

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：37130

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08519

研究課題名(和文) 嗅覚一次中枢・嗅球のニューロン構成を形態的に再考する

研究課題名(英文) The organization of the olfactory bulb revisited

研究代表者

小坂 克子 (Kosaka, Katsuko)

福岡国際医療福祉大学・医療学部・教授

研究者番号：60202058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚一次中枢嗅球は感覚情報処理及び成体ニューロン新生のモデルとして注目されている。嗅球構成ニューロンで重要な問題の一つはTH発現ニューロンであった。その一部は一時、興奮性tufted cellのグループと考えられていたが、その後我々がGABAとの共存を示し、現在では介在ニューロンに属するdopamine(DA)-GABAニューロンと考えられている。しかし、その詳細ははまだ不明であった。本研究ではマウス嗅球DA-GABAニューロンの形態解析をして、初めて系球体層のDA-GABAニューロンを大型傍系球体細胞、小型傍系球体細胞、貫通細胞、被覆細胞及びその他に分類し、それぞれの形態的詳細を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅球は感覚情報処理及び成体ニューロン新生のモデルとして注目されている。TH発現ニューロンは系球体間の抑制に働き機能的に重視されている。また、系球体層新生ニューロンの主グループとしても注目されている。しかし、TH発現ニューロンが多様であることはほとんど考慮されていないのが現状である。我々のTH発現ニューロンの多様性を示した研究は今後の機能・ニューロン新生を考える上で、重要になってくると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The main olfactory bulbs (MOBs) are one of the most interesting parts of the brain; as an excellent model for understanding the neural mechanisms of sensory information processing and as one of the most prominent sites of the adult neurogenesis. Among the neurons in the MOBs TH expressing (DA-GABAergic) neurons might be most controversial. The structural features of DA-GABAergic neurons in the mouse MOBs were examined, using both wild type and transgenic TH-GFP mice. DA-GABAergic neurons were clustered in the glomerular layer (GL) but they also scattered in other layers. DA-GABAergic juxtglomerular neurons, were classified into 5 groups based on their structural features and named as follows: 1) Large periglomerular cells. 2) Small periglomerular cells. 3) Transglomerular cells. 4) Incrusting cells. 5) Other various neurons not-yet classified. In the layers other than the GL various types of TH expressing neurons were scattered; some of them extended dendritic processes into the GL.

研究分野：神経解剖

キーワード：感覚 中枢神経系 ニューロン ドーパミン GABA 局所回路 免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、嗅覚一次中枢嗅球は感覚情報処理のモデル及び成体ニューロン新生のモデルとして広く解析されている。特に、情報処理の機能的単位と考えられている糸球体の周辺部に存在するいわゆる糸球体近傍ニューロンは我々の研究や他の研究グループの解析によりその多様性が明らかとなってきている。それに伴い、かつては単純だとされていた嗅球のニューロン構成はまだ不明な点が多いということが認識されてきた。特に現在ドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロン(DA-GABA JG) と名付けたニューロン群はこれまで極めて特異な変遷を経てきている。カテコールアミン蛍光及び tyrosine hydroxylase(TH)陽性ニューロンとして検出された糸球体周辺の嗅球ドーパミンニューロンは当初大部分が興奮性の external tufted cell に属し、少数の小型のニューロンがいわゆる傍糸球体細胞 periglomerular cell に属すると考えられた。しかもそれらは GABA 性糸球体細胞とは別のグループであると報告されていた。しかし、その後の我々の解析により TH 陽性ニューロンが GABA ニューロンであることが明らかとなり、嗅球ドーパミンニューロンはドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロン(DA-GABA JG) とみなされるようになった。我々はこのドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロンの多様性に注目し、細胞体の大きさから大型と中～小型の 2 グループに大きく分け他。トレーサー実験により大型のドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロンが糸球体間の結合を担っている主体であることを示した。更に、ニューロン新生との関連で、中～小型の DA-GABA JG は成体でのニューロン新生しているグループの一部であるが、大型の DA-GABA JG は胎児期に発生しているのみで、成体でのニューロン新生はしていない可能性が高いことを示した。更に、我々は軸索突起のマーカ・形態の検討から、大型の DA-GABA JG は明確な軸索を有し軸索突起を周辺に伸ばしているが、中～小型の DA-GABA JG では軸索の存在が明確ではないことを示した。しかし、DA-GABA JG の樹状突起の形態についてはこれまで不明であった。近年ある研究グループがこの DA-GABA JG ニューロン群はいわゆる傍糸球体細胞 periglomerular cell ではなくこれまで報告されていない短軸索ニューロンであると提唱した。しかし、その報告は軸索突起と樹状突起の区別を全くしておらず、また、これまでも観察されている DA-GABA JG でそのようなニューロン群と明らかに異なる特徴を示すものも多数存在することから、このドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロン(DA-GABA JG) の形態的詳細はまだ明確には確立していないといえる。

