

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300120

研究課題名（和文） 嗅覚高次中枢の細胞構成及び嗅球とのシナプス結合関係の形態学的解析

研究課題名（英文） Analyses on the cellular and synaptic organization of the olfactory bulb and related higher olfactory centers

## 研究代表者

小坂 俊夫 (KOSAKA TOSHIO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00126054

## 研究成果の概要（和文）：

嗅球内には多様ないわゆる GABA 作動性“短軸索ニューロン short axon cell SA”が存在し、数の上では比較的少数であるが機能的には重視されている。以前の検討では明らかに従来投射ニューロンとされてきた mitral/tufted cells と異なる NOS 陽性ニューロンの一部が投射ニューロンに含まれることを明らかとした。本研究では更に、“短軸索ニューロン”と分類されてきた calbindin 陽性ニューロンの一部も同様に投射ニューロンであることを明らかにした。このことから我々は嗅球における“非主投射ニューロン NPP”を提唱した。しかし、重要なことは、嗅覚関連高次脳領域である島皮質、嗅結節、視床下部等に逆行性トレーサー fluorogold を注入し標識されるニューロンの大部分は嗅球ニューロンの化学的マーカーでは染色されなかった。このことは“非主投射ニューロン NPP”は化学的性質の面から多様であり、これまで同定した NOS 陽性、calbindin 陽性“非主投射ニューロン NPP”はむしろごく一部であることが明らかとなった。一方、連合ニューロンについて逆行性及び順行性トレーサーで検討した結果、嗅球内、特に、糸球体層には主として大型の dopaminergic-GABAergic neurons が担っている抑制性連合性結合 IJGA (inhibitory juxtglomerular association system) と external tufted cells が担っている興奮性連合性結合 EJGA (excitatory juxtglomerular association system) の 2 種の連合性結合が存在すると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

In the olfactory bulb, the first center of the olfaction, there are various types of GABAergic so-called “short-axon cells”, which are rather small in number but regarded to be functionally important in the information processing. In our previous studies we revealed that some of NOS positive neurons, apparently different from mitral/tufted cells and thus considered as “short-axon cells”, are projection neurons. In the present study we further revealed that some of calbindin positive neurons, also regarded as “short-axon cells”, are projection neurons. These observations led us to propose “nonprincipal projection neurons, NPP neurons, in the olfactory bulb.” However, importantly, only a small population of those NPP neurons have been characterized chemically so far, indicating that NPP neurons might be heterogeneous in chemical properties. On the other hand we also revealed two types of intrabulbar association systems located near the glomerular layer; one is inhibitory juxtglomerular association system IJGA in which the large type of dopaminergic-GABAergic neurons play the major role, and the other is excitatory juxtglomerular association system EJGA, in which the external tufted cells play the major role.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学

キーワード：①解剖学 ②神経科学 ③脳・神経

1. 研究開始当初の背景

嗅覚系は、匂い分子レセプターのクローニングから飛躍的に解析が進み、分子認識システムのモデルとして重要視されている。多くの形態学的・生理学的解析で嗅球系球体で行われている情報処理が、嗅覚情報処理において極めて高い重要性を占め、更に糸球体外の神経回路もその最終的な出力に大きな意味をもっていることが示唆されている。我々はこれまで嗅球内の構成ニューロン及びそれら間のシナプス結合・ギャップ結合の解析を進め従来考えられていたよりはるかに複雑な嗅球神経回路を明らかにしてきた。一方、**immediately early gene** の発現や電気生理学的な解析により嗅球ニューロンがごく限られた匂い分子に応答するのに対して、嗅覚系上位中枢である前嗅核や梨状葉のニューロンでははるかに広い匂い分子に応答することが明らかになっている。このことから、嗅覚系上位中枢である前嗅核や梨状葉のニューロンではある程度の情報の統合が行われていると考えられている。一方、嗅覚の一次中枢嗅球からの出力はこの前嗅核や梨状葉両者のみでなく他の多様な脳部位にも投射し、逆に嗅覚高次中枢、前脳基底部、脳幹から嗅球に入力していることはよく知られている。我々はマウス嗅球構成ニューロンの解析を体系的に進め、投射ニューロン的一种である **tufted cells** が多様である可能性、更に、従来介在ニューロンと考えられていたいわゆる **short-axon cells** のあるグループは決して介在ニューロンではなく投射ニューロンの一部である可能性を示唆する所見を得た。従って、嗅球の出力ニューロンを検討し直すことが嗅覚系全体を考える上で極めて重要となってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は(1) 嗅球の出力ニューロン・連合ニューロン・介在ニューロンの検討、(2)

他の脳各部位からの入力嗅球でのターゲットの同定、シナプス結合の解析、(3) 前嗅核の形態学的解析の3つのである。目的の第1は従来嗅球からの入力があるとされている嗅覚高次中枢を含めた多くの脳部位との関係を体系的なトレーサー実験で解析し、各部位への出力がどのようなニューロングループによって担われているかを免疫細胞化学的・形態学的に明らかにすることである。目的の第2は他の脳各部位からの嗅球への入力ターゲットは何か、どのようなシナプス結合作るのかを、逆行性及び順行性トレーサー法と免疫細胞化学を組み合わせで解析するものである。特に、多様な **short-axon cells** を嗅球への入力ターゲットとして重視して解析を進める。嗅球に最も近い嗅覚高次中枢であり、前交連により左右の嗅球をつなぐ位置にある前嗅核についてはその領域区分、細胞構成という最も基本的な形態学的詳細が未解明であるのが現状である。従って、嗅覚系の理解を進める上で不可欠の前嗅核についての形態学的解析が本研究の第3の目的である。

3. 研究の方法

(1) 嗅球の出力ニューロン・連合ニューロン・介在ニューロンの検討

これまでの多くの研究により嗅球からの線維を受けている領域についてはかなりの所見が集積している。また、嗅球内の離れた部位を結ぶ連合ニューロンも知られている。そのような出力ニューロンの投射領域に逆行性トレーサー (**Fluorogold, cholera toxin B subunit, 蛍光マイクロビーズ**等)を脳定位固定的に **iontophoresis** であるいは圧注入し、適当な生存期間の後に動物を経心的に灌流固定した。また、ごく微量の逆行性トレーサーを嗅球内の限局した部位・層に **iontophoresis** により注入し連合性の結合を検討した。50µm厚スライスを作成し、注入部位の広が

り及び嗅球での標識ニューロンを検討した。嗅球内の逆行性に標識されたニューロンについては、蛍光多重免疫細胞化学染色による逆行性標識ニューロンの化学的性質の同定を進めた。

(2) 他の脳各部位からの入力嗅球内でのターゲット、及び嗅球内の限局した部位からの入力嗅球内でのターゲットの検討

これまでの多くの研究により嗅球に線維を出している領域は嗅覚系に密接に関連した領域と嗅覚系に直接には関連していない領域からの線維があることがわかっている。前者の領域には前嗅核、梨状葉～嗅内野、扁桃体、外側嗅索核があり、後者の領域には前脳基底部、脳幹部（縫線核、青班核）がある。このような領域に順行性トレーサーであるBDAあるいはPHALを脳定位固定的に注入し投射線維・終末部を標識し、嗅球内のニューロン、特に、免疫細胞化学染色で標識できる様々な介在ニューロン群との結合を検討した。また、本件計画を開始する直前に我々が明らかにした嗅球連合性ニューロンの出力についてもBDA、PHALあるいはcholera toxin B subunitをトレーサーとして検討した。

(3) 前嗅核の形態学的解析

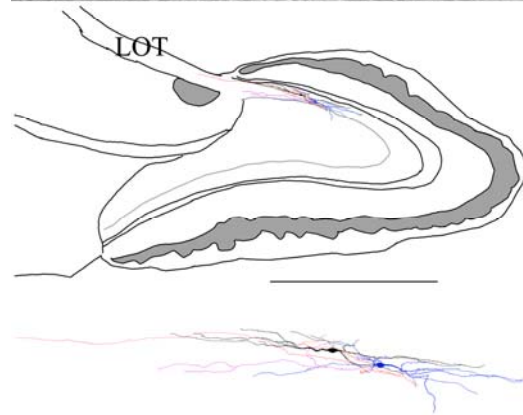
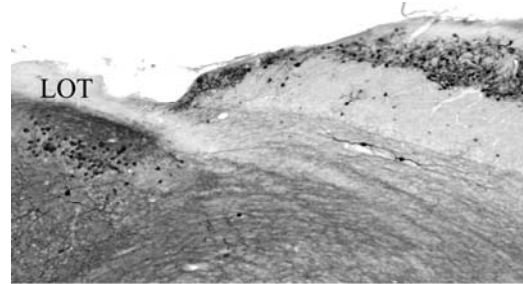
さまざまな化学的マーカー(カルシウム結合蛋白、NOS等)により細胞構築を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 非主投射ニューロンNPPの提唱

