

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591305

研究課題名(和文)片側嗅内野傷害後の自然回復に関わる、嗅内野-海馬体再神経支配の形態学的解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of the entorhino-hippocampal reinnervation participates in the spontaneous recovery after unilateral lesion of the entorhinal cortex.

## 研究代表者

本多 祥子 (HONDA, Yoshiko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40287313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：嗅内野から海馬体への入力記憶形成に必須の重要な投射経路である。片側の嗅内野が傷害されると反対側嗅内野から傷害側海馬体への入力線維数が劇的に増加し(再神経支配)、記憶学習障害の自然回復に繋がることが知られる。本研究ではこの現象の基盤となる個々の神経細胞の形態変化を調べるため、正常の嗅内野-海馬体投射の形態を明らかにすると共に、再神経支配現象に特徴的な突起形態の変化を抽出する。成果として正常嗅内野V層-歯状回投射等の新たな線維連絡の他、嗅内野内部の海馬体投射起始細胞分布が帯状を呈することなど重要な法則性を発見できた。また片側嗅内野傷害実験手法を確立し、動物実験モデルの構築を進めることができた。

研究成果の概要(英文)：Projections from the entorhinal cortex (EC) to the hippocampal formation are known as the principal part of the memory circuit. It is also known that unilateral lesion of EC results in the significantly increased innervation (reinnervation) of the dentate gyrus (DG) from contralateral side of EC, suggesting spontaneous recovery of memory impairment. We aim to clarify the mechanism of morphological changes of single EC neurons in such phenomenon, by comparing to the normal pattern of axonal collateralization. Our study revealed that the distribution of hippocampal projection neurons in normal EC showed a band-like pattern with topographic organization, and also found that layer V neurons in normal EC formed complex terminal arborization in DG. We also investigated the efficient procedure for making experimental model of reinnervation and further experiments are in progress in order to collect enough data for analysis.

研究分野：神経解剖学

キーワード：記憶 海馬 歯状回 嗅内野 神経再支配

## 1. 研究開始当初の背景

1970年代、ラットで報告された嗅内野—海馬投射の再神経支配現象(片側嗅内野を人工的に傷害し同側歯状回への入力を喪失させると、数週間後に反対側嗅内野から傷害側歯状回に向けて軸索投射の増加が生じること。引用文献 )は、更に学習行動実験によりこの現象が記憶障害の自然回復に繋がることが示唆され、大きな注目を浴びた。当時、一般的な標識物質注入法を用いて細胞集団レベルでこの現象を裏付ける報告は幾つかなされたが、単一の神経細胞レベルでこの現象を解明した報告は無かった。個々の神経細胞で生じている筈の軸索形態変化やそのメカニズムについては未だに追求が不十分である。すなわち実際のところこの現象が、元々反対側海馬体へ投射していたごく少数の嗅内野細胞の軸索分岐が劇的に増えたためなのか、それとも正常では反対側へ投射しない嗅内野細胞の軸索から新たな分岐が発芽して反対側海馬体まで急速に伸長したためなのか、等、未解明の部分が多く残されたままである。本研究の研究代表者(本多)は、これまで連携研究者(柴田)と共に、記憶形成に関わる神経回路の全体像を解明すべく様々な標識物質注入法でラット海馬体、海馬周辺皮質、視床間を繋ぐ線維連絡を解析してきた。更にウイルスベクター注入法による単一神経細胞レベルでの軸索投射様式についても、幾つかの海馬周辺領域で解析し新知見を報告してきた(引用文献②~④)。単一神経細胞の軸索形態を詳細に調べ、全ての軸索分岐がどの脳領域に繋がっているのかを判別できれば、同一の情報が同時にどれだけ様々な領域へ送られているのかが分かり、引いてはその細胞を主な構成要素とする投射経路がどのような機能を担っているのかを知ることができる。記憶形成に必須とされる嗅内野—海馬体投射の線維連絡については、細胞集団レベルでは多数の報告があるが単一細胞レベルでは殆ど解析されておらず、前述の再神経支配現象の細胞メカニズムを追求する上で、まず正常の単一嗅内野細胞の軸索分岐形態を明らかにする必要がある。本研究の成果は記憶障害の自然回復モデル動物の作成や、認知症を始めとする記憶障害患者の新しいリハビリ・治療手段の探索にも繋がる基盤的な知識と成り得る。

