

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700320

研究課題名(和文) 大脳皮質錐体細胞サブタイプの樹状突起上シナプスマップ

研究課題名(英文) Distribution pattern of excitatory synapse on dendrite of neocortical pyramidal neurons

研究代表者

重松 直樹 (SHIGEMTSU NAOKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：30469613

研究成果の概要(和文)：大脳皮質内の抑制性の介在ニューロンと、興奮性の錐体細胞に対する皮質-皮質間、視床-皮質間の興奮性入力パターンについて、免疫組織化学的手法を用いた解析を行った。その結果、神経細胞によって異なる興奮性入力パターンが存在することが明らかとなった。このことは、大脳皮質の神経細胞が、細胞特有の興奮性制御を受けていることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：I tried to investigate the differential distribution patterns of cortico-cortical, thalamocortical excitatory inputs on inhibitory interneurons and excitatory pyramidal neurons using immunohistochemical staining methods. The data of my experiments shows each type of neuron has distinctive distribution pattern excitatory inputs. The results of my research suggest that each neocortical neuron is controlled by specific pattern of excitatory signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経微細形態学・大脳皮質・共焦点レーザー顕微鏡・非錐体細胞・錐体細胞・電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は多様なニューロンから構成されているが、近年その構成要素の1つである、GABA作動性抑制性ニューロンは、発火様式や形態の違いだけではなく、カルシウム結合蛋白質・アクチン結合蛋白質・神経ペプチドの発現パターンの違いを組み合わせることで、機能的と考えられるサブタイプの存在が確認されてきた。特にその中でも parvalbumin (以下 PV) を発現する細胞は殆どが高頻度発

火特性を持ち、Fast spiking cell と呼ばれている。

一方、皮質外に投射する錐体細胞は、ニューロン自体としては一様なものとして扱われてきたが、最近の知見から、前頭皮質の錐体細胞が橋核に投射するもの(Corticopontine: CPn 細胞)と、両側の線条体に投射するもの(Corticostriatal: CCS 細胞)とは、別々のニューロン集団で、樹状突起の形態や、発火様式、皮質内結合パターン

が異なっていることが判明した。大脳皮質は上記のような様々なサブタイプの神経細胞によって構成されているが、これらの機能を発現する興奮性入力のパターンについてはよく知られていない。

2. 研究の目的

大脳皮質は、主に2種類の興奮性入力を受けておりことが知られている。大脳皮質内の錐体細胞からの入力でCortico-cortical inputと呼ばれているものと、視床由来の入力で、Thalamo-cortical inputと呼ばれるものである。大脳皮質に存在する神経細胞はこれらの2種類の興奮性入力によって神経活動を発現させているが、個々の種類の神経細胞に対するこれらの興奮性入力の密度や収束様式については殆どわかっていない。大脳皮質内の神経細胞への入力密度、入力選択性を明らかにする目的で以下の研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的検討

実験にはラットの大脳皮質の50 μ m厚の組織切片を用いて行った。大脳皮質内への興奮性入力の分布パターンは以下に記すような免疫組織化学的手法を用いて行った。Cortico-cortical inputの神経終末部にはVesicular glutamate transporter typel (VGluT1)が、Thalamo-cortical inputの神経終末部にはVGluT2がそれぞれ特異的に発現していることが、過去の研究から明らかにされている。

