

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500412

研究課題名(和文) 嗅覚一次中枢・嗅球系球体の解析：傍系球体細胞の更なる解析

研究課題名(英文) Structural organization of the main olfactory bulb: further analysis of juxtaglomerular neurons

研究代表者

小坂 克子 (Kosaka, Katsuko)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：60202058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：マウス主嗅球の系球体近傍ニューロン(JG neurons)解析を進めた。あるCa結合蛋白secretagogin (SCGN)陽性細胞は典型的なPG細胞であったが、別のSCGN細胞群は、突起が一つの系球体から隣の系球体へと延びていた。このグループは新たに見出されたタイプのJG neuronsと考え、transglomerular cellと命名した。一方transcription factors, Sp8及びTbx21については主嗅球の化学的ニューロンマーカーとの関係を検討し、transcription factorsという視点からJG neurons群の多様性を更に明確にした。

研究成果の概要(英文)：Juxtaglomerular (JG) neurons in the mouse main olfactory bulb (MOB) consist of various types of neurons. In the present study we examined (1) the structural features of secretagogin(SCGN)-positive neurons, and (2) The expressions of two transcription factors, Sp8 and Tbx21, in the JG neuronal subpopulations.

SCGN-positive neurons were localized throughout layers, and heterogeneous, including JG neurons, granule cells, et al. Morphologically some of JG SCGN-positive neurons were classical periglomerular (PG) cells, whereas others were apparently different from those PG cells. Some extended one slender process into a glomerulus which passed the glomerulus and further penetrated into another nearby glomeruli. We named this type of JG neurons, transglomerular cells. Both Sp8 and Tbx21 immunoreactivities were so diverse in their staining intensities. Sp8 and Tbx21 immunoreactivities further characterized JG neurons and, especially confirmed the heterogeneity of NOS positive JG neurons.

研究分野：総合領域

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：嗅球 カルシウム結合タンパク 系球体 傍系球体細胞 短軸索細胞 局所回路 ニューロン レーザー顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

近年、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。特に、第一として一つの嗅細胞 (ON) はただ一種類の匂い分子レセプターのみを発現すること、第二として嗅細胞の軸索終末は嗅覚一次中枢嗅球の表面に二次元的に分布する特殊なシナプス野、糸球体に停止する。同じ匂い分子レセプターを発現した嗅細胞は特定位置に存在する内外側一対の糸球体へ軸索を収束させることが解明された。更に、異なった匂い分子は異なった組み合わせの嗅細胞群に認識されるという combinatorial receptor codes for odors が提唱されている。これらのことは、糸球体が機能的ユニットであり、匂い分子の化学的性質が二次元の糸球体層での特定位置の糸球体群の組み合わせにコードされていること、即ち combinatorial glomerular code for odors を示唆している。更に、ここ数年の生理学的解析で以下のことが明らかにされつつある。糸球体層がリズムを発生し、外房飾細胞 (external tufted cell) が主に関与していること。また、投射ニューロンである僧帽細胞でのスパイク発生が従来信じられていたように細胞体・軸索初節部に限られるのではなく樹状突起 tuft の糸球体侵入基部、2次樹状突起でもスパイク発生が起こりそれが様々な入力によって制御されている。更に、これまでほとんど区別されなかった房飾細胞特に外房飾細胞と僧帽細胞とがかなり異なる生理学的性質を示す。一方、従来重視されてきた糸球体間の抑制と同様にあるいはそれ以上に糸球体内での抑制が嗅覚情報処理に極めて重要であることが示唆されている。このことは個々の嗅球糸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

を示唆している。我々は、これまでのラットでの嗅球の解析を基礎として、遺伝子改変動物の中心であるマウスの嗅球のニューロン構成の体系的解析をスタートさせ、従来信じられてきた嗅球のニューロン構成とは異なる、いくつかの新所見を明らかにしてきた。

我々がこれまでに新たに見出した主な事実で糸球体構成要素に関連した主な所見は、以下の(1) - (7)である。

(1) 糸球体がコンパートメント構造をしていること。

(2) 従来単一の GABA 系ニューロンであるとされてきた傍糸球体細胞 (periglomerular cell, PG cell) が化学的にも構造的にも多様であり、嗅入力を直接受ける type 1 PG cell グループと嗅入力を受けない type 2 PG cell グループに分れること。

