

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500327

研究課題名（和文） 大脳皮質・視床の局所神経回路におけるギャップ結合の役割

研究課題名（英文） Roles of neuronal gap junctions in local circuits of the cerebral cortex and thalamus

研究代表者

福田 孝一（FUKUDA TAKAICHI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：50253414

研究成果の概要（和文）：

ギャップ結合により連結する神経細胞ネットワークは脳に幅広く存在しているが、その性質については未知の点が多い。本研究課題では感覚情報処理機構の研究の蓄積がある視覚野4層および記憶形成に不可欠な海馬において、ギャップ結合性樹状突起ネットワークが示す重要な性質を発見した。さらにこれら二領域各層のギャップ結合の分布様式は様々であり、ギャップ結合樹状突起ネットが各領域や層の計算特性の違いに対応する多様性を持つ可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated the existence of a novel type of neuronal network linked by gap junctions in several brain regions. This study focused on gap junction-coupled network in layer 4 of the visual cortex and hippocampus. Morphological features newly found in these regions showed considerable diversity that may reflect differences in region-specific principles in neuronal computation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：ギャップ結合、GABA、大脳皮質、視覚野、海馬、インターニューロン、樹状突起、パルプアルブミン

1. 研究開始当初の背景

ギャップ結合による神経細胞間の連絡が哺乳類の中枢神経系においても広く存在していることが、最近の形態学・生理学・分子生物

学研究から明らかになってきた。しかしそれらの研究は、依然として世界的にもごく少数の研究者によって担われている発展途上の段階にあり、化学シナプスによるネットワー

クに比べて、ギャップ結合が神経回路の中で果たす役割については未知の部分が多い。ギャップ結合は特定の脳領域における特定の神経細胞に見いだされてきた。その多くはGABA作動性の局所回路ニューロンであり、特に投射ニューロンの細胞体近傍に抑制性シナプスを形成するパルブアルブミン含有GABAニューロン（以下PVニューロンと略す）の樹状突起間に豊富に存在する [海馬 Fukuda and Kosaka (2000) J Neurosci 20, 1519-28; 新皮質 Fukuda and Kosaka (2003) Neuroscience 120, 5-20, Fukuda et al. (2006) J Neurosci 26, 3434-43; 線条体 Fukuda et al. (2009) J Neurosci 29, 1235-43] 本研究課題では、これまで私が培ってきたギャップ結合の形態学的研究をさらに発展させ、高次機能との関連が深い大脳皮質（新皮質と海馬）と視床におけるギャップ結合によるニューロンネットワークの姿を明らかにするものである。

2. 研究の目的

(1) 視床-大脳皮質回路におけるギャップ結合の位置づけ

高次機能を発現する大脳皮質において、PV含有GABAニューロンが、相互の樹状突起の間にギャップ結合による密な連結を形成していることを、これまでの研究で示してきた。しかしギャップ結合が大脳皮質の神経回路の中にどのように組み込まれ、その機能的意義を発揮しているかという問題は、依然として不明である。そこで詳細な研究の蓄積があるネコの一次視覚野に注目して、ギャップ結合ネットワークの形態学的性質の解明を続行している。今回は特に4層に焦点をあてる。一次視覚野4層は、視床外側膝状体からの視覚情報が最初に入力する部位であり、大脳皮質における視覚情報処理の出発点に位置し、4層における解明は感覚野におけるギャップ

結合ネットワーク理解の鍵となる可能性がある。そこで、4層に多数存在しているPVニューロンがどのような形態学的特徴を持ち、特にギャップ結合によりどのような樹状突起ネットワークを形成しているのか、それが以前に明らかにした一次視覚野2/3層のギャップ結合ネットワークとどのように異なっているのかを追究する。

(2) ギャップ結合が存在する樹状突起上の位置の問題

大脳皮質における生理学的研究では、当初ギャップ結合は50ミクロン以内の近接したニューロン間でのみ存在すると信じられていた。しかし私は新皮質PVニューロンでは細胞体から300ミクロン離れた所までギャップ結合が認められることを示し、定量的にも近位樹状突起に限局するわけではないことを実証した(Fukuda et al., 2006)。しかし遠位部での電気的活動は細胞体で記録する場合に距離に応じて減衰するため、遠位部に存在するギャップ結合の意味は現在まで謎である。一方で、確かに樹状突起近位部には多数のギャップ結合が存在している。ギャップ結合が存在する樹状突起上の位置の問題は、ギャップ結合の機能的意義を考える上できわめて重要な要素であると考えられる。この問題へのアプローチを、一次視覚野と海馬において、それぞれの組織学的構成の特徴を活かして解析する。

3. 研究の方法

(1) 視床-大脳皮質回路における解析

ネコの脳は、明治国際医療大学解剖学熊本賢三教授の研究室において、皮膚組織の顕微鏡的研究のために灌流固定した動物から得られたものの提供を受けた。連続切片を作成し、PVおよびCx36に対する特異抗体による

二重蛍光免疫組織化学染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像データを取得し、神経組織の3次元画像解析を実行するソフト NeuroLucida により、視覚野4層においてギャップ結合を介して連結する PV ニューロンネットワークの3次元的形態やギャップ結合の位置に関する定量的検討を行った。さらに4層 PV ニューロンがはたして driving input として視床からの直接入力を受けているか否か、受けているとすれば4層 spiny stellate cell 同様に樹状突起の上に分布しているのか、また海馬に見られるような、PV ニューロンどうしの相互抑制性結合が4層に存在しているのかどうかについて、共焦点レーザーにより PV/vGluT2/GAD の三重染色を行った免疫組織化学標本を観察した。

(2) ギャップ結合が存在する樹状突起上の位置の問題

深麻酔下にアルデヒド液にて灌流固定したマウスの脳で、海馬と新皮質を含む連続切片を作成した。二重蛍光免疫染色により PV ニューロンの樹状突起のコンタクト部位に一致する Cx36 陽性のギャップ結合を同定した。このために共焦点レーザー顕微鏡のスタック画像を撮影し、3次元画像解析ソフト NeuroLucida のイメージスタックモジュール（現有設備）を用いて解析した。ギャップ結合の密度を、hippocampus proper および歯状回の各層で求め、予備的観察から期待される、領域および層特異的なギャップ結合の分布パターンを詳細に検討した。

一方ネコ視覚野4層においては、個々の PV ニューロンにおけるギャップ結合の位置の解析を、NeuroLucida により実施した。樹状突起の全体に沿った分布をトレースから得ることで、樹状突起近位部（恐らく活動電位の同期化に関与）と遠位部（恐らくシナプス

入力の同期化に関与）それぞれのネットワーク構築を調べた。

4. 研究成果

(1) 一次視覚野4層におけるギャップ結合ネットワークの形態学的特徴

ネコ一次視覚野における解析から次のことが初めて明らかになった。すなわち、ニューロン間ギャップ結合の空間密度が他の層に比べて4層で最も高いこと、NeuroLucida による詳細なトレースにより、4層の PV 含有 GABA ニューロンの樹状突起が網 (dendritic net) とも呼べる密なギャップ結合連結を作っていること、さらにその中で、3層から5層まで樹状突起を広げ、遠位部で選択的にギャップ結合を形成し Hub 的な役割が想定されるタイプと、樹状突起野が小さく、密なギャップ結合ネットを形成する小型の PV ニューロンとの二タイプの存在が明確になった。さらに4層 PV ニューロン細胞体への視床からの直接入力がある層よりも多いこと、PV ニューロン間の相互抑制性結合も4層でもっとも密であることを見いだした。

以上の所見の中で、4層 PV ニューロンへの視床からの入力と相互抑制性結合が密であるという内容は、共焦点レーザー顕微鏡観察に基づくものであり、本当にそこにシナプス結合が存在することを電子顕微鏡により示す必要があった。そこで **Correlated CLSM-EM** 法を用い、共焦点レーザー顕微鏡で同定した bouton を再度電子顕微鏡で観察することにより、確かに4層 PV ニューロン細胞体上にそれらのシナプス結合が多数存在していることを確認した。

以上の結果から、一次視覚野4層には密なギャップ結合ネットワークが存在し、視床からの入力が直接このネットワークを駆動すること、さらに相互抑制性結合がその活動を

modulate するという図式が浮かび上がってきた。特に3層から5層にかけて樹状突起野を広げるタイプは広い領域における同期性検出装置として、また小型であり樹状突起近位部にある多数のギャップ結合を介して連結するタイプは、視床からの直接入力にตอบสนองして活性化する同期性出力装置としての役割が想定される。

(2) ギャップ結合の位置に関する海馬での検討

海馬における検討では、PVニューロン間のギャップ結合密度が、海馬の領域ごとに独特の層別パターンを示すことを見いだした。即ち定量的解析によって、ある領域では遠位樹状突起でもっともギャップ結合密度が高く、外部からの feedforward 入力を受ける樹状突起が coincidence detector の役割を果たしていることを強く示唆する所見を得た。しかし別の領域ではむしろ feedback 入力を受ける層に多いことが判明した。どちらにおいても PVニューロンは全層を縦に貫くように樹状突起を延ばしており、その際だった分布様式の違いが初めて明らかになった。

総括すると、新皮質でも海馬でも、ギャップ結合樹状突起ネットは各領域や層ごとにかなり異なった形態学的特徴を備えていることが明らかになった。すなわちギャップ結合による樹状突起ネットは各部位で密な様相を呈するため、これまで領域によらず比較的均一な特徴を持つという印象がもたれていたが、本研究の成果により、むしろ各領域や層において多様であることが明らかとなった。この事実は、恐らく脳の各部位や層ごとに異なるニューロンの計算特性の違いに対応する多様性を、ギャップ結合ネットワークが有していることを示唆している。

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0件)

本研究課題の2年目に、代表者の熊本大学医学部への異動があり、肉眼解剖学担当教授として、負担の非常に大きい教育体制の確立に時間を要した。しかしながらその中で着実な研究成果をあげ、7回の学会発表を行うとともに、現在は十分はデータを得て論文投稿の準備段階にある。

〔学会発表〕(計7件)

- ① 福田孝一 ギャップ結合が連結するパルブアルブミン含有 GABA ニューロンの樹状突起ネットが示す領域および層特異的な多様性、第117回日本解剖学会・全国学術集会 2012.3.26 山梨大学(甲府)
- ② 福田孝一 Correlated CLSM-EM による神経科学 生理研研究会「電子顕微鏡イメージングの医学・生物学への応用」生理学研究所(岡崎) 2011.11.30
- ③ 福田孝一 ギャップ結合が結ぶ視覚皮質4層 GABA ニューロンの樹状突起網 第34回日本神経科学大会 2011.9.15. パシフィコ横浜(横浜)
- ④ 福田孝一 ギャップ結合神経ネットワークに基づく脳の新しい形態構築観 日本顕微鏡学会第67回学術講演会シンポジウム 2011.5.16 福岡国際会議場(福岡)
- ⑤ 福田孝一 視覚皮質4層におけるギャップ結合を介する神経細胞ネットワーク、第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 2011.3.28. パシフィコ横浜(横浜)
- ⑥ 福田孝一 一次視覚野4層でギャップ結合を形成する GABA ニューロンへの密な視床入力と相互抑制性結合、日本解剖学会第66回九州支部学術集会 2010.10.9 福岡歯科医師会館(福岡)
- ⑦ 福田孝一 ギャップ結合を介する中枢神経ニューロン間の未知の連結様式 第8回コネキシン研究会 2009.11.28 志賀島国民休暇村(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 孝一 (FUKUDA TAKAICHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：50253414