

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14334

研究課題名(和文) 体性感覚野ミニバレル領域の形態学的特徴が同領域の予想外の重要性を示唆する可能性

研究課題名(英文) Mini-Barrel region of the somatosensory area may have morphological features that indicate unexpected significance of the region in cortical processing

研究代表者

福田 孝一 (Fukuda, Takaichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：50253414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：体性感覚皮質バレル野は、動物の頬ひげ(洞毛)に対応する秩序的構造を示し、大脳皮質研究における重要な研究対象である。しかし隣接するミニバレル領域が、ミニチュア洞毛からのより繊細な感覚情報を処理する場所である可能性に気づき、形態学的研究を行った。主要なGABAニューロンであるパルプアルブミン(PV)陽性ニューロンは、ミニバレルの内外に多数存在し、予想通り密度がバレルよりも大きいことを見出した。比較対象としての重要性からバレル野での緻密な解析を平行して実施し、PVニューロンは樹状突起形態から4タイプに分類できることと、ギャップ結合による秩序だった樹状突起ネットワークを形成していることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Barrel area in rodents has well-ordered structure that facilitates investigation of the cerebral cortex, but I noticed further significance of the neighboring “mini-barrel region”, where processing of information from miniature vibrissae should occur with higher resolution, just as processing of retinal information from the fovea centralis. Thus I examined structural organization of parvalbumin (PV)-positive interneurons in layer 4 of the mini-barrel region in mice and compared it with that in barrels. The analysis has shown that the density of PV neurons in mini-barrels is significantly higher than that in barrels, supporting the hypothesis of high-resolution regulatory mechanism in mini-barrels. Simultaneous analysis in barrels further revealed that PV neurons in layer 4 are categorized into 4 subtypes and that gap junctions interconnect different subtypes with connectivity unique to each subtype, indicating the presence of novel organized architecture for somatosensory processing.

研究分野：神経解剖学

キーワード：体性感覚野 バレル ギャップ結合 GABA パルプアルブミン インターニューロン

1. 研究開始当初の背景

本研究は、大脳皮質体性感覚野において、これまでほとんど見過ごされてきたミニバレル領域が、有名なバレル野とほぼ同じ皮質面積を占めていることに申請者が気づいたことを端緒とする。マウスの口元を観察すると、洞毛と同じ性質を持つミニチュア洞毛ともいべき毛が密生しており(図1)しかも文献的には行動実験から、マウスが洞毛を用いて顔から離れた場所にある物体に触れた後、口先を物体に接近させ、ミニチュア洞毛で物体の詳細を認識していること、すなわちミニチュア洞毛とミニバレルは網膜の中心窩に比すべき高解像度知覚システムである可能性を示している。しかしミニバレル領域の詳細な形態学的研究は皆無であり、萌芽的研究としてミニバレルの構造の解明が急務であると考えた。

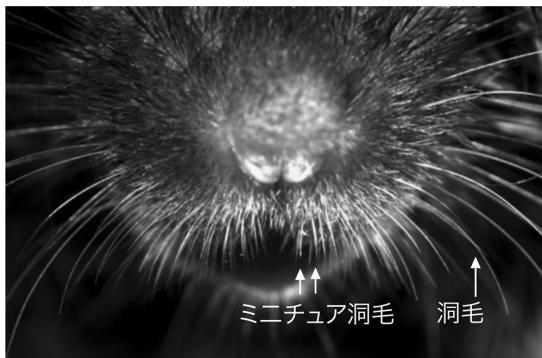


図1 C57BL6 マウスの顔の写真

2. 研究の目的

大脳皮質の体性感覚野の性質を明らかにする上で、これまでその重要性が見過ごされてきたために、詳しいことがほとんど未解明であるミニバレル領域に注目し、その形態学的性質を解明することを目的とする。特に大脳皮質の神経活動の制御システムを構成する最も重要なニューロンである、パルプアルブミン含有 GABA ニューロン (PV ニューロン) を中心に検討を加える。

3. 研究の方法

C57BL6J マウスを用い、さまざまな形態学的手法を駆使してミニバレル領域の組織学的検討と定量解析を行い、得られた結果をバレル領域と比較した。特にミニバレル内部に存在する PV ニューロンの密度を求め、ミニバレル間のセプタ領域についても解析を実施した。さらに PV ニューロンの樹状突起を3次元再構築し、バレルとの空間的位置関係をもとにして分類した。加えて PV ニューロンの樹状突起間に形成されるギャップ結合を同定し、分類した各タイプ間の結合関係を調べた。

4. 研究成果

(1) ミニバレルの描出法の改良

バレルとミニバレルは、脳の表面に平行な

連続切片を作成すると明瞭に同定することができる。しかし通常は一枚の切片に現れるバレル・ミニバレルの数が少数であるため、研究を介した当初は、何枚にも及ぶ連続切片から取得した画像をコンピュータ内で合成して全体像を得ていた。

しかしこの方法ではつなぎ目に誤差が生じることが避けられなかった。また切片を作成する際に採用する平面の角度を適当にきめていたので、動物ごとに見え方が異なり、再現性において問題があった。他方、従来しばしばとられてきた方法では、固定した脳を平行なガラスなどにはさんで、むりやり平面になるように圧迫して後固定し、そこから組織標本を作るものであるが、それではニューロンの密度や形態が、大きく正常なものから乖離してしまうために、その方法を採用するわけにはいかなかった。そこでマウスの大脳半球の表面に平行な切片を作成する際の最適な方向を決めることを試みた。

図2にその様にして得られた結果を示す。

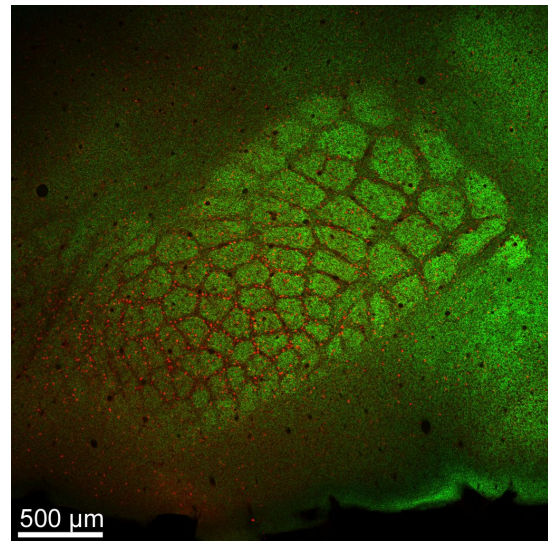


図2

これは一枚の切片(厚さ 50 ミクロン)の写真であり、これほど多くのバレル・ミニバレルを、圧迫変形を施さない一枚の写真で一望のもとに捉えることが初めて可能となった。緑色は視床由来の軸索終末に含まれる vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2)、赤は PV ニューロンの細胞体を示す免疫蛍光二重染色である。これにより、ミニバレルのサイズは 100x150 ミクロン程度かそれ以下であり、200x300 ミクロン程度の大きさを持つバレルに比べて、断面積で約 4 分の 1 の大きさであることがわかった。

さらに PV ニューロンの特徴的な分布パターンを観察することが可能となった。すなわち、PV ニューロンはミニバレル内部と隣接ミニバレル間のセプタ領域の両方に分布しているが、予想に反して後者の方が高い密度であることが図からも見て取れる。

(2) ミニバレル・バレルとセプタにおける PV ニューロンの密度の比較

共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像をもとに、ミニバレル・バレル、セプタそれぞれの区画における PV ニューロンの数を求め、さらに各区画の体積を区分求積法により計算し、ニューロンの密度を算出した。その結果、ミニバレルとバレルにおける密度はそれぞれ、 12.2 ± 4.1 個 / 10^6mm^3 と 6.1 ± 1.7 個 / 10^6mm^3 となり、ミニバレル内部の密度はバレルの約 2 倍で、統計学的にも有意に大きかった。次にセプタの密度はミニバレル領域で 19.4 個 / 10^6mm^3 、バレル領域で 8.9 個 / 10^6mm^3 であり、ミニバレル領域のセプタで最も高い値となったが、このことは図 2 で定性的にも認められるものと同じ結果であった。

