

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：19K09922

研究課題名(和文) 嗅球に対するノルアドレナリン、アセチルコリン二重支配による調節機構の形態学的解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of the modulating mechanism of double innervation by noradrenergic and cholinergic neurons in the olfactory bulb

研究代表者

堀江 沙和 (Sawa, Horie)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40609666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウスの嗅覚情報調節に関わる神経の一つである、脳の他の領域から嗅球に入る、遠心性の入力線維、ノルアドレナリン(NA)とアセチルコリン(Ach)作動性神経に着目し、その神経回路を形態学的に解析した。アデノ随伴ウイルスを注入したトレース実験により、NA及びAch作動性線維の投射経路が明らかとなった。また、免疫染色法及び電子顕微鏡による微細構造解析により、嗅球内ではNA線維とAch線維は相補的な分布を示しており、嗅覚情報の調節において、相補的な役割をしていることが示唆された。現在、各神経線維のターゲットや受容体の分布について、解析をおこなっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚障害には、末梢の感覚器に起因するも、嗅覚情報処理の場である中枢性のものがある。この中枢性嗅覚障害のうち、ドーパミンの欠乏によるパーキンソン病患者では、70-90%で著しい嗅覚機能障害が起こると言われている。

本研究により、遠心性のノルアドレナリンやアセチルコリン作動性線維と、嗅球内のニューロンとの関係が明らかになることで、嗅覚情報の調節機構の神経回路がわかり、中枢性の嗅覚障害に対する治療法や薬の作製の為の一助となる。また、嗅球の構造や情報の出力、調節機構は嗅球と同様に層構造を持つ、大脳皮質などにも通じ、脳の他の領域でも応用が可能であると期待している。

研究成果の概要(英文)：Olfactory bulb (OB) is known to receive several types of centrifugal fibers originating from other brain regions. With special interest in noradrenergic (NA) and cholinergic (Ach) centrifugal fibers, I applied morphological analysis to them to establish the neural circuit for the modulation of olfactory information. I identified the pathways of NA and Ach fibers from their origins to OB by tracing experiments with Adeno-associated virus injection. Interestingly, I found that NA and Ach fibers were localized complementary in the OB using immunohistochemistry and electron microscopic methods. Thus, it was suggested that NA and Ach fibers take place as complementary roles in the OB. I have continued to analyze about targets of NA and Ach fibers and the localization of receptors of noradrenaline and acetylcholine in the OB.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅球 神経回路 ノルアドレナリン アセチルコリン

## 1. 研究開始当初の背景

においの情報は嗅粘膜の嗅細胞で受容され、1次中枢である嗅球にて処理され、さらに高次中枢へと伝えられる。嗅球は嗅球は表層から順に、嗅神経層 (ONL)、系球体層 (GLL)、外網状層 (EPL)、僧帽細胞層 (MCL)、内網状層 (IPL)、顆粒細胞層 (GCL) の6層構造をしており、多種多様なニューロンが存在し、複雑な神経回路を形成している。嗅球における神経細胞のエLEMENTは次の3つ存在する。output; 投射ニューロン (MC)、input; 入力 (ON)、interneuron; 介在ニューロン (PG など)。末梢からのおいの情報は、系球体層において、嗅神経から僧帽細胞へと伝えられる。系球体周囲には傍系球体細胞 (PG) 等が存在し、情報の修飾が行われている。嗅球への入力線維は嗅神経 (ON) のほかに、遠心性の入力が存在する。遠心性の入力についてはこれまで、セロトニン (5HT)、アセチルコリン (ACh)、ノルアドレナリン (NA) 作動性線維の起始核および、そこから嗅球へ投射していることは知られていた。しかしながら、それらは1960年代に神経変性によるものや、1980年代にトレーサー (WGA-HRP など) を用いた方法で行われており、起始核における細胞群や線維束としては証明されていたが、投射経路そのものはわかっていなかった。そこで、所属研究室ではこれまで、5HT および ACh ニューロンの起始核から嗅球までの単一ニューロンレベルでの投射経路を明らかにしてきた (Suzuki et al., 2015; Hamamoto et al., 2017)。しかしながら、NA ニューロンについてはまだ不明なままだった。

## 2. 研究の目的

本研究では、未だ未解明であった遠心性入力の1つ、NA 作動性線維と、これまでに報告してきた遠心性の ACh 作動性線維に着目し、これらの嗅球における神経回路およびそれらの調節機構を解明する事を目的とする。具体的には、NA 作動性線維の起始核から嗅球までの投射経路と、嗅球内での局在を明らかにする。NA 及び ACh 線維の嗅球内での局在を比較し、それぞれのターゲット電子顕微鏡を用いてそのシナプスレベルで調べることで、嗅球における NA 及び ACh の機能を明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では大きく分けて以下の3つの方法を用いて解析を行った。