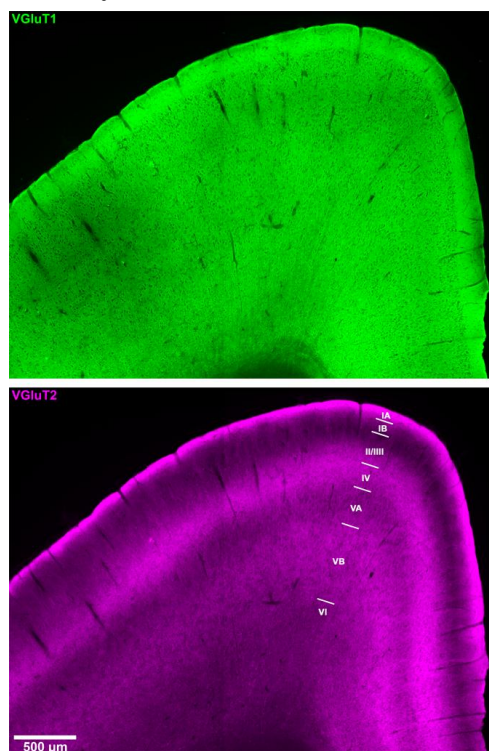


図1 VGluT1 (green), VGluT2 (Red)の組織染色像

図1に示すように、これらのマーカー蛋白に対する抗体を用いた免疫組織染色によって、Cortico-cortical inputとThalamo-cortical inputを同時に可視化することができる。これに加えて抗PV抗体を用いた多重免疫組織染色により、PV陽性細胞とそれに近接して存在する、興奮性入力を同時に可視化することが可能となった。

図2に示すように、可視化された染色像は共焦点レーザー顕微鏡下において興奮性入力のBouton appositionとして観察を行った。

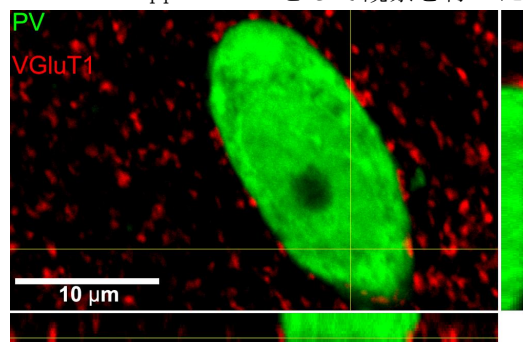


図2 PV (green), VGluT1 (Red)の組織染色像

このような取得画像をもとに、PV細胞の細胞体・樹状突起上に近接して存在する、VGluT1/T2陽性Boutonの数を数え、その密度を計測し、その密度の前頭皮質の各層ごとの違いや、密度と樹状突起の太さや観察部位の細胞体からの距離との関係などを評価した。PV陽性細胞の標識には、Vicia villosa albumin (以下VVA)による標識を行った、300 μ m厚の脳切片にLucifer yellowを微量注入することによる可視化の方法も用いた。この方法により、通常の抗PV抗体では観察が困難な細胞体から200 μ m以上離れた樹状突起の観察も可能となった。

錐体細胞については、視床-皮質間入力が多く観察された、前頭皮質4層と5層下部(5B層)に注目して、それぞれの層に存在する錐体細胞の主に基底樹状突起に焦点を絞った観察を行った。

錐体細胞の標識は、逆行性Tracerを注入して標識された細胞を含む脳切片を用いて、標識細胞へのLucifer yellowの注入により、樹状突起の可視化を行った。錐体細胞についてもPV細胞と同様の観察を行った。具体的には、前頭皮質4層の錐体細胞の標識には反対側のM2領域に軸索を伸ばす細胞や同側のM1領域に軸索を伸ばす細胞を標識した。さらに、5B層では同側の橋核と反対側の線条体にそれぞれ異なる種類のTracerを注入して、CPn細胞とCCS細胞の標識を行った。これらの観察を通して、それぞれの種類の細胞への興奮性入力のパターンを評価した。

(2) 電子顕微鏡観察

(1)での観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いたものであるため、標識VGluT-labeled

Bouton が近接している標的の細胞体・樹状突起との間にシナプスを形成しているかについては明確ではない。Bouton apposition と synapse formation の関係 (確率) をについて検討するために、共焦点レーザー顕微鏡観察に用いた切片を再度電子顕微鏡観察用に免疫染色を行った。

