上=ON, 下=OFF (E) 壁際立ち上がり(rearing)回数の経時変化。n=6 in ChR2, n=5 in eYFP. $P^* < 0.05$; $P^{**} < 0.01$ compared with eYFP, $P^{\#} < 0.05$ compared with ChR2 pre (two-way ANOVA). Error bars show mean \pm s.e.m.

【参考文献】

1. Johansen JP, Fields HL. Nat Neurosci, 7(4):398-403, 2004.
2. Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell MC. Science, 15:277(5328):968-71, 1997.
3. Chang SW, Gariépy JF, Platt ML. Nat Neurosci, 16(2):243-50, 2013.
4. Parvizi J, Rangarajan V, Shirer WR, Desai N, Greicius MD. Neuron, 18:80(6):1359-67, 2013.