

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06932

研究課題名（和文）高次脳中枢による嗅球神経回路調節機構の多様性に関する三次元構造解析

研究課題名（英文）3D-Structural Analysis of Diversity in Centrifugal Regulation for Neural Circuit in the Olfactory Bulb by Other Brain Regions

研究代表者

樋田 一徳 (Toida, Kazunori)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40253405

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）：本研究は、報告者らが従来研究を行ってきた嗅球神経回路の調節機構について、特に高次脳中枢からの遠心性調節に関する一連の解析である。これまでセロトニン（5HT）、アセチルコリン（Ach）のニューロンの遠心性投射について解析を行ってきたが、本研究では更に、ノルアドレナリン（NA）およびヒスタミン（His）ニューロンに焦点を絞って解析を進めた。その結果、NAニューロンは嗅球全層に突起を分布投射し、その投射はAchニューロンと相補的であることがわかり、その結果を論文発表した（Horie et al 2020）。現在Hisニューロンの解析を進め、他のニューロンに比べてより表層に及ぶ分布様式の所見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

報告者らの従来の一連の解析で明らかにした嗅球神経回路に対する調節機構で、従来知られる匂い刺激の求心性調節以外に、他の高次脳中枢からの嗅球への遠心性調節の存在が明らかになった。その投射は多様性があり、嗅球内でも層別に分布様式が異なることは、嗅覚情報処理機構の神経回路が異なる嗅球各層において異なる脳中枢からの影響を受けることを示す。嗅球は脳神経回路の基本的構造モデルとして考えられていることから、他の脳領域の研究に寄与することが大きい。

新型コロナウイルス感染症後遺症の嗅覚脱出の遷延は、匂い入力低下が遠心性入力変化をもたらすとも考えられ、今日的な焦眉の社会的意義のある課題として更なる解析の必要性がある。

研究成果の概要（英文）：The present study revealed centrifugal regulation of the OB with special interests in that by noradrenalin (NA) and histamine (His) neurons, as in contexts of our recent studies for those by serotonin (5HT) and acetylcholine (Ach) neurons. Results indicated NA-neurons distributed throughout all layers in the OB. Interestingly, NA-neurons' fibers were distributed in a complementary style to Ach-neurons and were published in the article (Horie et al 2020). We have continued to analyze His-neurons and revealed their fibers' distribution rather superficially than other neurons and preparing to submit as the article.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅球 遠心性調節 ノルアドレナリン ヒスタミン 神経回路 シナプス エストラジオール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嗅球は明瞭な層構造に豊富な化学物質を含むニューロン構成が種差を超えて類似しており、特異的染色や顕微鏡下の各種の実験が容易である。このような特徴から、我々は嗅覚の一次中枢の嗅球を脳神経回路の基本的構造モデルとして位置付け、レーザー顕微鏡と広範囲モニターデュ・電子顕微鏡連続切片三次元再構築法を直接組み合わせた統合的形態解析 Volume EM Analysis (Kiyokage et al 2017, Mastuno et al 2017) により、嗅球ニューロン及びシナプス結合の立体的構成を明らかにしてきた。その過程で、嗅球は従来信じられてきた以上に多様なニューロンによる精巧な神経回路の存在がわかり、更に神経回路機能に影響を及ぼすと考えられる多くの入力があり、これらの入力の解明が焦点の課題となった。

嗅球には従来、古典的な細胞標識と非選択的・非特異的染色により、他の脳領域からの線維連絡があることがわかってきた。またその線維の投射元となる神経核が解剖学的に、更にその部位にある細胞が免疫組織化学により同定されてきたが、特定の機能を有する高次脳中枢から遠心性に嗅球への投射全体像とその意義は明らかになっていなかった。その中で 2010 年代になり、動物個体や遺伝子レベルでのニューロンの新たな選択的標識によって、従来解析が困難であった嗅覚系への他の脳領域からの様々な調節機構の解析が可能となった。そこで、我々はまず縫線核のセロトニンニューロン (Suzuki et al 2015)、ついで対角帯水平脚のアセチルコリンニューロン (Hamamoto et al 2017) の解析を行い、神経核から嗅球への遠心性投射の全貌と嗅球内シナプス結合の同定を行った。解析の過程で、嗅球には更にノルアドレナリンニューロン、ヒスタミンニューロンなどの解析可能な遠心性ニューロンの存在がわかり、解析を行う準備を整えた。