単一ニューロン標識法により可視化した細胞のトレースによる投射経路の解析  
アデノ随伴ウイルス (AAV) をノルアドレナリンの合成酵素である DBH (Dopamine-hydroxylase) の cre マウスに注入し、約2週間のサバイバルタイム後に灌流固定し、標本作製して、単一細胞レベルで NA ニューロンを可視化、トレースし、3次元立体構築を行った。

電子顕微鏡による嗅球内でのシナプスレベルでの NA 及び ACh 作動性神経線維の微細構造解析

ノルアドレナリンニューロンを norepinephrine transporter (NET) の抗体でアセチルコリンを vesicular acetylcholine transporter (VAChT) の抗体を用いて可視化し、嗅球内での各線維の局在を調べた。さらに、電子顕微鏡標本作製し、シナプスの有無を含

めたターゲットの解析を行った。

嗅球内での NA 及び Ach 作動性線維の局在及びコンタクトしている細胞の同定 NET 抗体及び VChT 抗体及び、各種ニューロンマーカーを用いて多重染色をし、光学顕微鏡（共焦点レーザー顕微鏡を使用）で解析した。

#### 4. 研究成果

NA作動性線維の単一細胞標識法を行い、トレースをした結果、NAニューロンは起始核である青斑核から、peduncle tegmental nucleus, medial lemniscusを通り、thalamusとhypothalamusの間を通過し、fornixとolfactory tubercleの上方を通過したのちに嗅球に達することが明らかとなった（図1, Horie et al., 2021）。嗅球内では、嗅球深層より表層まで投射していたが、表層の糸球体層では、糸球体の中には入らず、糸球体周囲に線維を伸ばしていた。一方、Ach作動性神経線維を免疫染色法により可視化すると、嗅球内の全層に局在しているが、外網状層ではNAとは反対に表層に多く局在し、糸球体層では糸球体内に多くの線維が局在していた（図2）。つまり、興味深いことに、嗅球内におけるNA作動性線維とAch作動性線維の局在は相補的であり、嗅覚情報処理において、相補的な役割をしていることが示唆された。

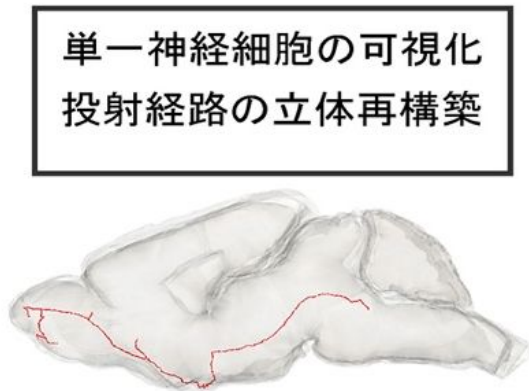


図1. ノルアドレナリン (NA) 作動線維の起始核から嗅球までの投射経路

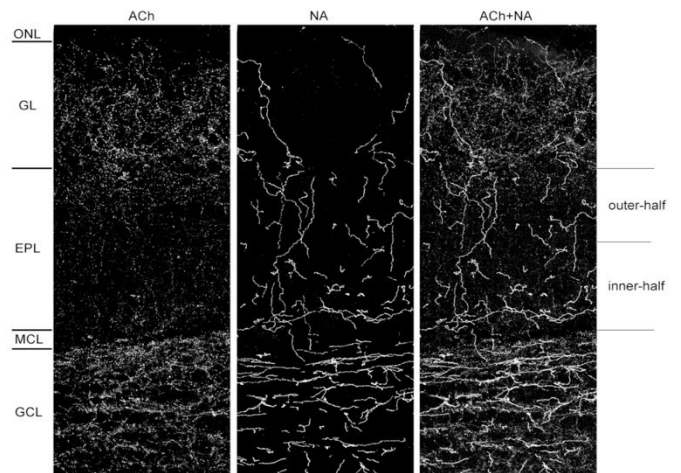


図2. 嗅球におけるアセチルコリン (ACh) およびノルアドレナリン (NA) 作動線維の免疫蛍光染色像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Horie Sawa, Kiyokage Emi, Hayashi Shuichi, Inoue Kanako, Sohn Jaerin, Hioki Hiroyuki, Furuta Takahiro, Toida Kazunori	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 Horie Sawa, Kiyokage Emi, Hayashi Shuichi, Inoue Kanako, Sohn Jaerin, Hioki Hiroyuki, Furuta Takahiro, Toida Kazunori	4. 巻 529
2. 論文標題 Cover Image, Volume 529, Issue 9	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25161	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学 解剖学教室 http://www.kawasaki-m.ac.jp/anatomy/index.html Cover Image, Volume 529, Issue 9 https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.25161 教室ホームページ 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
---------------------------	-----------------------	----

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