(3) ミニバレルにおける PV ニューロンの樹状突起形態

ミニバレル内外の PV ニューロンの形態を明らかにするために、画像解析ソフト NeuroLucida を用いて共焦点レーザー顕微鏡画像をトレースし、三次元再構成を試みた。同様の解析をバレル解析において先行実施していたが、バレルでは細胞体の位置（バレルの中か外か）と樹状突起の広がり（バレルの境界を超えるか否か）により 4 種類に分類できた。特に細胞体とそこから伸びる樹状突起がすべて一個のバレル内部に局限するタイプ（1 型）が比較的多かった。しかしミニバレルでは、おそらくミニバレル空間の小ささのためか、1 型は少なく、細胞外がミニバレル内部にあって樹状突起がミニバレルの外にまで広がるもの（2 型）と、細胞体がミニバレルのすぐ外にあり、樹状突起を主にミニバレル内部に伸ばしているものが（3 型）多く認められた。さらにセプタに局限し、樹状突起も垂直方向にのみ伸び、バレルに入らずセプタに局限するもの（4 型）バレル同様に存在していた。しかし詳細においては、ミニバレルではバレルにおける特徴が必ずしもそのまま当てはまるわけではないことが次第に明らかになってきた。バレルにおける PV ニューロンの樹状突起形態の緻密な解析が急務となり、以下の検討を行った。

(4) 比較対照としてのバレルにおける PV ニューロンの樹状突起形態の解析

図 3 に、上述の 4 タイプについて行った詳細なトレースの結果を示す。トレースに際しては、バレルの輪郭の取り方を工夫した。視床由来の軸索終末を可視化する VGluT2 の免疫染色によってバレルを同定したが、その際 confocal optical slice ごとに輪郭を同定した。従来一般的な方法では、長方形や楕円でバレルの輪郭が定められていたが、バレルの形はむしろ不規則であり、そのようなやり方では正確なタイプ分けが不可能であることが明らかとなった。

図 4 に各タイプのニューロンの形態を個

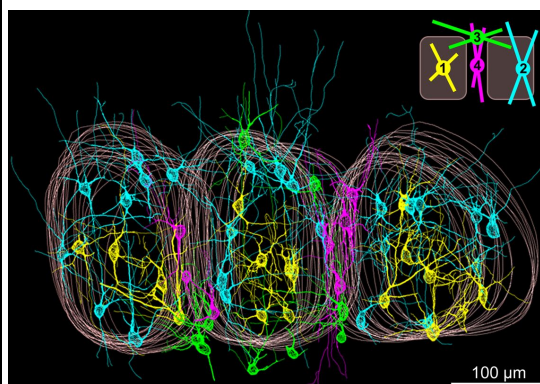


図 3

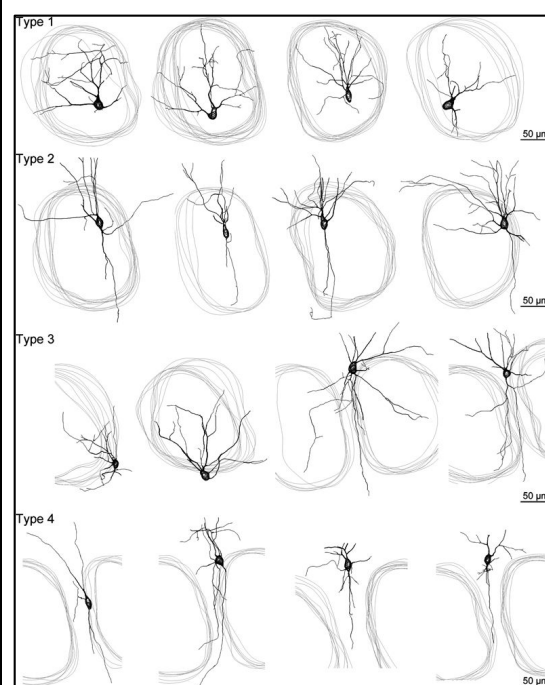


図 4

図示する。NeuroLucida による解析を持ちいて、それぞれの特徴的な樹状突起形態についての定量的な検討も行った。

次に視床由来の軸索終末が密に集積しているバレルの特性を考慮して、4 タイプそれぞれへの視床入力密度を定量的に比較した。まず 4 タイプとも、細胞体と近位樹状突起への直接シナプス入力が豊富にあることを電子顕微鏡観察により実証した（図 5）。さらにタイプ間で密度を比較したところ、1 型は他のタイプに比べて細胞体への視床由来の軸索終末密度が有意に大きいことがわかった（図 6）。一方、樹状突起上での分布は、4 タイプとも近位のセグメントほど有意に高い密度であった。すなわちバレル野 4 層の PV ニューロンは、4 層の興奮性ニューロンである spiny stellate cell が樹状突起棘（スパイン）に入力を受けることは著しい対照をなす。これは PV ニューロンが視床入力による feedforward 回路に組み込まれていることを示す形態学的事実であり、in vivo 動物での生理学的実験で示されてきた所見

