

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08160

研究課題名(和文) 遺伝薬理学を用いた前頭前皮質へのコリン作動性神経入力の解明

研究課題名(英文) A study of cholinergic afferent systems in the prefrontal cortex using pharmacogenetics

研究代表者

小田 哲子 (ODA, Satoko)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：90224237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究計画通りDREADDシステムによる大脳皮質の活性化実験を行っている。またそれに先立って免疫多重染色法を用いて前頭前皮質におけるアセチルコリンの代謝型受容体M1の局在を明らかにした。その結果、過去に報告されたよりもはるかに多くの細胞がM1受容体を有していることが明らかとなった。それらは興奮性細胞、抑制性細胞、アストロサイトを含む。中でも表層アストロサイトでは錐体細胞と同様にM1の免疫陽性シグナルがとて強かった。このことは、表層アストロサイトがアセチルコリンの制御下で働いていることを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We are doing experiments of cerebral cortex activation by DREADD system according to our research plan. Prior to that, the localization of acetylcholine metabotropic M1 receptor in the prefrontal cortex was revealed using multiple immunostaining method. As a result, it was revealed that far more cells contained M1 receptors than those in the past papers. They include excitatory neurons, inhibitory neurons, and astrocytes. Among them, the immunopositivity signals of M1 receptor were particularly strong in the surface astrocytes as well pyramidal cells. This finding strongly suggests that the surface astrocytes function under the control of cholinergic systems.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ムスカリン受容体 M1 前頭前皮質 免疫多重染色 高次認知機能 DREADD

1. 研究開始当初の背景

アセチルコリン作動性神経は大脳皮質を含む中枢神経系に広く分布し、代謝型のムスカリン受容体 (M1-M5) を介して神経活性の修飾に深く関与している。これらの受容体のうち、大脳皮質には M1 受容体が最も多く存在している。前頭前皮質は記憶形成および空間ナビゲーションなどの高次認知機能に関与する領域である。これらの認知機能の正常な遂行や皮質の賦活化には M1 受容体が重要であることは以前より強く示唆されていた。このように前頭前皮質において M1 受容体を含むコリン作動性システム解明の重要性は広く認められていたが、その詳細な動作機構は明らかではなかった。その理由は前頭前皮質を構成する興奮性および抑制性神経のうち、M1 受容体を含有する細胞の割合、および M1 受容体の詳細な細胞内の局在分布パターンは不明なままであったためである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、形態学的手法と遺伝薬理学を組み合わせて作業記憶等に重要なげっ歯類の内側前頭前皮質 (mPFC) へのコリン作動性入力の動作機構を明らかにすることである。そのために以下の2点を明らかにすることを目的とした。

(1) mPFC の興奮性神経細胞および抑制性神経細胞における M1 受容体含有細胞の割合と細胞内の局在分布を明らかにする。研究成果の項でも述べるが、当初の予想に反して神経細胞以外のアストロサイトも M1 受容体を含有していることが明らかとなったので、アストロサイトについても検索を行うこととなった。

(2) 計画当初は DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) システムを用いて、まず前脳基底部コリン作動性神経の活性化実験、次に視床からの視床皮質路の活性化実験を行い、それぞれの実験で mPFC で c-fos を発現した細胞を同定することを目的としたが、(1)の結果で、過去に報告されたよりもはるかに多くの神経細胞とアストロサイトが M1 受容体を有していることが明らかとなった。従って、コリン作動性入力を DREADD システムで活性化しても、その後の神経回路の詳細な解析は現時点では困難であると判断した。また多数ある視床核のうち、感覚系の視床核からの皮質投射は4層へ密に投射するのに対して、視床背内側核を含む連合核や辺縁系核からの皮質投射は、主に1層と3層へ分布していることが知られている。この視床皮質路の神経終末の層分布の違いは、各視床核による皮質活性化システムの違いを反映しているに違いない。そこで今回は視床皮質路による mPFC の活性化メカニズムを明らかにするために視床皮質路の DREADD システムによる活性化を先に行うこととした。DREADD システムによって c-fos を発現した mPFC 細

胞の同定と皮質層の局在分布の解析を行う。視床皮質路は、興奮性細胞と抑制性細胞の両方にシナプスを形成するが、受け手の細胞の割合や層分布についての詳細はいまだ不明である。さらにアストロサイトが、視床皮質路によって活性化するかどうか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ラットを用いた mPFC における M1 受容体含有細胞の同定と M1 受容体の細胞内局在の解析