一方、我々は近年発見されたカルシウム結合蛋白 secretagoin (SCGN) を含有している糸球体近傍ニューロンを解析し、その多様性を示した。特に、tuft 状の糸球体内樹状突起を有する典型的な PG cell とともに複数の糸球体を貫くように樹状突起を伸ばしているニューロンがあり、後者を我々は“transglomerular cell”と名付けた。しかし、transglomerular cell は SCGN ニューロンだけかどうかまだ不明であり、嗅球ニューロン構成の解明にはその詳細の解明が必要であった。

## 2. 研究の目的

我々はマウス嗅球において上記のドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロンの多様性をより明確に認識し、形態的詳細を明らかにすることが必要であると考えた。また、これまであまり注目されてこなかった糸球体層以外の層すなわち外網状層～顆粒細胞層の tyrosine hydroxylase (TH) 発現ニューロンの形態学的詳細も嗅球ニューロン構成の理解には不可欠の所見であり、それを明らかにする。更に、我々の嗅球・線条体・脳幹部の SCGN ニューロンの解析で SCGN が他のカルシウム蛋白 (parvalbumin PV, calretinin CR, calbindin CB) と同様にニューロンマーカとして興味深いとともに、種差がかなりあることが判明してきた。そこで、これまで嗅球の構造が異なっていることを明らかにしたジャコウネズミをはじめとする数種の哺乳類嗅球の SCGN ニューロン及びドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロンの解析を進める。

## 3. 研究の方法

野生型 C57BL/6J 系マウス及びカテコールアミンニューロンが蛍光色素 GFP を発現している遺伝子改変マウス TH-GFP マウス (B6.B6D2-Tg(Th-EGFP)21-31Koba RBRC02095 福島県立医大 小林和人教授作成、理研バイオリソースセンターより提供) を主に用いて解析を進めた。更に、type 1, type2 periglomerular cells 提唱の基盤となったラット及び嗅球の構造がラット・マウスと異なっていることを我々が以前を示したジャコウネズミを含む数種の動物を比較しながら解析を進めた。マウス嗅球は下記の 4 つの方法で解析を進めた。マウス以外の動物の脳は以前我々が解析した時に保存していたパラフォルムアルデヒド固定脳からヴィブラトームで 50 ミクロン厚の切片を作成し免疫組織化学染色に使用した。

### (1) ビオチン標識デキストラン BDA 標識

糸球体近傍ニューロン特にその多様性の解明のために脳定位固定装置を用いてごく微量のトレーサー (ビオチン標識デキストラン BDA) を電気泳動的に TH-GFP マウス或いは野生型マウスの嗅球糸球体層に注入し数日後に灌流固定し標識ニューロンを解析した。動物はリン酸緩衝