(3) type 1 PG cell、type 2 PG cell の化学的性質がラット嗅球とマウス嗅球では大きな差異を示すこと。しかし、両種でまだ化学的性質が不明の PG cells がかなりの割合を占めること。

(4) 古典的な Golgi 染色で軸索を有するとされてきた PG cells の少なくとも一部は軸索初節部 (AIS) 特異的分子の検討から、無軸索である可能性があること。

(5) type 1 PG cell グループのメンバーである tyrosine hydroxylase (TH) 陽性 GABA 陽性 PG cells が細胞体のサイズから2つのサブグループに分けられること。

(6) 逆行性トレーサー実験により、大型の TH 陽性 GABA 陽性 PG cells が糸球体間相互結合の主たる役割を担っていること。

(7) 更に、BrdU での細胞の発生時期を決定する実験で大型の TH 陽性 GABA 陽性 PG cells はほとんど prenatal ~ perinatal に発生し、いわゆる成体での神経新生していないことを示した。一方小型の TH 陽性 GABA 陽性 PG cells は成体でも新生していることを明らかにした。この所見は我々が従来提唱してき

た PG cells の化学的性質、糸球体内樹状突起、嗅神経入力での多様性を、軸索結合の面、発生時期の面にも拡張するとともに、これまで考えてきた以上に PG cells が多様であることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では嗅球の PG cells あるいはより範囲を広げ糸球体近傍ニューロンを見直し、これまでの我々の提唱を更に展開させることに主眼を置く。特に、焦点を当てるのは以下の点である。

第一としてこれまで化学的性質が不明であったかなりの割合の糸球体近傍ニューロンの解析。最近発見されたカルシウム結合蛋白 secretagoin 陽性の顆粒細胞と糸球体近傍ニューロンが多数存在することが報告されているので、これまでの他の PG cells グループとの関係の詳細を解明する。secretagoin と calretinin, TH との一部が共存することが既に報告され、我々も確認しているが、これはむしろ secretagoin 陽性糸球体近傍ニューロンが多様であることを示唆するのでその詳細を明らかにする。

第二として我々が報告した一酸化窒素合成酵素 NOS 含有 PG cells の詳細を含めて糸球体近傍ニューロンを、近年注目されている transcription factors、Sp8 及び Tbx21 の発現という新たな視点から検討する。

第三として PG cells は成体で新生するニューロンとして注目されているが、上記 TH 陽性 GABA 陽性 PG cells 以外の PG グループでも発生時期が多様で prenatal ~ perinatal に発生するものと成体でも新生を続けるものがあるかどうか検討をする。

## 3. 研究の方法

これまで解析してきた C57BL/6J 系マウス嗅球の糸球体近傍ニューロン構成を見直すために共焦点レーザー顕微鏡・電子顕微鏡による形態学的解析を進めた。

(1) 新たに発見されたカルシウム結合蛋白 secretagoin 陽性ニューロンの解析。

secretagoin 発見者の Dr. Wagner より提供してもらった特異抗体を用い、他の PG cells 及び他の介在ニューロンのマーカーである calretinin, calbindin, NOS, TH, parvalbumin に対する特異抗体と組み合わせた免疫蛍光多重染色を行いグループ間の共存関係を共焦点レーザー顕微鏡観察により検討した。また、共焦点レーザー顕微鏡高倍での観察で構造の詳細を解析した。一方、ABC法 DAB 発色による免疫染色により嗅球全層にわたり観察し、secretagoin 陽性ニューロンの分布、多様性、形態の詳細を解析した。secretagoin 陽性ニューロンのシナプス結合を解析するため、共焦点レーザー顕微鏡-電子顕微鏡を組み合わせた。電子顕微鏡用に固定し免疫蛍光多重染色した標本を共焦点レーザー顕微鏡で観察した後、同じ標本を ABC法で処理し secretagoin 陽性ニューロンの突起を DAB で染色した。このスライス樹脂を包埋した後、ここから超薄連続切片を作製し透過電顕で観察し、主にシナプス結合の解析をした。