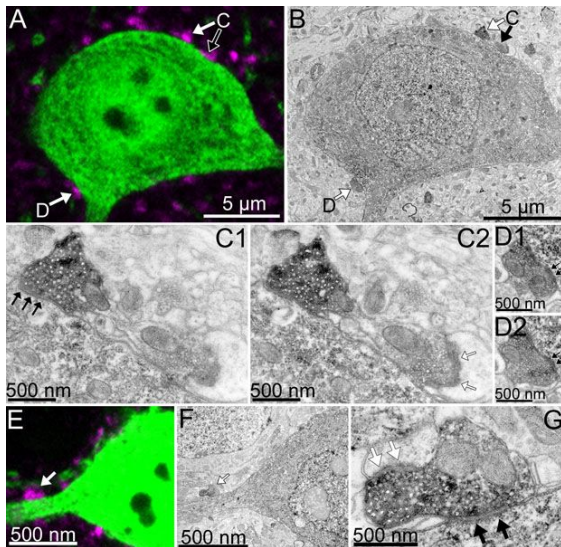


図 5

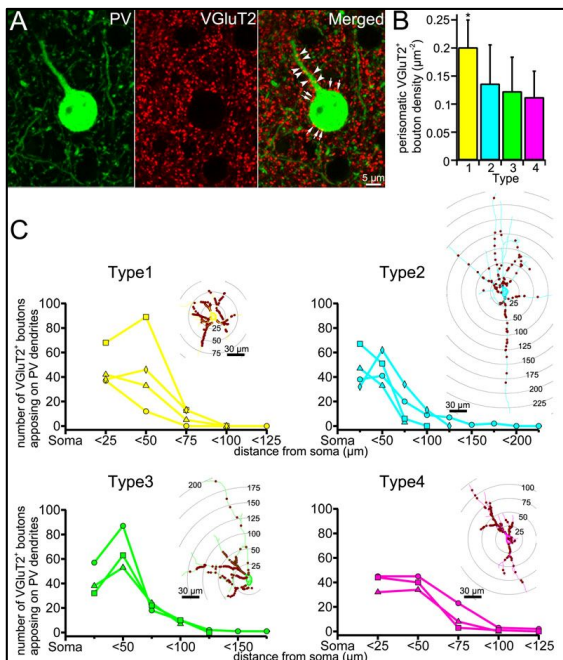


図 6

にまさに合致する形態であった。

次に各タイプ間に形成されるギャップ結合についての詳細な解析を実施した。神経細胞のギャップ結合に特異的なコネクシン 36 の抗体を用いて PV, VGLUT2 とあわせて 3 重蛍光免疫染色を行い、各タイプ間の結合関係を調べた。

その結果、以下の結果を得た (図 7)。

樹状突起全体が一つのバレル内におさまる 1 型は、1 本の頬ひげ由来の入力に特化した活動をすると考えられるが、驚いたことに 1 型同士は決して相互間にギャップ結合を形成していなかった。

2 型はバレル内外に樹状突起を伸ばし、幅広い入力を受ける形態を示すが、1 型と異なり、同じバレル内部の 2 型相互にギャップ結合が認められ、さらに 1 型とも結合を形成していた。さらにバレルの外にある 3 型や、3

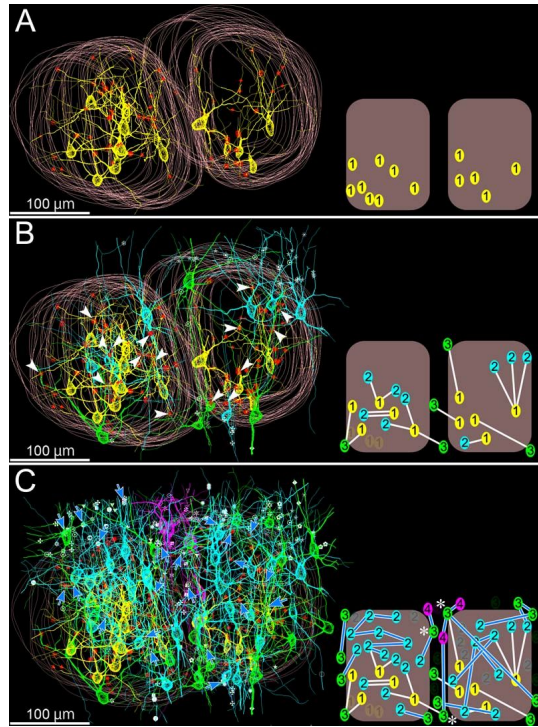


図 7

層にある PV ニューロンとも結合していた。

3 型は 1 型、2 型、3 型相互の結合に加えて、セプタに局限する 4 型ともギャップ結合を形成していた。

4 型は 3 型とギャップ結合を形成していた。

このように、バレル野 4 層において 4 つのタイプの PV ニューロンが、秩序だったギャップ結合ネットワークを形成していることが始めて明らかとなった。

最後に、ギャップ結合が細胞体からどのくらい離れた位置に存在しているかという点について、定量的検討を行った。樹状突起は passive なケーブルとしての電気生理学的性質を持つので、距離に応じてシグナルが減衰するため、細胞体からの距離はギャップ結合ネットワークの機能的意義を考える上で重要なファクターである。4 タイプ間のさまざまな結合からなる総計 3 8 個のギャップ結合について、連結する 2 つの細胞体までの距離の少なくとも一方は 50 μm 以下のものが 2 5 ペア (65.8%)、75 μm 以下のものが 3 3 ペア (86.8%)、100 μm 以下のものが 3 7 ペア (97.4%) であった。他の研究グループにより電気生理学的に調べられてきた結果から、これらの距離は、活動電位が同期的な spikelet として相手の細胞に伝わる電気シナプスとして働きうる値である。

以上を総合すると、バレル野 4 層の PV ニューロンは、細胞体近傍に視床由来の強い興奮性シナプス入力を受けて feedforward 制御を行う構造を持ち、さらにそれが細胞体から近いところにあるギャップ結合を介して、抑制性ニューロン間に興奮性の同期的シグナルを伝えること、そして特徴的な 4 タイプ

間に秩序だったギャップ結合ネットワークが形成されていることが明らかになった。

以上のようなきわめて興味深い新しい構造の発見は、大脳皮質体性感覚野の神経活動の理解を大きく促進するものであり、その内容を論文にまとめ、評価の高い国際雑誌 Cerebral Cortex 誌において発表した。

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 2 件)

Shigematsu N, Nishi A, Fukuda T.

Gap junctions interconnect different subtypes of parvalbumin-positive interneurons in barrels and septa with connectivity unique to each subtype. Cerebral Cortex. 査読あり 2018 Feb 27. doi:10.1093/cercor/bhy038. (in press)

Fukuda T.

Structural organization of the dendritic reticulum linked by gap junctions in layer 4 of the visual cortex. Neuroscience. 査読あり 2017. Jan 6;340:76-90.

[学会発表](計 5 件)

Shigematsu N, Fukuda T

Gap junctions mediate the connectivity among different subtypes of parvalbumin-positive interneurons in layer 4 of the mouse barrel cortex. Society for Neuroscience 48th Annual meeting, November 3-7, 2018, San Diego Convention Center, San Diego, CA.

重松直樹、福田孝一

マウス 1 次体性感覚野におけるバレル局在型パルブアルブミン陽性ニューロンに対する視床-皮質間入力分布の様式
第 1 2 3 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2018 年 3 月 28 日

福田孝一

中枢神経 GABA ニューロンがギャップジャンクションを介して作る樹状突起の網状構造 dendritic reticulum は脳の場所ごとに多彩な形を織りなす
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 .2017 年 12 月 9 日

福田孝一

連続切片三次元再構築の威力
第 4 8 回日本臨床分子形態学会学術集会
2016 年 9 月 23 日

重松直樹、福田孝一

マウス体性感覚野皮質 4 層におけるパルブアルブミン陽性細胞の特徴的な形態と視床入力との関係
第 7 1 回日本解剖学会九州支部学術集会 .
2015 年 10 月 31 日

[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

福田 孝一 (FUKUDA, Takaichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：50253414

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

重松 直樹 (SHIGEMATSU, Naoki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：30469613

(4) 研究協力者

()