2. 研究の目的

当研究を開始する時点での以上のような背景から、『高次脳中枢による嗅球神経回路の遠心性調節』の構造基盤の構築を目的に当研究を開始した。これにより、特定の脳機能が嗅覚神経回路にどのように影響を及ぼすかがわかる。生体の感覚機構のより正しい理解を深めることが本研究の主たる目的である。

3. 研究の方法

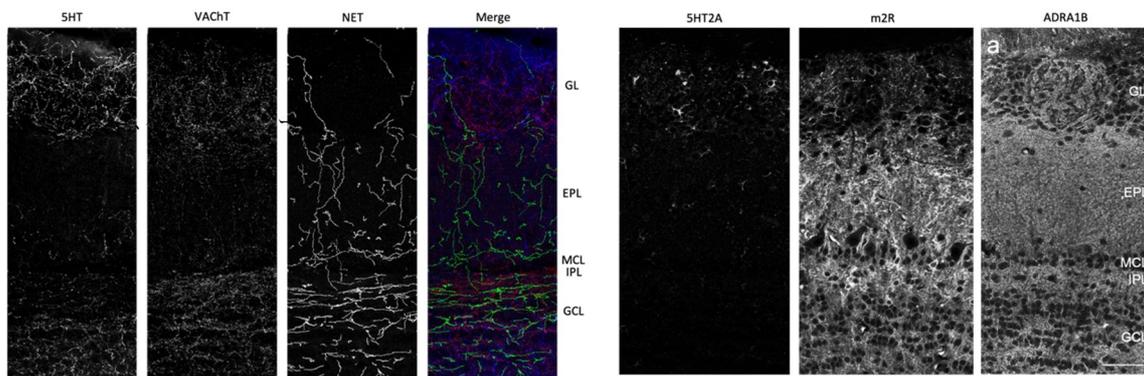
(1) 動物: C57BL6J 系マウス、TH-GFP マウス、ノルアドレナリン合成酵素 (DBH) Cre マウスおよびヒスタミン合成酵素 (HDC) Cre マウスを用いた。

(2) 細胞標識: 各種抗体を用いた免疫細胞化学により嗅球神経回路ニューロン、各種神経核ニューロンを、またノルアドレナリンニューロンおよびヒスタミンニューロンはアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) と各種 Cre マウスを組み合わせた遺伝子導入法により選択的に標識した。

(3) 解析: 多重蛍光標識法によるレーザー顕微鏡解析により、嗅球および神経核の各種ニューロンの細胞レベルの同定を行った。遠心性投射は、AAV を各種 Cre マウスに定位脳投与を行い、選択的標識した後に、NeuroLucida によるトレースで高次脳中枢から嗅球への投射の全体像を解析した。また免疫電子顕微鏡解析により、嗅球神経回路内のシナプス結合の解析を行った。

4. 研究成果

(1) ノルアドレナリンニューロン: ノルアドレナリンニューロンは起始核の青斑に細胞体が存在する。免疫染色では細胞体から突起を出し、脳の各所に向けて広範に突起を伸ばす。このうち嗅球に向けて投射する軸索を同定するために AAV-Cre mouse による解析を行った。その結果、単一のニューロン標識が成功し、青斑から嗅球への投射の全体像が明らかとなった。次に抗 norepinephrine transporter (NET) 抗体により嗅球内の突起の分布を調べると、嗅球の比較的深層に突起が分布しており、表層は少なく、糸球体層では糸球体内には突起は稀で、傍糸球体領域に留まることが多い。シナプスは嗅球投射ニューロンへ非対称性シナプスを形成する他、非典型的シナプス構造が認められ、少なくとも2つのタイプのシナプスが観察された。後者は、従来指摘されている volume transmission に関わる構造と思われる。なお受容体は、突起の分布とは対照的に表層に行くほど分布密度が高いことがわかった。以上の結果をまとめて論文発表を行った。(Horie et al 2021)



これにより、セロトニン (Suzuki et al 2105)、アセチルコリン (Hamamoto et al 2017)、ノルアドレナリン (Horie et al 2021) の3種の遠心性ニューロンの嗅球への投射が明らかとなり、それらを比較するといくつかの知見が得られる。まず、線維分布の点からいうと、セロトニンニューロンは全層に分布するが糸球体層と顆粒細胞層に多い。それよりやや少ないもののアセチルコリンニューロンも同様の分布パターンを示す。興味深いのはノルアドレナリンニューロンで、アセチルコリンとはほぼ相補的なブンプパターンを示す。(以上、上左図)

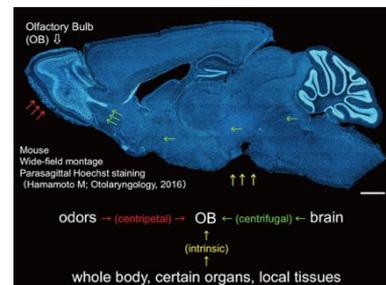
受容体は、セロトニン受容体はほぼ線維分布と同じ局在を示すが、アセチルコリンとノルアドレナリンは、共に線維分布とは相補的な局在を示し、よって受容体局在も両者は相補的である。(以上、上右図) 以上の所見を更に詳細に検討し、今秋9月の第20回国際顕微鏡学会(釜山・韓国)にて発表予定としており (Horie et al 2023)、併せて現在論文作成中である。

(2) ヒスタミンニューロン: ヒスタミンニューロンは腹側前乳頭核に細胞体が存在する。これらは摂食に関係することが知られているが、このニューロンが嗅球に投射しているかをまず検証した。方法としては嗅球へ逆行性トレーサー FluoroGold FG を定位脳的に投与し、その後スライスを作製し、ヒスタミン合成酵素 HDC に対する抗体と多重染色した。その結果、腹側前乳頭核の FG 陽性/HDC 陽性細胞を観察し、HDC 陽性ヒスタミンニューロンが嗅球へ投射することが明らかとなり、同核が起始核であることを確認した。現在は嗅球への投射ニューロンの神経核内の局在と定量解析を行っている。更に HDC-Cre マウスの同核に AAV を投与し、ヒスタミンニューロンを選択的に標識した上でトレースを行なっている。嗅球内では後半に分布するものの比較的表層に突起が多く、更に解析を進めている。以上の結果を、第128回日本解剖学会にて発表を行い (Minami et al 2023)、現在論文作成をすすめている。

5 . まとめ

外界の匂い情報を嗅球で識別し高次脳中枢へ送る。この伝達の中で、嗅球神経回路は求心性入力、遠心性入力、そして内因性因子といった様々な調節を受ける。ONによる匂い刺激 = 求心性入力は遮断や障害が嗅球神経回路に影響を及ぼすことはよく知られている。遠心性入力とは高次脳中枢（脳領域）からの調節で、存在が示唆されるセロトニン（Suzuki et al 2015）、アセチルコリン（Hamamoto et al 2017）、ノルアドレナリン（Horie et al 2021）の各ニューロンを、遺伝子改変マウスや遺伝子導入による選択的ニューロン標識法により、嗅球内の異種ニューロン群への特異的調節支配を明らかにした。また最近、全身の生理状況による内因性因子として、エストラジオールによる匂い識別の神経回路へ影響を、デジタル超高压電子顕微鏡で定量的に明らかにした（Kiyokage et al 2023）。

このように匂い情報は、外界環境（求心性）脳機能（遠心性）全身生理条件（内因性）により影響を受け、生存に必要な嗅覚機能を発現していると思われる。以上の結果は右図のようにまとめられる。これらの機能がどのような条件下でどのような生体反応として働くのかを、様々な手法を駆使して形態学的に解明したいと考えている。



本研究の遂行中、超高压電子顕微鏡による免疫反応の細胞内空間的定量解析の手法を確立した（Sato et al 2020）。本研究の開始時点に比べ、コンピューターによる定量解析、電子線トモグラフィ、ネットワーク顕微鏡解析が進み、今後の解析の可能性が広がったことは意義深い。

5 . 謝辞

本研究は、川崎医療福祉大学・清蔭恵美教授、川崎医科大学・堀江沙和講師、同・佐藤慧太助教、川崎医科大学大学院・南裕加里博士大学院生と共に行った。また研究の一部は、順天堂大学大学院・日置寛之教授、大阪大学超高压電子顕微鏡センター・市川聡特任教授との共同研究として推進した。併せて感謝の意を表する次第である。

6 . 文献

Suzuki Y. et al, J. Comp. Neurol. 2015 523:262-280

Kiyokage E. et al, J. Comp. Neurol. 2017 525:1059-1074

Matsuno T et al, J. Comp. Neurol. 2017 525:1633-1648

Hamamoto M. et al, J. Comp. Neurol. 2017 525:574-591

Sato K et al Neurosci Lett. 2020 738 doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135386

Horie S. et al, J. Comp. Neurol. 2021 529:2189-2208

Kiyokage E. et al, J. Comp. Neurol. 2023 531:528-547

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato K., Kiyokage E., Ichikawa S. & Toida K.	4. 巻 738
2. 論文標題 Variations in GABA immunoreactivity among granule cells of the mouse olfactory bulb, as revealed by high-voltage electron microscopy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135386	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 Horie S., Kiyokage E., Hayashi S., Inoue K., Sohn J., Hioki H., Furuta T., Toida K.	4. 巻 529
2. 論文標題 Structural Basis for Noradrenergic Regulation of Neural Circuits in the Mouse Olfactory Bulb	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2189, 2208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.25085	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 Hayashi S., Hoerder-Suabedissen A., Kiyokage E., MacLachlan C., Toida K., Knott G. and Molnar Z.	4. 巻 31
2. 論文標題 Maturation of complex synaptic connections of layer 5 cortical axons in the posterior thalamic nucleus requires SNAP25	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 2625, 2638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135386	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 (011)清陰恵美、樋田一徳	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第4回 ~サンプリング~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 396, 397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 清蔭恵美、樋田一徳	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第5回 ~Disectorの実際~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 524, 525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 樋田一徳、清蔭恵美	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第6回 ~デジタル化へ~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 668, 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 樋田一徳、清蔭恵美	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第7回 ~Digital Stereology~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 796, 797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 樋田一徳、清蔭恵美	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第8回 ~Optical Disector~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 936, 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 清陰恵美、樋田一徳	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第9回 ~Optical Disector: 空間的解析へ~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1060, 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 清陰恵美、樋田一徳	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第10回 ~空間的解析: デジタルトレース~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1195, 1196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 樋田一徳、清陰恵美	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第11回 ~空間的解析: トモグラフィー~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1328, 1329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 樋田一徳、清陰恵美	4. 巻 38
2. 論文標題 Stereologyへの招待 第12回 (最終回) ~立体学的解析: 発展の可能性~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1492, 1493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 樋田一徳（責任著者）、清蔭恵美	4. 巻 38
2. 論文標題 連載 “Stereologyへの招待” 第6回「デジタル化へ」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 出版予定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 清蔭恵美、樋田一徳（責任著者）	4. 巻 38
2. 論文標題 連載 “Stereologyへの招待” 第5回「Disectorの実際」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 524, 525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 清蔭恵美、樋田一徳（責任著者）	4. 巻 38
2. 論文標題 連載 “Stereologyへの招待” 第4回「サンプリング」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 396, 397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 清蔭恵美、樋田一徳（責任著者）	4. 巻 38
2. 論文標題 連載 “Stereologyへの招待” 第3回「細胞のカウント：disector法」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 268, 269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 樋田一徳(責任著者)、清蔭恵美	4. 巻 38
2. 論文標題 連載 “Stereologyへの招待” 第2回「バイアスについて」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 120, 121
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 樋田一徳(責任著者)、清蔭恵美	4. 巻 38
2. 論文標題 連載 “Stereologyへの招待” 第1回「Stereologyとは？」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4, 5
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 清蔭恵美、佐藤慧太、樋田一徳
2. 発表標題 嗅覚神経回路の解析：超高压電子顕微鏡を用いた物質局在の比較
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第63回シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋田一徳
2. 発表標題 電子顕微鏡による嗅球神経回路の三次元構造解析
3. 学会等名 ABiS Symposium -Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging- 電子顕微鏡イメージングの最先端と未来(『濱 清 Session ~ Truth is Beauty ~』)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤慧太、清蔭恵美、樋田一徳
2. 発表標題 Analysis of the diversity of GABA-immunoreactivity in interneurons of mouse olfactory bulb using correlative light and electron microscopy
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato K., Kiyokage E., Toida K.
2. 発表標題 Quantitative analysis of the diversity of GABA-immunoreactivity in interneurons of mouse olfactory bulb.
3. 学会等名 第125回解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kiyokage E., Toida K.
2. 発表標題 Estradiol effects on synaptic plasticity of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清蔭恵美
2. 発表標題 嗅球ドーパミン作動性ニューロンに対するエストロゲンの影響
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学解剖学教室ホームページ http://www.kawasaki-m.ac.jp/anatomy/ 川崎医科大学解剖学教室 http://www.kawasaki-m.ac.jp/anatomy/
--

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	清陰 恵美 (Kiyokage Emi) (30543392)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授 (35309)	
研究分担者	堀江 沙和 (Horie Sawa) (40609666)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	
研究分担者	佐藤 慧太 (Keita Satoh) (80812578)	川崎医科大学・医学部・助教 (35303)	

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
---------	---------