4%パラホルム液で経心臓的に灌流固定し脳を取り出し、嗅球を寒天に包埋し、ヴィブラトームで50ミクロン厚の水平断連続切片を作成した。BDAはパシフィック・ブルー標識ストレプトアビジンで染色し、多重蛍光免疫組織化学法により、標識ニューロンの化学的性質を同定した。蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡で観察した。一部は、その後、同一標本をABC法でDAB発色し、形態的詳細をカメラルシダ装置で3次元解析した。

(2) 片側鼻腔閉鎖による機能的入力除去

機能的入力除去でTH陽性要素が減少するので、少数の孤立して残存している個々のTH陽性ニューロンの形態が解析できる。鼻腔閉鎖後4週で灌流固定したマウスの嗅球で、TH及びニューロン軸索初節部(AIS)マーカーのAnkyrin Gに対する抗体で多重蛍光免疫組織化学を行い、蛍光顕微鏡で観察記録した後、THをABC法で処理し、カメラルシダ装置でニューロン形態を解析した。

(3) 遺伝子改変マウス TH-GFP マウス嗅球の固定したスライスでの蛍光色素標識

灌流固定したTH-GFPマウス嗅球から150μm厚の水平断スライスを作成、ステージ固定式蛍光顕微鏡で直視下にGFP陽性細胞に蛍光色素 lucifer yellow (LY)を電気泳動的に細胞内注入し標識した。標識ニューロンを含むスライスはTH抗体-rhodamine標識2次抗体及びDAPI等で染色し、NeuroLucidaシステムの蛍光顕微鏡で画像スタックを取得し、解析した。

(4) 遺伝子改変マウス TH-GFP マウス嗅球スライスでのスライスパッチ法

蛍光顕微鏡直視下でTH-GFPマウス嗅球の350μm厚のスライスでバイオサイチンの電気泳動的単一ニューロン標識を行い、標識ニューロンの3次元構造解析を行った(イタリア Ferrara 大学の Drs. O. Belluzzi & A. Pignatelli との共同研究)。

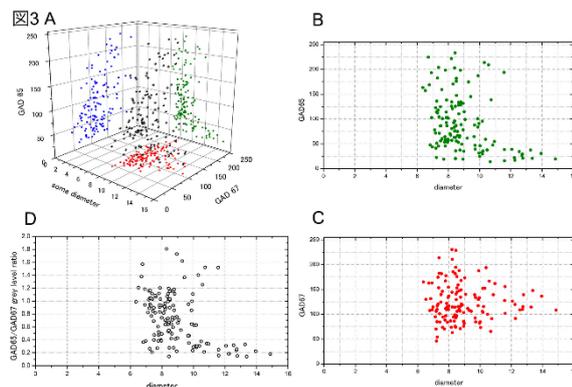
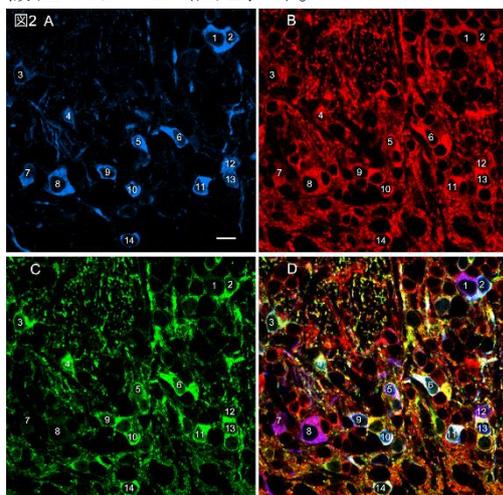
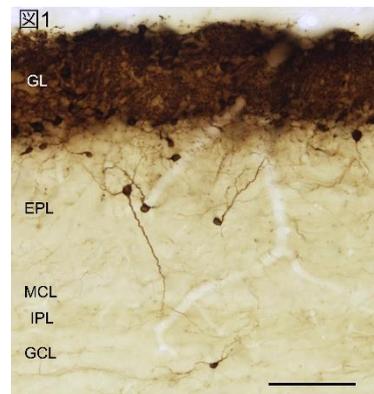
#### 4. 研究成果

嗅球ではTH発現ニューロンは糸球体層に集中していたが、他の層にも散在していた(図1)。

#### 1) 糸球体近傍 DA-GABA ニューロン (JG DA-GABA ニューロン)

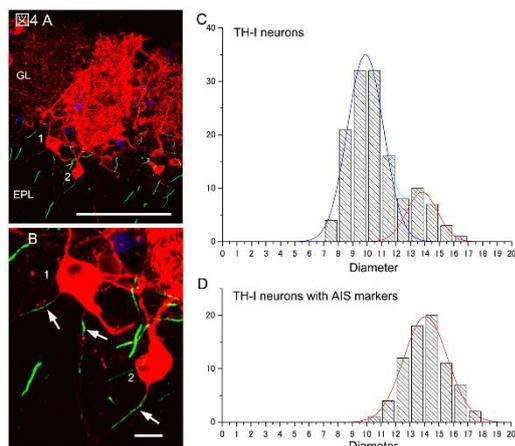
##### 1-1 GAD65 & GAD67

JG DA-GABA ニューロンにおけるGADの2つのアイソフォームGAD65とGAD67の局在を多重蛍光免疫での蛍光強度解析で検討した。全てのGAD65陽性ニューロンはGAD67であった。小型-中型のJG DA-GABAニューロンの多くはGAD65とGAD67ともに陽性であったが、大型のJG DA-GABAニューロンはGAD67であるがGAD65はほとんど陰性或いは弱陽性であった(図2, 3)。



##### 1-2 JG DA-GABA ニューロン細胞体のサイズと AIS マーカー

図4はJG DA-GABAニューロンの細胞体のサイズとAISマーカーで示された軸索の存在の関係を示す。大型のJG DA-GABAニューロンが明確な軸索を有していた。しかし小型-中型JG DA-GABAニューロンのごく一部はAISマーカーが陽性ではないがより感度の高い染色であるABC法で形態的に軸索と考えられる突起を有していた。



### 1-3 ニューロンタイプ

4つの方法で解析した結果少なくとも4タイプのJG DA-GABAニューロンが同定できたが、分類できない第5のその他も見られた。

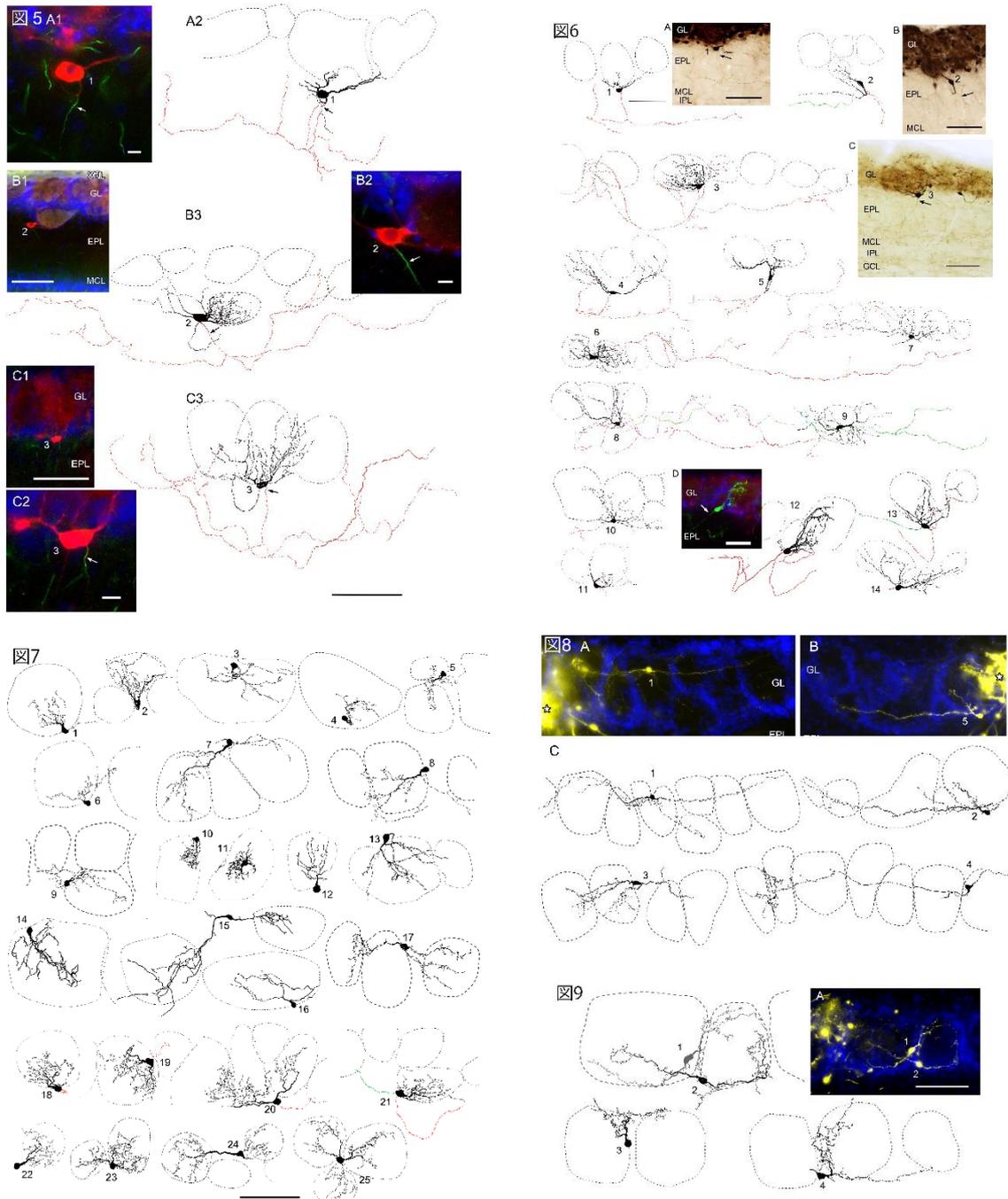
第1は大型傍糸球体細胞(**large periglomerular cell LPG cell**)で樹状突起を1~数個の糸球体内にタフト様に分岐し、軸索を側方に伸ばし、更に糸球体内へと伸ばしている。逆行性トレーサー実験で抑制性糸球体近傍連合ニューロン(**inhibitory juxtglomerular association neuron**)と名付けたニューロンに対応する。このニューロン群では複数の軸索を有するものもかなり高い頻度で見られたことも特徴的である(図5, 6)。

第2は小型傍糸球体細胞(**small periglomerular cell SPG cell**)。重要なことは軸索を有する細胞と無軸索の小型傍糸球体細胞、両者の存在が確認できた(図7)。

第3は糸球体貫通細胞(**transglomerular cell TG cell**)で側方に長い樹状突起を伸ばし、複数の糸球体を貫いている(図8)。

第4は被覆細胞(**incrusting cell IC cell**)で主に糸球体表層部に突起を伸ばしており、小型傍糸球体細胞の1サブタイプとも考えられる(図9)。しかし、これら4タイプに当てはまらないニューロン(第5その他)も多く、どれかのサブタイプと考えてよいのか別のニューロンタイプとすべきか更に検討の必要がある。

SPG cell, TG cell, IC cellは以前解析した **secretagogen** 含有ニューロンでも観察されたことから異なった化学的性質を有したものが存在していることが示唆された。