A. 動物と試薬

動物は雄の成獣 SD ラット 8 匹を用いた。免疫染色には以下の8種の抗体を使用した。抗 M1 受容体 (Sigma-Aldrich, M9808: 500 倍)、抑制性神経細胞のマーカーとして抗 GAD67 (Millipore, MAB5406: 2000 倍) と抗 パルプアルブミン (PV: Sigma-Aldrich, P-3088: 4000 倍)、樹状突起のマーカーとして MAP2 (Millipore, MAB3418: 500 倍)、グルタミン酸作動性終末のマーカーとして、抗 VGLuT1 (Millipore, AB5905: 5000 倍) と抗 VGLuT2 (Synaptic Systems, 135 404: 1000 倍)、アストロサイトのマーカーとして抗 GFAP (Millipore, MAB360: 4000 倍) と抗グルタミン合成酵素 (GS: Millipore, MAB302: 500 倍) を用いた。さらに核染色のため、Hoechst33342 (Molecular Probe, H21493, 2ug/ml) を用いた。

B. 灌流固定と切片の作成

動物に深麻酔をかけ、3%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液を 1000ml 経心的に灌流した。速やかに脳を取り出し、同固定液で3時間後固定した。その後、20%シュクロース・リン酸緩衝液で一晩浸漬した。切片は、凍結マイクロトームを用いて、厚さ 60um の切片を作成した。

C. 免疫染色

1. ABC 法による単染色

切片はリン酸緩衝液で洗浄し、1次抗体として抗 M1 受容体で5日間浸漬した。リン酸緩衝液で切片を洗浄した後、ビオチン化二次抗体で1日、さらにABC液で1日浸漬し、DAB液で発色した。その後スライドに張付け、風乾して封入した。切片の一部は、一次抗体希釈液に M1 受容体のコントロールペプチドを混ぜて吸収実験を行った。抗体吸収切片では明らかに免疫陽性反応が低下していた。

2. 蛍光多重染色

切片はリン酸緩衝液で洗浄し、2種の抗体を混合した液で5日間浸漬した。リン酸緩衝液で切片を洗浄した後、核染色のためHoechstを加えた2次抗体混合液に4時間浸漬した。蛍光多重染色された切片はリン酸緩衝液、次いで蒸留水で洗浄した後、封入した。蛍光多重染色を施された切片は、共焦点顕微鏡 LSM-510 (Carl Zeiss) を用いて観察した。

(2) マウスを用いた DEADD システムによる mPFC の活性化

A. 動物

視床皮質路を活性化するために Vglut2-IRES-Cre マウス (STOCK Slc17a6tm2(cre)Lowl/J (JAX #016963)) を用いた。現在までに 10 匹を超える遺伝子改変マウスを準備し、すでにそのうちの 3 匹に AAV ベクターを視床へ注入した。

B. AAV ベクター

図 1 に示す十分な力価を示す AAV ベクターを作成済である。

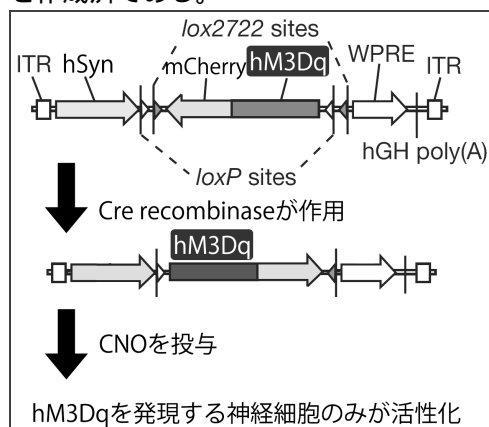


図 1 DREADD による神経細胞種特異的活性化

C. 注入実験

mPFC へ投射する視床皮質路の起始核である視床背内側核 (MD 核) へ AAV ベクター 300nl 圧注入し、6 週間飼育する。6 週目に CNO を 0.3mg/kg を腹腔注入して、2 時間後に灌流固定を行う。灌流固定と切片の作成は (1) の B とほぼ同様であるが、固定液は 4% パラフォルムアルデヒド 60ml、切片の厚さは 50um である。