(2) thymidine アナログである BrdU あるいは EdU 標識を用いた嗅球における各種ニューロン群の成体での新生。

BrdU あるいは EdU を juvenile (4 週), 成体(8 週)に投与し、生後 8 週または 12 週, 16 週に固定し、BrdU の場合は抗 BrdU 抗体を用い他のマーカーとなる抗体と組み合わせた免疫蛍光多重染色標本を作製、EdU の場合は Click-iT EdU Alexa Fluor488 Imaging Kit (cat#C10337, Invitrogen)を用い、同様に免疫多重染色標本を作製した。これらを用いて、共焦点レーザー顕微鏡による観察で、BrdU/EdU 陽性ニューロンの化学的性質を検討した。

(3) stereology による定量解析。

ABC-DAB 法で作成した標本各セ

ット 45 ~ 50 からなる 50  $\mu$ m 厚の連続切片から 6 切片ごとに 7 又は 8 枚の切片をランダムに選択し、40 倍の対物レンズで

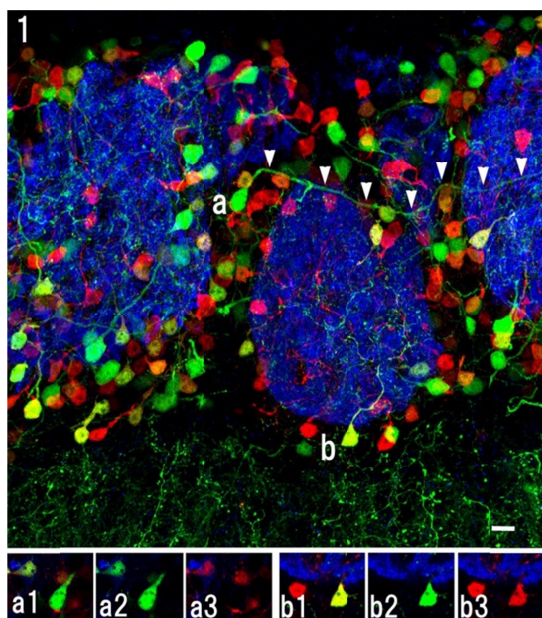
Stereoinvestigator system を用いた optical fractionator での糸球体近傍の secretagogin 陽性ニューロンの定量解析を進めた。

( 4 ) transcription factors、Sp8 及び Tbx21 の嗅球ニューロン群での発現、その化学的性質との関係。

Sp8 特異抗体及び理研吉原博士より提供の Tbx21 特異抗体を他の糸球体近傍ニューロンのマーカーと免疫多重染色した標本を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) secretagogin 陽性ニューロンの解析。secretagogin ニューロンは嗅球全層に分布し、特に糸球体層と顆粒細胞層に多数分布していた。全層において calretinin との共存がかなり見られた。糸球体層では calretinin 陽性ニューロンとは一部重複しているが、calbindin 陽性ニューロンとは重複がなく、また、TH 陽性 GABA ドーパミンニューロンとも一部重複することが明らかにできた。糸球体近傍のニューロンで古典的な PG cells は、しばしば secretagogin と calretinin との共存を示した(Fig. 1b)が、一方、calretinin



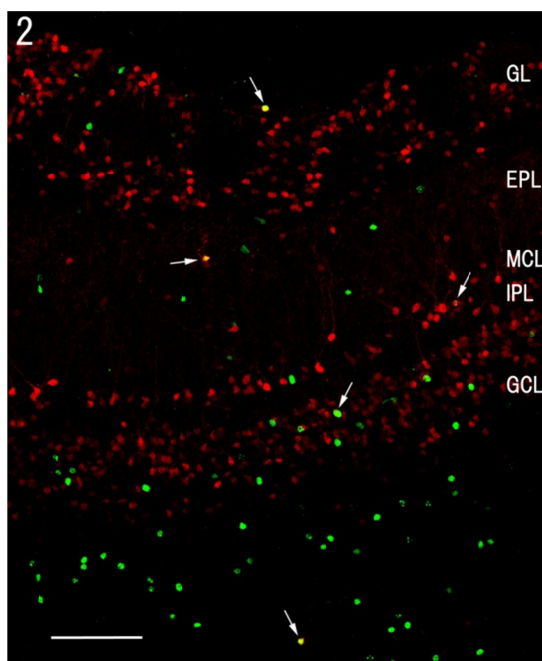
との共存を示さない secretagogin ニューロンの中のあるグループは、その突起が一つの糸球体から隣の別の糸球体へと延びていた(Fig. 1a)。これは糸球体内には突起を出さないとされる superficial short-axon cells と明らかに異なっており、また従来のいわゆる PG cells とも異なっており、新たに見出されたタイプの糸球体近傍ニューロンと考え、transglomerular cell と命名した。

( 2 ) BrdU あるいは EdU 標識を用いた嗅球における成体でのニューロン新生の検討。

嗅球においては顆粒細胞及び PG cells が成体でも神経新生が継続していることがよく知られている。これまで検討されていない secretagogin 陽性ニューロンに焦点を合わせて解析を進めた。生後 4 週に BrdU あるいは EdU 投与し、8 又は 12 週に固定して調べたところ、BrdU/EdU 標識された secretagogin 陽性ニューロンが顆粒細胞層、外網状層及び糸球体層に観察できた(Fig. 2)。従って、secretagogin 陽性ニューロンも成体で新生しているニューロン群に含まれていることが明らかになった。

( 3 ) stereology による定量解析

解析に耐える標本、即ち、嗅球全体



の連続標本で、組織の欠損部がなく、良好な免疫染色を施された標本、の作製が最も大きな問題である。辛うじて得られた3個体からの一側主嗅球(合計3主嗅球)で secretagogin 陽性系球体近傍ニューロンの optical fractionator 解析のみが行えた。その結果1主嗅球当たり約80,000の secretagogin 陽性系球体近傍ニューロンの存在が推定できた。

(4) Sp8 及び Tbx21 の嗅球ニューロン群での発現。

系球体近傍ニューロンの化学的性質の解析として transcription factors、Sp8 と Tbx21 の解析を進めた。これまでの報告のように Sp8 及び Tbx21 とにもあるニューロン群の核に限局して免疫染色が見られた。Tbx21 陽性細胞は僧房細胞層、外網状層及び系球体層と外網状層の境界部に見られた。一方、Sp8 陽性細胞は全層に分布していた。顆粒細胞層では表層におおく深層では少なかった。calretinin 陽性ニューロン、secretagogin 陽性ニューロンはほとんどすべて Sp8 陽性 Tbx21 陰性であることを初めて示した。一方、calbindin 陽性ニューロンはすべて Sp8 陰性 Tbx21 陰性であった。TH 陽性 GABA ドーパミンニューロンはほとんど Sp8 陽性 Tbx21 陰性であったが、Sp8 免疫染色性はかなり弱いものも観察された。また、NOS 陽性ニューロンはタイプにより異なり、外房飾細胞と考えられる比較的大型の系球体近傍ニューロンは Sp8 陰性 Tbx21 陽性、樹状突起が明確に染色されていない小型の PG cells は Sp8 陽性 Tbx21 陰性、しかし、樹状突起が明確に染色されている PG cells は Sp8 陰性 Tbx21 陰性であった。このような transcription factors という視点から系球体近傍ニューロン群の多様性を更に明確にした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

T. Kosaka and K. Kosaka:  
"Interneurons" in the olfactory bulb revisited.

Neuroscience Research 69.  
93-99 (2011), 査読有  
10.1016/j.neures.2010.10.002.

T. Kosaka and K. Kosaka:  
Further characterization of the juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb by transcription factors, Sp8 and Tbx21.

Neuroscience Research 73.  
24-31 (2012), 査読有  
10.1016/j.neures.2012.02.013.

K. Kosaka and T. Kosaka  
Secretagogin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb.

Neuroscience Research 77.  
16-32 (2013), 査読有  
10.1016/j.neures.2013.08.006

[学会発表](計 2件)

小坂克子 小坂俊夫、マウス嗅球における Ca 結合蛋白 secretagogin 陽性ニューロンの特徴

日本解剖学会第68回九州支部学術集会  
2012年10月13日 久留米

小坂克子 小坂俊夫、マウス嗅球における Ca 結合蛋白 secretagogin 陽性ニューロンの解析

第118回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2013年3月30日 高松

6. 研究組織

(1)研究代表者

小坂 克子 (Kosaka Katsuko)

国際医療福祉大学 保健医療学部 教授

研究者番号 : 60202058