図 3 のように PV や Lucifer yellow については DAB 発色、VGluT については銀増感法によって再標識を行った。

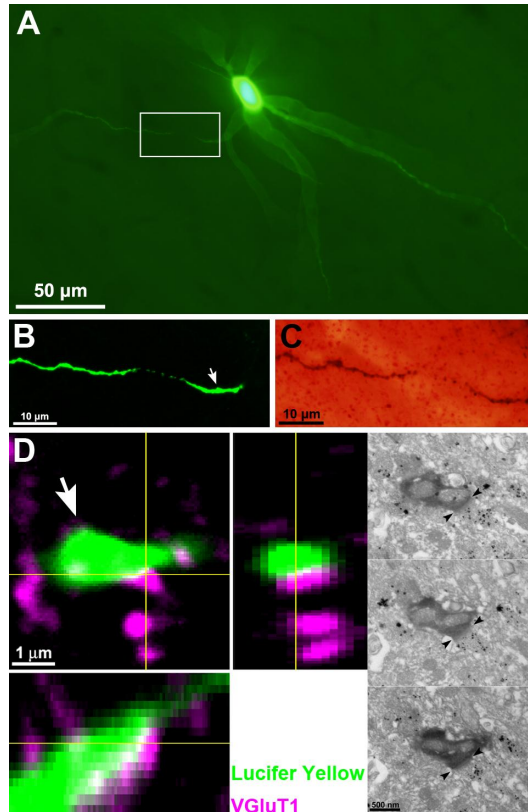


図 3 A. Lucifer yellow を注入した VVA 陽性細胞 B. 樹状突起の拡大図 C. 共焦点レーザー顕微鏡観察後の DAB 発色した同じ樹状突起の画像 D. Lucifer yellow (green), VGluT1 (Magenta) の組織染色像 (左) 同じ切片を用いた電子顕微鏡観察像 (右)

4. 研究成果

(1) 前頭皮質内 PV 細胞の細胞体・樹状突起への興奮性入力分布パターン

前頭皮質内の PV 細胞への興奮性分布パターンを上記の方法を用いて観察した。図 4 に例として示しているが、皮質-皮質間の興奮性入力を表す VGluT1 陽性終末は、PV 細胞の樹状突起に対して、その直径に依存して近接している Bouton の密度が高くなることと、細胞体から離れるごとにその密度が低くなるのが観察された。これに対して視床-皮質間の興奮性終末を表す VGluT2 陽性終末については、PV 細胞の樹状突起に近接する Bouton の数が極端に少なく、標的の樹状突起の直径や、細胞体からの距離との明確な相関は観察されなかった。

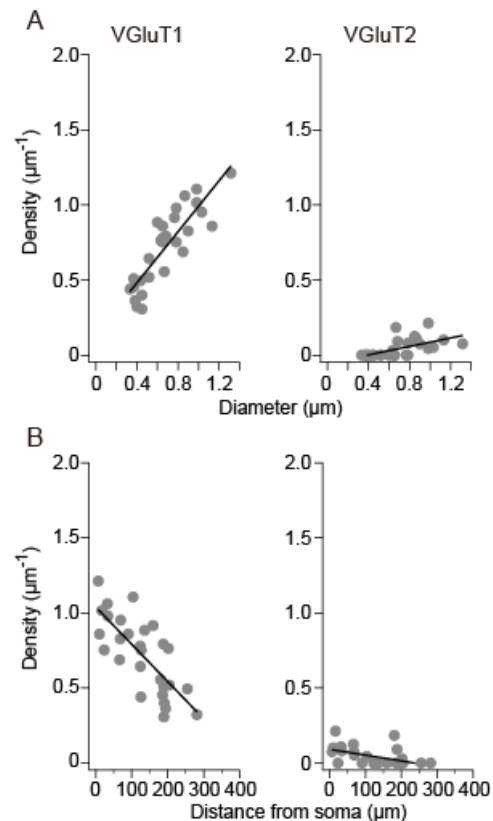


図 4 A: PV 細胞の樹状突起の直径 (横軸) と近接する VGluT1/T2 陽性 Bouton の密度 (縦軸) の関係 B: 観察した樹状突起の細胞体からの距離 (横軸) とその樹状突起に対して近接する Bouton の密度 (縦軸) 1 つのドットが 1 ヶ所の樹状突起を示す。左側が VGluT1、右側が VGluT2

さらに、PV 細胞の細胞体への興奮性入力についても観察を行った。観察データと、PV 細胞の細胞体の再構築画像から測定された表面積の値から、PV 細胞の細胞 1 個に対して近接する Bouton の数を算出した。図 5 に示す通り、VGluT1 陽性 Bouton は大脳皮質のどの層でも PV 細胞の細胞体に対して 100 個前後の近接が認められた。これに対して VGluT2 陽性 Bouton は 4 層以外の層では 10 個にも満たない数が近接する程度であったが、4 層では 20~30 個の Bouton の近接が認められた。