D. 注入部位の確認

ベクター遺伝子を導入された細胞は mCherry を発現するので、共焦点顕微鏡 LSM-880 (Carl Zeiss) を用いて観察し注入部位を確認する。

E. 免疫染色

抗 c-fos 抗体 (Synaptic Systems, 223 004:3000 倍) を用いた。光学顕微鏡観察では DAB の単染色で、共焦点顕微鏡観察では c-fos と (1) の A で示した各種マーカーとの多重染色を行う。

4. 研究成果

(1) mPFC における M1R の局在分布

mPFC の錐体細胞の大多数では、強い M1 受容体の免疫陽性シグナルが細胞体およびスパインを含む樹状突起全体にわたって見出された。一方、抑制性細胞の細胞体における M1 受容体免疫陽性のシグナル強度は細胞によって大きく異なっていた。一部のニューロンは強いシグナルを示したが、GAD67 免疫陽

性細胞の約 40% およびパルブアルブミン (PV) 免疫陽性細胞の約 30% が弱いシグナルしか示さなかった。また PV 免疫陽性細胞では、M1 受容体免疫陽性シグナルはおもに細胞体に分布していた。グルタミン作動性および GABA 作動性の神経終末では、M1 受容体の免疫陽性シグナルは観察されなかった。

今回の研究では M1 受容体免疫陽性シグナルが大多数のアストロサイトでも観察された (図 2)。この結果は、全く予想外であった。中でも脳表に位置する表層アストロサイトの大多数は非常に強い陽性を示した (図 2a)。この細胞は 2012 年に報告されたばかりの細胞で機能は不明であるが、多くの終足が錐体細胞の頂上樹状突起末端で構成されるタフト周囲に見られることから、タフトにおけるシナプス伝達の修飾に関与している可能性が示唆される。霊長類では、表層アストロサイトは存在せず、脳表はアストロサイトの終足で構成されるグリア境界膜でおおわれる。しかし 1 層に存在するアストロサイトは他層のアストロサイトとは形態が大きく異なり、長い突起が垂直に深層へ向かっており、複数の層にわたって何らかの情報伝達を行っている可能性が示唆されている。表層アストロサイトはこの細胞と相同である可能性があり、皮質における情報伝達の修飾にこの細胞がどうかかわっているか、今後も研究を続けていく予定である。アストロサイトにおける M1 受容体免疫陽性シグナルはおもに細胞体に分布し、終足では観察されなかった。

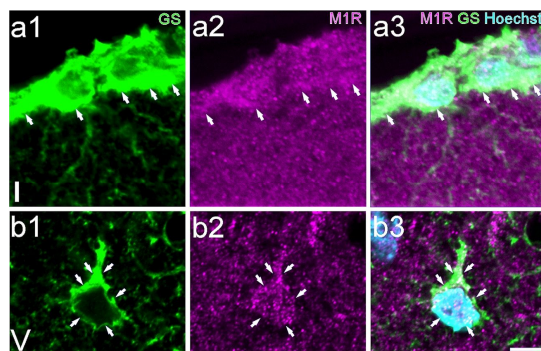


図 2 アストロサイト (GS: 緑) における M1 受容体 (マゼンタ) の分布 a. 表層アストロサイト b. 5 層のアストロサイト。

以上のように M1 受容体の分布パターンは、細胞種によって著しく異なる。図 3 では M1 受容体免疫陽性シグナルの強さにより細胞体を 3 つのカテゴリー (強 ~ 中、弱、陰性) に分類した。図 3a は GAD67 細胞, PV 細胞, GFAP 細胞のそれぞれの皮質各層における免疫陽性細胞の割合の平均を示す。図 3b は M1 受容体免疫陽性シグナルが強 ~ 中カテゴリーの GAD67 細胞, PV 細胞, GFAP 細胞の各層内における比較を示す。