嗅球内には多様ないわゆるGABA作動性“短軸索ニューロンshort axon cell SA”が存在している。これらのGABA作動性短軸索ニューロンは嗅球の主なGABA作動性介在ニューロンであるgranule cellsやperiglomerular cellsにくらべて大型で、数の上では比較的少数であるが、情報処理の面では抑制性ニューロンの抑制という点で、機能的に重視されている。これらはその“短軸索ニューロンshort axon cell SA”という名称が意味するように、従来軸索が嗅球内で終わっている介在ニューロンと考えられてきた。しかし、我々の一連のトレーサー実験等で“短軸索ニューロン”の一部は嗅球外に投射していることが明らかとなった。以前の検討では明らかに従来投射ニューロンとされてきたmitral/tufted cellsと異なるNOS陽性ニューロンが投射ニューロンに含まれることを明らかとしたが、本研究では更に、“短軸索ニューロン”と分類されてきたcalbindin陽性ニューロンの一部も同様に投射ニューロンであることを明らかにした。特に、トレーサー実験のみでなくcalbindin陽性ニューロンの形態を連続切片で詳細に検討した結果、嗅球の出力線維束である外側嗅索LOT

に軸索を投射しているcalbindin陽性ニューロンが同定できた(下図)。

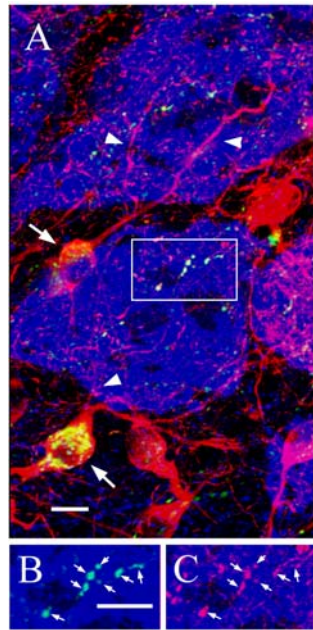


このことから我々は嗅球における“非主投射ニューロンNPP”を提唱した。しかし、重要なことは、嗅覚関連高次脳領域である島皮質、嗅結節、視床下部等に逆行性トレーサーfluorogoldを注入し標識されるニューロンの化学的性質を検討した結果、逆行性トレーサーで標識されたニューロンの大部分はparvalbumin, calretinin, secretagogin等の嗅球ニューロンの化学的マーカーでは染色されなかった。このことは“非主投射ニューロンNPP”は化学的性質の面から多様であり、これまで同定したNOS陽性、calbindin陽性“非主投射ニューロンNPP”はむしろごく一部であることが明らかとなった。更に、嗅球外の異なった部位にトレーサーを注入した時、それぞれ嗅球内の異なったニューロン群が逆行性に標識される所見を得た。このことは特定の“非主投射ニューロン”はそれぞれ異なった嗅覚関連高次脳領域に投射している可能性を示唆している。このような所見は、今後、体系的なトレーサー実験で異なった部位に投射している“非主投射ニューロンNPP”の違いを明確にする必要性を示している。

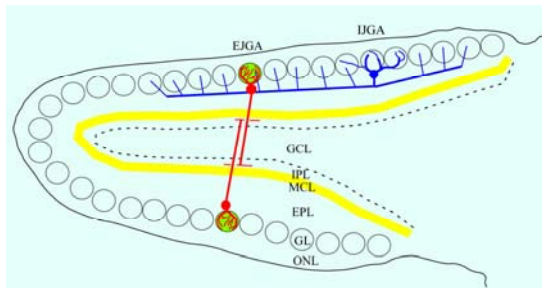
(2) 抑制性連合性結合と興奮性連合結合の提唱

連合ニューロンについて逆行性及び順行性トレーサーで検討した結果、我々が発見した大型のtyrosine hydroxylase陽性ニューロン所謂dopaminergic-GABAergic neuronsは同一嗅球内で軸索をかなり遠くまで延ばしている

ことが明らかとなった。しかも、かなり特異的に糸球体内、特に、嗅神経終末と mitral/tufted cell primary dendritesのシナプス部位である ON zoneに多くの軸索終末を出していた(右図)。このことから dopaminergic-GABAergic neuronsは嗅神経終末及び mitral/tufted cell primary dendritesから興奮性入力を受けることを考慮すると、



おそらく細胞体から比較的離れた部位では主に軸索終末による所謂側方抑制の主役であることが推測できた。これまで多くの研究では、external tufted cellsが同一嗅球内の内外側の対応する部位を結合しているとされている。従って、嗅球内糸球体層にはdopaminergic-GABAergic neuronsが担っている抑制性連合性結合IJGA (inhibitory juxtglomerular association system)とexternal tufted cellsが担っている興奮性連合性結合EJGA (excitatory juxtglomerular association system)の2種の連合性結合が存在すると考えられる(下図)。



#### 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9件)

1. T. Kosaka and K. Kosaka (2011) "Interneurons" in the olfactory bulb revisited. *Neurosci Res.* 69, 93-99. 査読有
2. T. Kosaka and K. Kosaka (2010) Heterogeneity of calbindin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb: I. General description. *Neurosci*

*Res.* 67, 275-292 査読有

3. S. Jinno and T. Kosaka (2010) Stereological estimation of numerical densities of glutamatergic principal neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus* 20, 829-840. 査読有
4. S. Jinno and T. Kosaka (2009) Neuronal circuit-dependent alterations in expression of two isoforms of glutamic acid decarboxylase in the hippocampus following electroconvulsive shock: A stereology-based study. *Hippocampus* 19, 1130-1141. 査読有
5. K. Kosaka, K. Sawai, C. Tanaka, M. Imafuji, A. Kamei and T. Kosaka (2009) Distinct domainial and lamellar distribution of clustered lipofuscin granules in microglia in the main olfactory bulb of young mice. *Neurosci Res.* 65, 286-295. 査読有
6. T. Kosaka and K. Kosaka (2009) Two types of tyrosine hydroxylase positive GABAergic juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb are different in their time of origin. *Neurosci Res.* 64, 436-441. 査読有
7. T. Kosaka, M. Komada and K. Kosaka (2008) Sodium channel cluster,  $\beta$ IV-spectrin and ankyrinG positive "hot spots" on dendritic segments of parvalbumin-containing neurons and some other neurons in the mouse and rat main olfactory bulbs. *Neurosci Res* 62, 176-186. 査読有
8. S. Jinno and T. Kosaka (2008) Reduction of Iba1-expressing microglial process density in the hippocampus following electroconvulsive shock. *Exp Neurol* 212, 440-447. 査読有
9. T. Kosaka and K. Kosaka (2008) Tyrosine hydroxylase-positive GABAergic juxtglomerular neurons are the main source of the interglomerular connections in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res* 60, 349-354. 査読有

[学会発表] (計7件)

1. 神野尚三、小坂俊夫、加齢に伴う海馬神経新生の現象には領域による差異が存在する、第115回日本解剖学会総会、2010.3.30. 盛岡
2. 小坂克子、小坂俊夫、若年令マウス主嗅球に見られた老化色素リポフスチンの分布：層特異性と背腹領域間における顕著な差

異, 第 115 回日本解剖学会総会, 2010. 3. 29.  
盛岡

3. 田嶋香江、福田孝一、小坂俊夫, マウス  
線条体 patch は場所に依存した免疫染色特性  
をもつ, 第 115 回日本解剖学会総  
会, 2010. 3. 28. 盛岡

4. 田嶋香江、福田孝一、小坂俊夫, マウス  
線条体の patch 領域内部における不均一性の  
解析, 日本解剖学会第 65 回九州支部学術集  
会, 2009. 11. 7. 那覇

5. 小坂克子、小坂俊夫, マウス嗅球におけ  
る parvalbumin 陽性ニューロン樹状突起に  
パッチ状に分布する軸索初節部様 hot spots,  
第 114 回日本解剖学会総会, 2009. 3. 30. 岡山

6. 神野尚三、小坂俊夫, マウス海馬主細胞  
の組織学的構築には長軸方向による差異が  
存在する, 第 114 回日本解剖学会総  
会, 2009. 3. 29. 岡山

7. 福田孝一、小坂俊夫, 線条体のパルプア  
ルブミン含有 GABA 作動性神経細胞間に形成  
されるギャップ結合の形態学的特徴, 日本解  
剖学会第 64 回九州支部学術集会, 2008. 10. 25.  
福岡

[図書] (計 1 件)

T. Kosaka and K. Kosaka (2009) Olfactory  
bulb anatomy. In: Larry Squire (Ed.)  
Encyclopedia of Neuroscience, Elsevier,  
Amsterdam, vol. 7 (total pages 1269), pp.  
59-69. Oxford: Academic Press. 査読有

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小坂 俊夫 (KOSAKA TOSHIO)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：00126054

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：