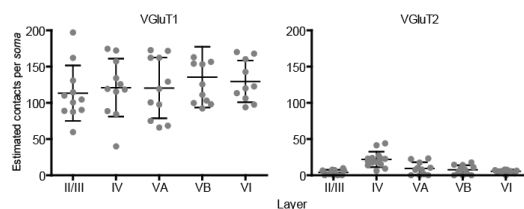


図 5 PV 細胞細胞体 1 個あたりに近接する VGluT1/T2 陽性終末の数

この結果は PV 細胞が皮質-皮質間入力を、皮質内の層の間では違いがないものの、樹状突起では規則性を有する分布パターンで受けていることを示しているのに対し、視床-皮

質間入力は PV 細胞の樹状突起/細胞体にも入力はごくわずかであるが、視床-皮質間入力が多く局在する 4 層の PV 細胞だけ、細胞体での直接入力を受けていることを示唆するものである。

(2) 前頭皮質4層内錐体細胞樹状突起への興奮性入力の分布パターン

視床-皮質間の興奮性入力が多く分布する層の 1 つである、4 層における投射型錐体細胞の樹状突起への興奮性入力の分布パターンについて検討した。

PV 細胞の場合と同様に樹状突起上の興奮性入力は皮質-皮質間の入力が多いという傾向は認められた。しかしながら図 6 に示すように、錐体細胞の樹状突起の場合、Spine 上には VGlut2 でラベルされた Bouton の近接が認められた。同一の樹状突起上に占める皮質-皮質間入力と視床-皮質間の入力の割合を算出したところ、基底樹状突起の Shaft 上では視床-皮質間入力が 2 割にも満たない程度であるのに対して、Spine 上では 3 割近くにも及ぶことが判明した。

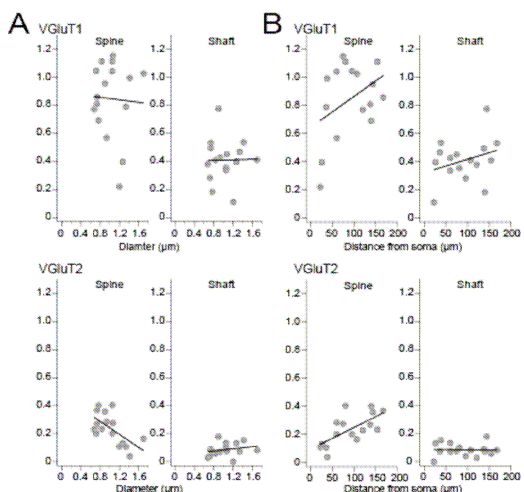


図 6 前頭皮質錐体細胞への興奮性入力の比較 A: 4 層錐体細胞の樹状突起の直径(横軸)と近接する VGlut1(上)VGlut2(下)陽性 Bouton の密度(縦軸)の関係 B: 観察した樹状突起の細胞体からの距離(横軸)とその樹状突起に対して近接する Bouton の密度(縦軸) 各データは左側に Spine の観察データ、右側に Shaft の観察データを示す。

この結果は、視床-皮質間の入力が 4 層では PV 細胞の細胞体と錐体細胞の樹状突起 Spine を標的にしていることを示唆している。

(3) 前頭皮質5層下部内錐体細胞樹状突起への興奮性入力の分布パターン

視床-皮質間入力が多く分布するもう 1 つの層である 5 層下部における、この興奮性入力の錐体細胞への入力パターンについて検討した。この検討では研究方法の中で表記した通り、CPn 細胞と CCS 細胞という投射サブタイプについてそれぞれの興奮性入力の分布パターンを観察・評価を行った。実験手技の

関係で、観察は基底樹状突起のみを対象として行った。図 7 に示す通り、皮質-皮質間の入力は、CPn 細胞と CCS 細胞の間に明確な違いは認められなかった。視床-皮質間の入力については、CCS 細胞の Spine 上に多く近接する Bouton が確認された。

同一の樹状突起に占める VGlut1 陽性 Bouton と VGlut2 陽性 Bouton の割合を比べたところ、両方の細胞の Dendritic Shaft 上と CPN 細胞の Spine 上に近接する VGlut2 陽性の Bouton は 1 割程度であるのに対して、CCS 細胞の Spine 上に近接する VGlut2 陽性 Bouton は 3 割に及んだ。

