

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09363

研究課題名(和文) 記憶障害の自然回復機構に関わる、嗅内野-海馬体再神経支配の形態学的解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of reinnervation of the rat entorhino-hippocampal projections associating with spontaneous recovery of memory impairment.

研究代表者

本多 祥子 (Honda, Yoshiko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40287313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット片側嗅内野が傷害されると反対側嗅内野から傷害側海馬体への入力線維数が劇的に増加することが知られる。本研究はこの再神経支配現象の機構を明らかにすべく、まず正常ラットの嗅内野海馬体投射における個々の神経細胞の軸索形態を調べ、再神経支配に特徴的な突起形態の変化を抽出、更にウサギや霊長類についても正常な投射形態を調べた後、各動物種の再神経支配モデル確立を目指す。成果としてラット前海馬台単一細胞から嗅内野へ投射する軸索が嗅内野内部で帯状に広がる複雑な終末神経叢を呈すること、また動物種を超えて共通する主要な線維連絡に加えてウサギやマーモセットに動物種特異的な投射が複数存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is known that unilateral lesion of the rat entorhinal cortex (EC) results in the significantly increased innervation (reinnervation) of the dentate gyrus from contralateral EC, suggesting spontaneous recovery of memory impairment. We aim to clarify the morphological features of axon collaterals derived from single EC neurons in such phenomenon, by comparing to the normal pattern of axonal collateralization, and also to reveal the normal entorhino-hippocampal connectional patterns in the rabbit and primate in order to establish the reinnervation models of those animal species. We confirmed that several single presubicular neurons formed complex terminal arborization in EC and the terminal distribution resembled that of the band-like terminal field seen with massive-scale observation. We also revealed that major entorhino-hippocampal connections were common in the rat, rabbit and marmoset, and that several species-specific projections were found in the rabbit and marmoset.

研究分野：神経解剖学

キーワード：記憶 嗅内野 海馬体 神経線維連絡

1. 研究開始当初の背景

嗅内野から海馬体 (= 齒状回、アンモン角、海馬台) への入力、記憶形成に必須の重要な投射経路である。1970年代、ラットで報告された嗅内野—海馬体投射の再神経支配現象 (一側の嗅内野を人工的に傷害し同側齒状回への入力を喪失させると、数週間後に反対側嗅内野から傷害側齒状回に向けて軸索投射の増加が生じること。引用文献) は、更に学習行動実験によりこの現象が記憶障害の自然回復に繋がることが示唆され、大きな注目を浴びた。当時、一般的な標識物質注入法を用いて細胞集団レベルでこの現象を裏付ける報告は幾つかなされたが、単一の神経細胞レベルでこの現象を解明した報告は無く、個々の神経細胞で生じている筈の軸索形態変化やそのメカニズムについては未解明である。すなわちこの再神経支配現象において、元々反対側海馬体へ投射していた少数の嗅内野細胞の軸索分岐が劇的に増加しているのか、それとも正常では反対側へ投射しない嗅内野細胞の軸索から新たな分岐が発芽して反対側海馬体まで急速に伸長しているのか、もしくはこの両者が見られるのか等の形態学的な詳細については不明な点が多い。本研究の研究代表者 (本多) は、これまで連携研究者 (柴田) と共に、記憶形成に関わる神経回路の全体像を解明すべく様々な標識物質注入法でラット海馬体、海馬周辺皮質、視床間を繋ぐ線維連絡を解析してきた (引用文献②~⑥)。更にウイルスベクター注入法による単一神経細胞レベルでの軸索投射様式についても、幾つかの海馬周辺領域で新知見を報告してきた (引用文献)。単一神経細胞の全ての軸索分岐がどの脳領域に繋がっているのかを判別できれば、同一の情報と同時にどれだけ様々な領域へ送られているのかが分かり、引いてはその細胞を主な構成要素とする投射経路がどのような機能を担っているのかを知ることができる。記憶形成に必須とされる嗅内野—海馬体投射の線維連絡については、細胞集団レベルでは多数の報告があるが単一細胞レベルでは殆ど解析されておらず、前述の再神経支配現象の細胞メカニズムを追求する上でも、まず正常の単一嗅内野細胞の軸索分岐形態を明らかにする必要がある。