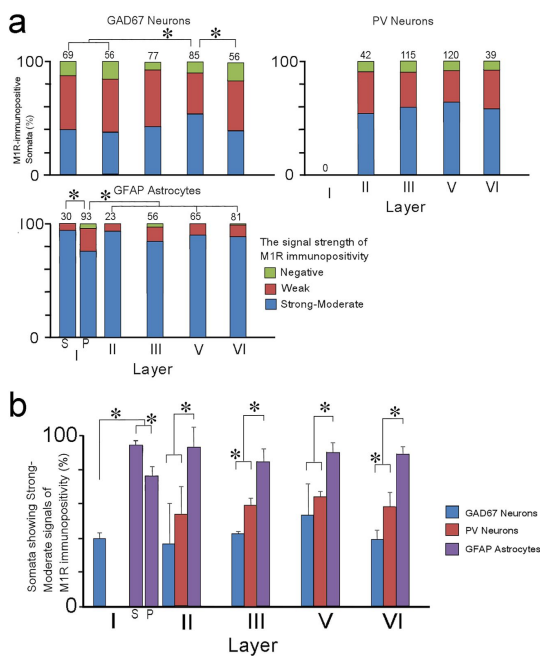


図3 前頭前皮質におけるM1受容体を含有する細胞の割合

図4では各種細胞内におけるM1受容体分布のまとめ図を示す。それぞれの細胞種でのM1受容体含有率および細胞内分布パターンの違いは、mPFCで処理される高次認知機能のコリン作動性調節の基礎をなしているに違いない。

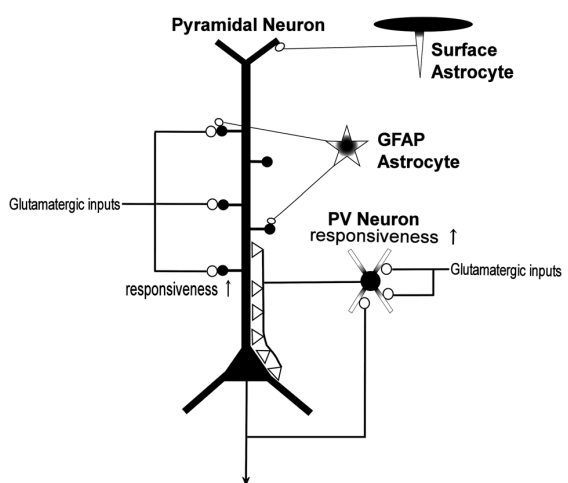


図4 ラット mPFC における錐体細胞、PV 細胞、GFAP 細胞、表層アストロサイトにおける M1 受容体の局在分布のまとめ図

(2) DREADD システムによる mPFC の活性化

AAV ベクターの注入部位を図 5a に示す。ベクターの発現による mCherry を共焦点顕微鏡で観察した。注入部位は mPFC へ視床皮質投射線維を送る視床背内側核 (MD) を中心に外背側核 (LD)、手綱核 (MHb、LHb) に及んだ。CNO 投与による c-fos 発現は mPFC で特に顕著に観察された (図 5b)。

したがって今回用いた DREADD システムは標的領域において c-fos の発現を誘導し、充

分に機能するシステムであることが示された。現在、c-fos 陽性細胞の細胞種の特定を解析中である。

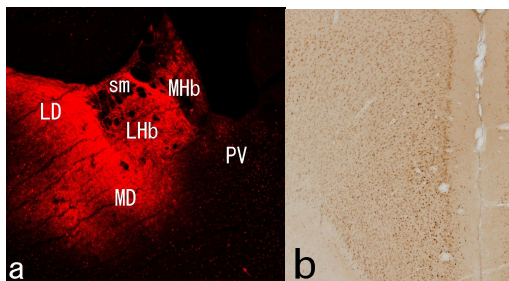


図5 DREADD システムによる mPFC の活性化
a. AAV ベクターの注入部位 (mCherry: 赤)
b. mPFC における c-fos 発現。

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 5 件)

Oda S、Tsuneoka Y、Sachine Y、Adachi-Akahane S、Ito M、Kuroda M、Funato H、Immunolocalization of muscarinic M1 receptor in the rat medial prefrontal cortex、The Journal of comparative neurology、査読有、Vol. 526、No. 8、2018、pp. 1329-1350
DOI: 10.1002/cne.24409

Tsuneoka Y、Yoshida S、Takase K、Oda S、Kuroda M、Funato H、Neurotransmitters and neuropeptides in gonadal steroid receptor-expressing cells in medial preoptic area subregions of the male mouse、Scientific Reports、査読有、Vol. 7、2017、9809
DOI: 10.1038/s41598-017-10213-4

Tsuneoka Y、Tsukahara S、Yoshida S、Takase K、Oda S、Kuroda M、Funato H、Moxd1 is a marker for sexual dimorphism in the medial preoptic area, bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdala、Frontiers in Neuroanatomy、査読有、Vol. 11、No. 26、2017、pp. 1-13
DOI: 10.3389/fnana.2017.00026