2) 外網状層～顆粒細胞層の TH 発現細胞

糸球体層以外の層にも形態的に多様な TH 発現ニューロンが散在していた (図 10, 11)。

図10

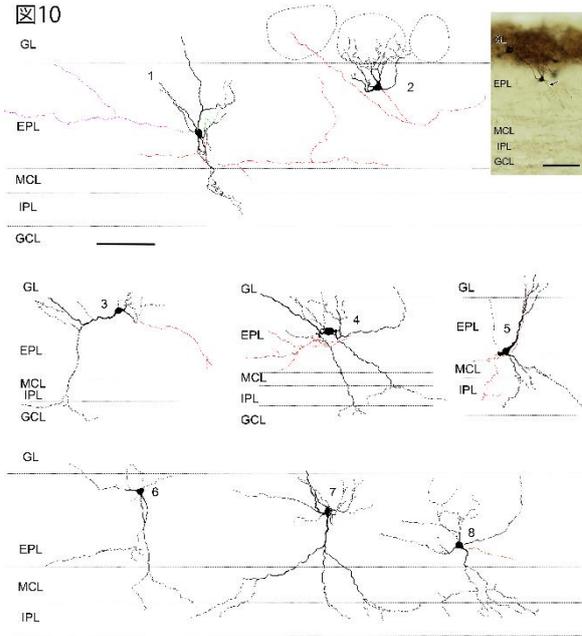
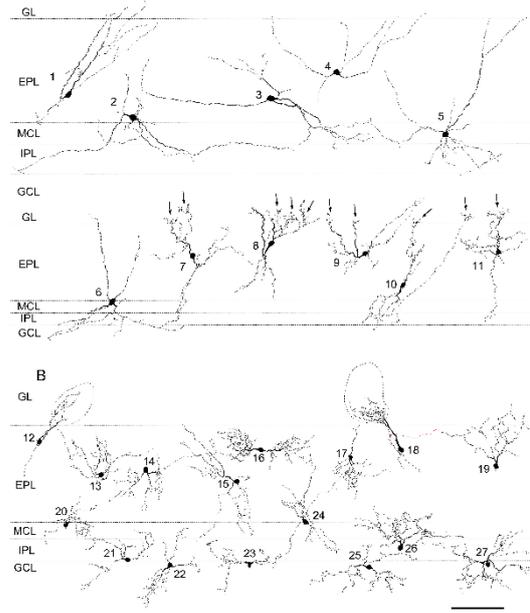
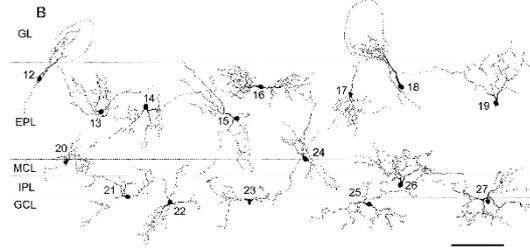


図11A

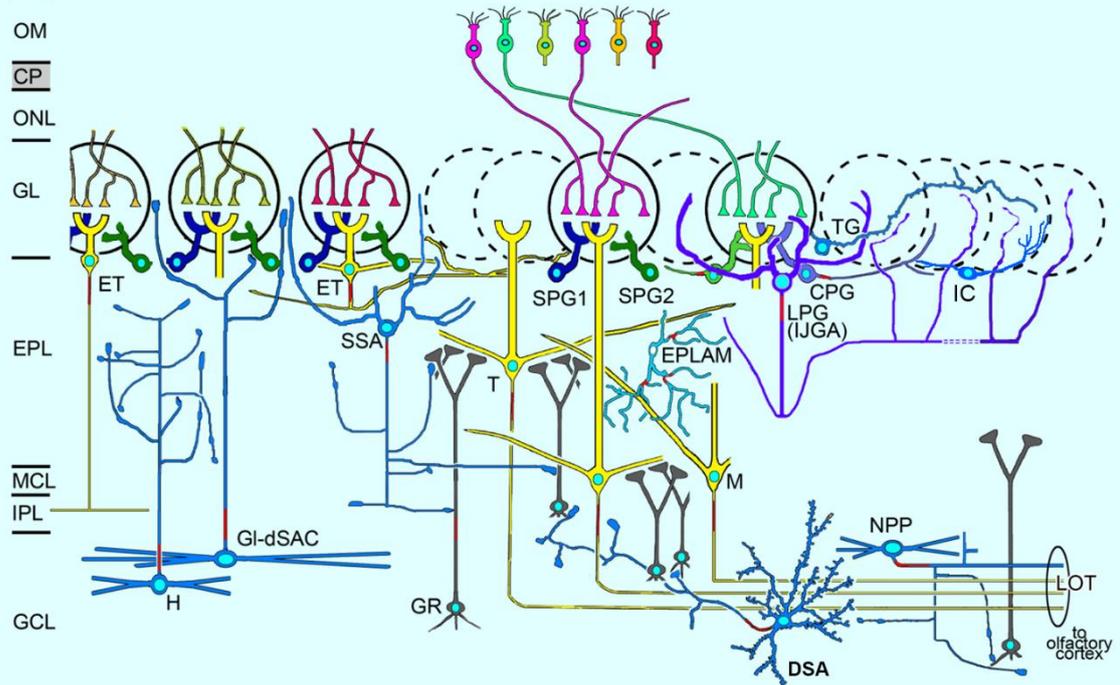


B



これまでの我々の解析を中心に嗅球局所回路のスキームを図 12 に示す。

図12



OM; olfactory mucosa. CP; cribriform plate. ONL; olfactory nerve layer. GL; glomerular layer.  
 EPL; external plexiform layer. MCL; mitral cell layer. IPL; internal plexiform layer. GCL; granule cell layer.  
 CPG; classical periglomerular cell with axon. DSA; deep short axon cell (Blanes cell).  
 EPLAM; anaxonic EPL multipolar cell (parvalbumin positive anaxonic multipolar EPL neuron PVAM).  
 ET; external tufted cell. GI-dSAC; deep short-axon cell with axonal arborization in the GL.  
 GR; granule cell. H; horizontal cell. IC; incrusting cell. LOT; lateral olfactory tract.  
 LPG; large periglomerular cell (LJGA; inhibitory juxtglomerular association neuron, large DA-GABA neuron).  
 M; mitral cell. NPP; nonprincipal projection neuron (GCL-dSAC).  
 SPG1; type 1 small periglomerular cell. SPG2; type2 small periglomerular cell.  
 SSA; superficial short axon cell. T; tufted cell. TG; transglomerular cell.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kosaka Toshio, Pignatelli Angela, Kosaka Katsuko	4. 巻 157
2. 論文標題 Heterogeneity of tyrosine hydroxylase expressing neurons in the main olfactory bulb of the mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 15～33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kosaka Toshio, Kosaka Katsuko	4. 巻 134
2. 論文標題 Calcium-binding protein, secretagogin, specifies the microcellular tegmental nucleus and intermediate and ventral parts of the cuneiform nucleus of the mouse and rat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30～38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosaka Toshio, Yasuda Seiko, Kosaka Katsuko	4. 巻 119
2. 論文標題 Calcium-binding protein, secretagogin, characterizes novel groups of interneurons in the rat striatum	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 53～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2017.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小坂克子
2. 発表標題 嗅覚一次中枢嗅球を構成するニューロンの多様性
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小坂克子・小坂俊夫
2. 発表標題 嗅覚一次中枢・嗅球のニューロン構成の形態的再考
3. 学会等名 第8回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田聖子・佐藤信也・小坂克子
2. 発表標題 病理検査学実習におけるブタ臓器解剖マニュアル導入への試み
3. 学会等名 第13回 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小坂克子、小坂俊夫
2. 発表標題 嗅覚一次中枢嗅球細胞の構造解析：傍系球体細胞各群の3次元構造及びstereologyによる定量解析
3. 学会等名 第7回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小坂克子・吉塚久記・佐野伸之・光武翼
2. 発表標題 多視点3D解剖教育システムの有用性 ;Focus Group Interviewによる質的研究
3. 学会等名 第10回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	小坂 俊夫  (Kosaka Toshio)  (00126054)	国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・特任教授   (32206)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------