## 2. 研究の目的

本研究は、記憶学習障害の自然回復という重要なメカニズムが、in vivo で個々の嗅内野細胞におけるどのような形態変化によって担われているのかを明らかにするものである。近年京都大学高次脳形態学教室で開発されたウイルスベクター注入法による単一神経細胞の軸索可視化手法(引用文献 )を用いて、単一嗅内野細胞の in vivo での軸索形態変化を明らかにすることにより、これまで不明であった再神経支配現象の細胞メカニズ

ムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

片側嗅内野傷害後の再神経支配現象における軸索線維の形態変化を明らかにするために、(1)片側嗅内野の人工的傷害モデル動物を作成し、十分な回復期間を取った後(再神経支配の完成後)および回復の時間経過を追って、反対側嗅内野の歯状回投射細胞の軸索分岐形態が in vivo でどのように変化するかを、ウイルスベクター注入法を用いて単一嗅内野神経細胞で調べる。(2)正常例における単一嗅内野神経細胞の歯状回投射軸索形態についてもウイルスベクター注入法を用いて解析を行い、人工傷害モデルとの比較をする上でコントロールとして必要な軸索形態の特徴を把握する。(3)上記と平行して、通常の標識物質注入法を用いて両側海馬体へ軸索分岐を送る嗅内野細胞の分布を細胞集団レベルでも調べ、嗅内野—海馬体投射の全体像を把握する。尚、本研究では嗅内野および海馬体全域の広がり(領域境界)や層構築を正確に把握するために、通常の前額断や水平断にだけでなく海馬長軸に直交する断面での連続切片も積極的に活用する。連続切片中で可視化された軸索を、描画装置およびNeuroLucidaシステム(MBF Bioscience社)を用いて立体再構築し、必要に応じて長さや分岐数、終末ブトン数などを定量解析する。

## 4. 研究成果

初年度は、本研究を遂行する上で基盤的知識となる正常ラット嗅内野から海馬体への投射様式を形態学的手法で調べ、原著論文および学会発表で報告した。(1)まず嗅内野側の海馬体投射起始細胞の細胞体分布領域・数を嗅内野全域で調べ、嗅内野—海馬体投射に特徴的な部位対応性(topography)があることを明らかにした。すなわち嗅内野から海馬体への投射における起始細胞分布領域はおおよそ嗅脳溝に平行な長軸を持つ帯状の形に広がり、嗅脳溝に対する近位—遠位方向が海馬体長軸つまり中隔—側頭葉軸方向に対応することが分かった。この成果は、近年注目されている場所細胞や格子細胞など嗅内野や海馬体に多い脳内ナビゲーション細胞の機能解明に繋がる重要な意義を有すると考えられる。(2)さらに蛍光タンパクGFPを発現する遺伝子を組み込んだ組み換えシンドビスウイルスベクターをラット嗅内野に注入し、順行性に可視化された嗅内野各層の単一神経細胞軸索形態を観察した。その結果、海馬歯状回に投射する嗅内野起始細胞群には、主体とされているII層細胞の他にV層細胞も含まれており、このV層細胞は多数の複雑な軸索分岐をもって歯状回分子層に終止していることが初めて分かった。この成果は既存の海馬神経回路を一部書き換えることに繋がる重要な意義を持つと考えられる。次年度は、(1)初年度の結果を踏まえて嗅

内野の傷害を起こさせるイボテン酸の注入部位を考慮する・十分な再神経支配を起こさせるにはどの程度の回復期間が必要か検討するなど、片側嗅内野人工傷害モデルの作成を効率良く行うための手法を、連携研究者の協力のもとで検討した。(2)更に前年度に引き続き標識物質注入法による正常ラットの嗅内野-海馬体投射の解析を行い、その過程で海馬台における嗅内野等の皮質投射起始細胞分布についても新しい知見を得ることができた。すなわち嗅内野を始めとする様々な海馬周辺皮質領域に逆行性標識物質を注入することにより、海馬台錐体細胞層における各種皮質投射起始細胞は近位-遠位方向および浅-深方向に斜めに重なる複数のサプレイヤー状に分布することが分かった。この成果は海馬体そのものの発生学的構築を考える上で大きな学術的意義を持つと考えられ、最終年度に論文および学会発表で報告した。

最終年度は(1)ウイルスベクター注入法を用いた単一嗅内野細胞の軸索分岐形態の立体構築データを集積し、嗅内野II層、III層、V層の主要な海馬体投射起始細胞について特徴をまとめ、平成27年の学会発表等を予定している。(2)尚、当初のラットでの計画に加えマーモセット(霊長類)での実験モデル作成を計画し、準備段階としてマーモセット海馬体および嗅内野への標識物質注入実験を試験的に施行した。今後の計画として齧歯類で認められる片側嗅内野傷害後の歯状回投射神経再支配現象が霊長類にも認められるかどうか、認められるとすればその軸索形態変化の特徴はどのようなものかを明らかにしたいと考えており、まずは正常マーモセットにおける嗅内野-海馬体投射関係を形態学的に明らかにすべく実験に着手しつつある。その成果の一部を平成27年に学会発表した。(3)嗅内野傷害モデル動物作成に関しては、十分な回復期間として2ヶ月以上を要すること、その期間の頭蓋成長により実験成功率低下を免れないこと(頭蓋のサイズが変化すると脳アトラスとの誤差が生じ、同一個体の非傷害側嗅内野のあらかじめ狙った座標に標識物質等を注入することが困難になるため)などから、成功例として十分な例数を得るためには更に実験継続が必要と考えられる。

#### <引用文献>

Steward O. Reinnervation of dentate gyrus by homologous afferents following entorhinal cortical lesions in adult rats. *Science* 194, 426-428 (1976).

Honda Y, Furuta T, Kaneko T, Shibata H, Sasaki H. Patterns of axonal collateralization of single layer V neurons in the rat presubiculum. *The Journal of Comparative Neurology* 519, 1395-1412, (2011)

Honda Y, Umitsu Y, Ishizuka N.

Organization of connectivity of the rat presubiculum: II. Associational and commissural connections. *The Journal of Comparative Neurology* 506, 640-658, (2008)

Honda Y, Ishizuka N. Organization of connectivity of the rat presubiculum: I. Efferent projections to the medial entorhinal cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 473, 463-484, (2004)[erratum: *J Comp Neurol*.476(4), 440-442, (2004)]

Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamamaki N, Kaneko T. In vitro transduction of central neurons using recombinant sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49, 1497-1507, (2001)

#### 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 5件)

1, Honda Y, Ishizuka N. Topographic distribution of cortical projection cells in the rat subiculum. *Neuroscience Research* 92, 1-20 (2015). 査読有り  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.11.011>

2, Shibata H, Honda Y. Thalamocortical projections of the anteroventral thalamic nucleus in the rabbit. *The Journal of Comparative Neurology* 523, 726-741 (2015). 査読有り  
<http://dx.doi.org/10.1002/cne.23700>

3, 本多祥子. 前海馬台、傍海馬台の線維連絡(総説) 月刊 臨床神経科学 *Clinical Neuroscience* 31(12), 1366-1370 (2013). 査読無し

4, Honda Y, Sasaki H, Umitsu Y, Ishizuka N. Zonal distribution of perforant path cells in layer III of the entorhinal area projecting to CA1 and subiculum in the rat. *Neuroscience Research* 74, 200-209 (2012). 査読有り  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2012.10.005>

5, Shibata H, Honda Y. Thalamocortical projections of the anterodorsal thalamic nucleus in the rabbit. *The Journal of Comparative Neurology* 520, 2647-2656 (2012). 査読有り  
<http://dx.doi.org/10.1002/cne.23057>

〔学会発表〕(計 4 件)

1, Honda Y. Morphological analysis of memory circuits in rat, rabbit, and marmoset brains. The joint meeting of the 120<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, the 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (シンポジウム) 2015 年 3 月 22 日、神戸国際会議場・展示場 (兵庫県神戸市)

2, 本多祥子、石塚典生、原由理子. ラット海馬台における皮質投射起始細胞分布様式 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 29 日、自治医科大学 (栃木県下野市)

3, Honda Y., Ishizuka N. Zonal distribution of perforant path cells in layer III of the entorhinal area in the rat. 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 21 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

4, 本多祥子 海馬周辺皮質における単一ニューロンの投射様式 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (シンポジウム) 2013 年 3 月 28 日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場 (香川県高松市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本多 祥子 (HONDA, Yoshiko)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 4 0 2 8 7 3 1 3

### (2) 連携研究者

柴田 秀史 (SHIBATA, Hideshi)  
東京農工大学・大学院農学研究院 動物生命  
化学部門 獣医解剖学研究室・教授  
研究者番号: 5 0 1 4 5 1 9 0