Yang J、Litscher G、Sun Z、Tang Q、Kishi K、Oda S、Takayanagi M、Sheng Z、Liu Y、Guo W、Zhang T、Wang L、Gaischek I、Litscher D、Lippe IT、Kuroda M、Quantitative analysis of axon collaterals of single pyramidal cells of the anterior piriform cortex of the guinea pig、BMC Neuroscience、査読有、Vol. 18、2017、25
DOI: 10.1186/s12868-017-0342-7

Takase K、Tsuneoka Y、Oda S、Kuroda M、

Funato H, High-fat diet feeding alters olfactory-, social- and reward-related behaviors of mice independent of obesity, Obesity, 査読有, Vol. 24, 2016, pp. 886-894
DOI:10.1002/oby.21441

〔学会発表〕(計 14 件)

小田哲子、恒岡洋右、吉田さちね、赤羽悟美、伊藤雅方、黒田優、船戸弘正、ラット前頭前皮質におけるムスカリン受容体 M1 の局在分布、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018 年

恒岡洋右、吉田さちね、小田哲子、黒田優、船戸弘正、マウス内側視索前野における神経ペプチド mRNA 発現と性的二型、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018 年

吉田さちね、山本夕香、恒岡洋右、小田哲子、黒田優、船戸弘正、マウスを用いた母子相互作用中に起こる仔の痛覚閾値上昇に関わる神経機構の解析、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018 年

吉田さちね、大西竜子、恒岡洋右、山本夕香、小田哲子、黒田優、黒田公美、船戸弘正、母子分離後の仔マウス輸送反応発現における帯状回コルチコトロピン放出ホルモン受容体シグナルの関与、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

小田哲子、船戸弘正、赤羽悟美、伊藤雅方、恒岡洋右、吉田さちね、黒田優、前頭前皮質のアストロサイトにおけるムスカリン受容体 M1 の局在分布、第 122 回日本解剖学会総会・学術集会、2017 年

吉田さちね、大西竜子、恒岡洋右、小田哲子、黒田優、黒田公美、船戸弘正、親に運ばれる時に起こる子の協調的鎮静反応の意義と神経機構、第 122 回日本解剖学会総会・学術集会、2017 年

恒岡洋右、塚原伸治、吉田さちね、小田哲子、黒田優、船戸弘正、性的二型核マーカー Moxd1 の内側視索前野における発現、第 122 回日本解剖学会総会・学術集会、2017 年

吉田さちね、大西竜子、恒岡洋右、小田哲子、黒田優、船戸弘正、黒田公美、親に運ばれる時に示す子の協調的反応: 乳児と仔マウスを用いた比較生物学的解析、第 94 回日本生理学会大会、2017 年

恒岡洋右、吉田さちね、小田哲子、船戸弘正、黒田優、マウス内側視索前野の性ホルモン受容体発現細胞における分子組成、

第 25 回日本行動神経内分泌研究会、2016 年

小田哲子、船戸弘正、赤羽悟美、伊藤雅方、恒岡洋右、吉田さちね、黒田優、前頭前皮質の興奮性および抑制性細胞におけるムスカリン受容体 M1 の局在分布の比較、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年

恒岡洋右、吉田さちね、小田哲子、黒田優、船戸弘正、生得的社会行動を制御する内側視索前野の機能解剖学的解析、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年

吉田さちね、大西竜子、恒岡洋右、小田哲子、船戸弘正、黒田優、黒田公美、母子分離ストレスによる仔マウス輸送反応の減弱、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年

Yoshida S, Ohnishi R, Tsuneoka Y, Oda S, Funato H, Kuroda M, Kuroda K, Developmental changes of Transport Response after maternal separation in mouse pup, 第 93 回日本生理学会大会、2016 年

Tsuneoka Y, Yoshida S, Oda S, Kuroda M, Funato H, Functional neuroanatomy of the medial preoptic area: a study on its functional and anatomical heterogeneity, The 38th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015 年

〔その他〕
ホームページ等
<http://toho-funatolab.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 哲子 (ODA, Satoko)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号: 90224237

(2) 研究分担者

船戸 弘正 (FUNATO, Hiromasa)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号: 90363118

恒岡 洋右 (TSUNEOKA, Yousuke)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号: 50549011