更にラットで認められるこの再神経支配現象は齧歯類だけでなくこれ以外の動物種にも存在するのか、特に霊長類において同様の現象の有無を知ることが、例えばヒトにおける記憶障害の自然回復機構の有無を明らかにすることに繋がり、学術的のみならず臨床的にも大きな意義があると考えられる。ウサギは齧歯類に比べ顕著に発達した辺縁系を持つことが知られるが、海馬周辺の正常神経結合関係については報告が極めて少ない。また近年霊長類動物実験モデルとして多用されつつあるコモンマーモセットについても、未だ嗅内野—海馬体線維連絡を含む海馬周辺

の神経結合関係については体系的な報告がなされていない。本研究の研究代表者 (本多) は、連携研究者 (柴田) の協力のもとでウサギの正常な嗅内野—海馬体間の神経線維連絡を詳細に解析し、これまでウサギに特有な線維連絡様式の存在を示唆する知見を多数得てきた。また近年新たに霊長類であるコモンマーモセットの神経線維連絡解析実験を開始しており、連携研究者 (徳野) の協力により実験手法を確立しつつある。これらの研究実績を活用し、最終的に霊長類における記憶障害の回復過程を明らかにすることは、霊長類における記憶障害の自然回復モデル動物作成に貢献するだけでなく、将来的に認知症を始めとする記憶障害患者の新しいリハビリや治療手段の探索に繋がる手がかりとなり得る。

2. 研究の目的

記憶学習障害の自然回復機構に関わる再神経支配現象が、個々の嗅内野細胞におけるどのような形態変化によって担われているのかを明らかにする。また齧歯類以外の動物種 (ウサギやマーモセット) においてもこの現象が存在するか否かを明らかにした上で、霊長類で記憶障害の自然回復モデルを確立し、記憶障害患者の新しいリハビリ・治療手段を探る上での基盤的な知識を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

まず正常動物 (ラット、ウサギ、マーモセット) における嗅内野—海馬体間線維連絡の詳細を、順行性、逆行性トレーサー (BDA, CTB など) を用いたトレーサー注入法で明らかにする。特にラットについてはウイルスベクター注入法を用いて単一嗅内野細胞の海馬体 (特に齒状回) 投射軸索の分岐形態を明らかにし、人工傷害モデルとの比較をする上でコントロールとして必要な軸索形態の特徴を把握する。具体的には、蛍光タンパク GFP を発現する遺伝子を組み込んだ組換えシンドビスウイルスベクター (引用文献) をラット嗅内野などに注入し、順行性に可視化された単一ニューロンの軸索が領域全体の中でどのような広がりや形状をもって投射しているのかを立体再構築して解析する。次に片側嗅内野傷害後の再神経支配現象における軸索線維の形態変化を明らかにするために、片側嗅内野の人工的傷害モデルラットを作成し、十分な回復期間を取った後 (再神経支配の完成後) 反対側嗅内野の齒状回投射細胞の終末分布密度や軸索分岐形態がどのように変化するのかを、順行性トレーサー-BDA もしくはウイルスベクター注入法を用いて調べる。ウサギやマーモセットにおいても片側嗅内野傷害モデルを作成し、ラットと同様に反対側齒状回における軸索終末の増加が見られるかを順行性トレーサー-BDA 注入により確認する。ラットやウサギでは海馬長軸が C 字状にカーブしているため、海馬長軸に直交する断面の連続切片をもとに嗅内野およ

び海馬体全体の二次元展開図を構築し、領域間の境界や層構築をより精確に把握する。連続切片中で可視化された軸索や標識終末・細胞体の分布を、顕微鏡描画装置およびNeuroLucidaシステム(MBF Bioscience社)を用いて立体再構築し、必要に応じて長さや分岐数、終末ブトン数などを定量解析する。

4. 研究成果

初年度は、本研究を遂行する上で基盤的知識となる正常ラットの海馬体および海馬周辺皮質領域(嗅内野、前海馬台を含む)における単一ニューロンの軸索投射様式を、ウイルスベクターを用いて調べ、得られた所見をまとめて学会シンポジウムにて報告した(学会発表-4)。

我々のこれまでの研究(引用文献)により、嗅内野へ投射する前海馬台III層ニューロン群の軸索終末が嗅内野浅層内部でおおよそ嗅脳溝に平行な長軸方向のバンド状に分布することが既に明らかになっているが、今回新たな知見として、実はこの投射に関わる個々の前海馬台III層単一ニューロンが細胞集団レベルで認められたバンド状投射領域とほぼ同じ幅を有する複雑な軸索終末分岐形態を構成していることが分かった。また歯状回に投射する嗅内野ニューロンは主に嗅内野II層に分布することが知られているが、新知見として嗅内野V層にも歯状回投射ニューロンが多数存在し、個々の軸索は歯状回分子層において複雑なterminal plexusを形成していることを初めて明らかにした。これらの軸索形態をコンピュータ上で再構築し立体画像として視覚的に提示し学会にて報告した(学会発表-3)。これらのラットの実験と同時進行でマーモセットにおける実験系の確立を進めつつあったが、一時的に困難となったため、連携研究者の協力のもとでウサギによる実験系を先行して確立した。

次年度は、前年度までにラットで確認してきた海馬体および海馬周辺領域の神経線維連絡や投射様式の特徴を、ウサギ、マーモセットでも確認し動物種間で比較することを目標とし、特にウサギに関しては得られた新知見をまとめて原著論文として報告した(雑誌論文-1)。結果として、ラットに認められる主要な線維連絡はウサギにも同様に認められたが、ウサギでは更にラットに殆ど見られない線維連絡すなわち(1)海馬体CA1から前海馬台深層への強い投射(2)嗅内野浅層から前海馬台への強い投射が付け加わっていることが分かった。また嗅内野-前海馬台間の結合関係が、ラットではほぼ一方であるのに対しウサギでは両方向性に多量の情報交換を行っている事が分かった。またウサギ嗅内野浅層におけるCA1、海馬台、前海馬台投射起始細胞の分布をそれぞれ二次元展開図上にプロットしたところ、いずれも幅0.5-1.0mmの嗅脳溝に平行な帯状に並んでおり、ラット嗅内野と同様の帯状モジュールがウサギ嗅内野にも存在することが分かった。

この結果は、主要な記憶回路および嗅内野における機能単位的な帯状モジュールが動物種を超えて保存された不可欠な神経基盤であることを示唆している。また同時に、動物種ごとに付加的に発達した神経線維連絡というものも存在しており、これが大きな機能的意義を持つ可能性が考えられる。以上のウサギにおける成果をまとめて学会報告した(学会発表-2)。

最終年度は、ラットの単一嗅内野ニューロン軸索形態解析と同時進行で、マーモセットにおける海馬体-海馬周辺皮質間の正常な神経線維連絡の全体像を解析し、得られた成果の一部を平成30年に学会報告した(学会発表-1)。結果として、マーモセットの海馬体-嗅内野投射関係においてもラット・ウサギ同様の嗅内野帯状モジュールが存在することを示唆する所見が得られた。ラット、ウサギに共通する主要な記憶回路はマーモセットにおいてもメジャーであり、かつウサギに認められる(ラットには殆ど無い)神経線維連絡(CA1-前海馬台投射など)はマーモセットにおいてもほぼ確認できた。嗅内野における帯状モジュールの存在を示唆する所見も得られており、例数を増やして更にデータを取得中である。

ラット片側嗅内野傷害モデル作成に関しては既に手法を確立しており、複数例においてデータを解析中である。しかし十分な回復期間として2ヶ月以上を要すること、その期間の頭蓋成長により実験成功率低下を免れないこと(頭蓋のサイズが変化すると脳アトラスとの誤差が生じ、同一個体の非傷害側嗅内野のあらかじめ狙った座標に標識物質等を注入することが困難になるため)などから、十分な例数を得るためには更に実験継続が必要と考えられる。またウサギ、マーモセットの片側嗅内野傷害実験に関してはプロトコルの確立に向けて効率良い実験手法を検討中である。本研究の大筋は、まず各動物種における正常の海馬体-海馬周辺皮質間の神経線維連絡の全貌を把握したのち傷害モデルとの比較を行う方針である。今回の研究年度を通じて正常線維連絡に関する所見を概ねまとめることができたため、今後傷害モデル作成とその線維連絡解析のデータ収集に向けて更に研究を展開することが可能となった。

<引用文献>

Steward O. Reinnervation of dentate gyrus by homologous afferents following entorhinal cortical lesions in adult rats. *Science* 194, 426-428 (1976).

Honda Y, Ishizuka N. Topographic distribution of cortical projection cells in the rat subiculum. *Neuroscience Research* 92, 1-20 (2015)

Honda Y, Sasaki H, Umitsu Y, Ishizuka N. Zonal distribution of perforant

path cells in layer III of the entorhinal area projecting to CA1 and subiculum in the rat. Neuroscience Research 74, 200-209 (2012)

Honda Y, Furuta T, Kaneko T, Shibata H, Sasaki H. Patterns of axonal collateralization of single layer V neurons in the rat presubiculum. The Journal of Comparative Neurology 519, 1395-1412, (2011)

Honda Y, Umitsu Y, Ishizuka N. Organization of connectivity of the rat presubiculum: II. Associational and commissural connections. The Journal of Comparative Neurology 506, 640-658, (2008)

Honda Y, Ishizuka N. Organization of connectivity of the rat presubiculum: I. Efferent projections to the medial entorhinal cortex. The Journal of Comparative Neurology 473, 463-484, (2004)[erratum: J Comp Neurol.476(4), 440-442, (2004)]

Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamaki N, Kaneko T. In vitro transduction of central neurons using recombinant sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 49, 1497-1507, (2001)

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 1件)

1, Honda Y., Shibata H. Organizational connectivity among the CA1, subiculum, presubiculum and entorhinal cortex in the rabbit. The Journal of Comparative Neurology 525, 3705-3741 (2017). 査読有り 10.1002/cne.24297

〔学会発表〕(計 4件)

1, 本多祥子、柴田秀史、守屋敬子、徳野博信 ラット、ウサギ、マーモセットの海馬体-前海馬台-嗅内野間線維連絡 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018年3月30日、日本医大武蔵境校舎・日本獣医畜産大学(東京都武蔵野市)

2, 本多祥子、柴田秀史 ウサギ海馬体、前海馬台、嗅内野を繋ぐ線維連絡 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017年3月29日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

3, Honda Y., Shibata H. Band-like zonal distribution of the cells of origins of CA1, subicular and presubicular projections in the rabbit entorhinal cortex. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience

Society, 2016年7月20日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

4, Honda Y. Patterns of axonal collateralization of single neurons in the rat parahippocampal cortices. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society(シンポジウム)、2015年7月29日、神戸国際会議場・国際展示場(兵庫県神戸市)〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 祥子 (HONDA, Yoshiko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40287313

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

柴田 秀史 (SHIBATA, Hideshi)

東京農工大学・大学院農学研究院 動物生命化学部門 獣医解剖学研究室・教授

研究者番号: 50145190

徳野 博信 (TOKUNO, Hironobu)

公益財団法人東京都医学総合研究所・研究員

研究者番号: 40212071

(4) 研究協力者

()