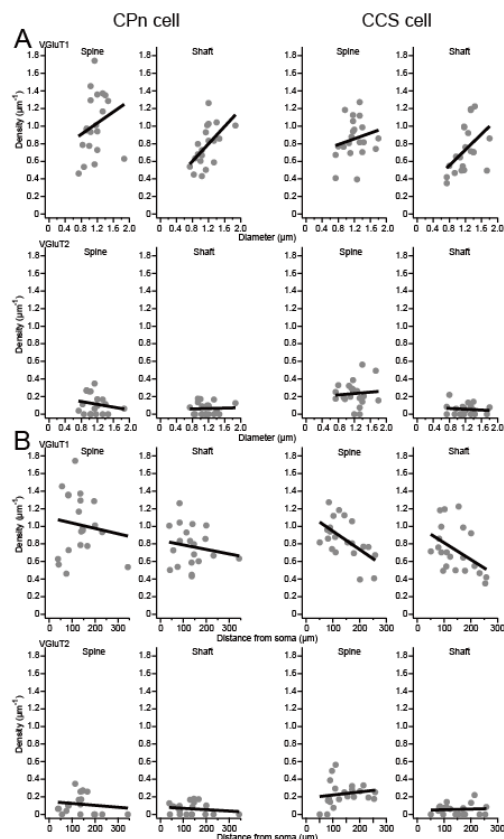


図 7 前頭皮質錐体細胞への興奮性入力の比較 A: 5 層下部の錐体細胞の樹状突起の直径(横軸)と近接する VGlut1(上)VGlut2(下)陽性 Bouton の密度(縦軸)の関係 B: 観察した樹状突起の細胞体からの距離(横軸)とその樹状突起に対して近接する Bouton の密度(縦軸) 各項のデータは左側に CPn 細胞の観察データ、右側に CCS 細胞の観察データを示し、それぞれの細胞のデータは左側に Spine の観察データ、右側に Shaft の観察データを示している。

このデータは 5 層下部の視床-皮質間の入力が CCS 細胞の基底樹状突起に選択的に分布している可能性を示している。

全ての研究過程を通して、観察対象である前頭皮質内ではそれぞれの神経細胞が非常に多くの皮質-皮質間興奮性入力を受けている

ことが観察され、大脳皮質内の錐体細胞からの信号伝達の重要性が伺える。前頭皮質内の錐体細胞からの局所的な伝達であるか、大脳皮質内の他の領野の錐体細胞からの入力であるかについては未だ定かではないが、この皮質-皮質間興奮性入力の前頭皮質の神経細胞の駆動には必要不可欠であることは容易に想像できる。しかしながら4層PV細胞は視床からの直接的な入力を細胞体で受けていることなど、大脳皮質内のリズム形成などに重要とされている特定の領域・特定の細胞への視床からの入力についても併せて観察されたことから、視床からの興奮性入力はある特定の機能を果たす必要性のある細胞に対して特異的な入力を行っていることが考えられる。

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1件)

1. Yoshiyuki Kubota, Naoki Shigematsu, Fuyuki Karube, Akio Sekigawa, Satoko Kato, Noboru Yamaguchi, Yasuharu Hirai, Mieko Morishima, Yasuo Kawaguchi
Selective Coexpression of Multiple Chemical Markers Defines Discrete Populations of Neocortical GABAergic Neurons
Cerebral Cortex
査読有
2011年1月10日 オンライン版公開

[学会発表] (計2件)

1. Naoki Shigematsu, Yoshiyuki Kubota, Yasuo Kawaguchi
Distribution patterns of cortico-cortical and thalamo-cortical inputs to parvalbumin-expressing GABAergic neurons in rat frontal cortex
北米神経科学会 (Neuroscience 2010)
2010年11月16日
米国 サンディエゴ サンディエゴ・コンベンションセンター

2. Naoki Shigematsu, Yoshiyuki Kubota, Yasuo Kawaguchi
Distribution patterns of pyramidal and thalamocortical inputs to the parvalbumin-expressing GABAergic neurons in rat frontal cortex
第32回日本神経科学大会 2009年9月17日
名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重松 直樹 (SHIGEMTSU NAOKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：30469613

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし