

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650179

研究課題名(和文) ヒト大脳半球完全連続切片標本に基づきヒト脳を直接調べヒト脳固有の構造を発見する

研究課題名(英文) Exploration of human brain-specific structures through direct examination of human brain itself

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳研究の最終目標はヒトの脳を理解することであるといっただけであらう。しかし様々な制約から、実験動物の脳を対象として詳しい研究がなされてきた反面、ヒトの脳の構造は実はあまり調べられていない。しかしヒトの脳にはマウスとは違う独自の構造があるはずであり、それを明らかにするために、ヒト大脳半球の完全連続切片を作成し、組織標本のトレースに基づく三次元再構築と免疫組織化学により、詳細な解析をおこなった。その結果、動物に比べて格段に高度の記憶能力を支える海馬の内部構造において、未知の繰り返し配列をとるユニット構造を見いだした。さらに腹側線条体と脳室下帯においても、ヒト脳独自の構造の詳細な形態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Every researcher in neuroscience will agree that the final goal of the study is to understand the human brain. However, due to various restrictions regarding the use of human brains, experimental animals are instead used for sophisticated researches. On the other hand, not so much attention has been paid to detailed structure of the human brain. The present study aimed to find the human brain-specific structures that can be elucidated only by directly analyzing the human brain itself. Complete serial sections were prepared from brain hemispheres, processed for histological studies, and analyzed using computer-assisted three-dimensional tracing system. We found novel modular structures in the human hippocampus that did not exist even in monkey brains. The modules showed periodical patterns inside the hippocampus that have not been described so far. Moreover, we also revealed human-specific structures in the ventral striatum (olfactory tubercle) and in the rostral migratory stream.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ヒト脳 海馬 腹側線条体 脳室下帯 記憶

### 1. 研究開始当初の背景

多くの神経科学者にとって、研究の究極の目的はヒトの脳を理解することである。しかし研究材料としては当然ながら制約があり、いわば代替手段として動物実験が行われている。その結果ヒトの脳の組織構造の詳細な解析が実は多くの領域で不十分なままである。私は、臨床応用を目指す日本人脳組織デジタルアトラス作成のために、ヒト大脳半球の完全連続切片標本を作成する方法を開発した (Fukuda et al., *Neurosci Res* 67:260-265,2010)。標本の予備的観察から、ヒトの脳だけに見られる構造がやはり存在しているという事実に気づいた。ヒト脳に固有の構造を明確に提示し詳細な解析を実施することの重要性にもとづき、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒトの脳にだけみられる新しい構造を、専門の神経解剖学的立場から詳細に解明するものである。第一に、ヒトの海馬でもっともよく発達している海馬足の内部にある、未知の特徴的な繰り返しユニット構造、第二に、生後ニューロン新生の現場である脳室下帯から嗅球へむかう rostral migratory stream が齧歯類やサルで観察されている構造とは恐らく違うこと、第三に精神薬理的にも重要な腹側線条体 (特に嗅結節) の複雑なモザイク構造とそれを横切って広がるカレハ島のヒト独特の発達の様子、これらについて Nissl 染色および種々の抗体を用いた免疫組織化学染色により、動物での解析と同じレベルの詳細な検討を加え、かつ連続切片三次元再構築を行い、本格的な形態学的研究をヒト脳について実施する。

### 3. 研究の方法

熊本大学医学部での解剖学実習に供するために献体されたご遺体の脳を用いて、連続切片標本を作成した。ご遺体の脳の使用に際しては、ご遺族に対して、体の一部が永久切片標本として大学に保管されることについての十分な説明を行い、納得の上で書面による同意が得られた脳を使用した。解剖学実習に供するご遺体としての通常の注入固定を行った後、脳を取り出して研究に用いた。連続切片作成は、申請者が確立した方法 (Fukuda et al., *Neurosci Res* 67: 260-265, 2010) に基づいて行った。

得られた連続切片に Nissl 染色または免疫組織化学染色を施した。画像解析ソフト NeuroLucida を用いて、連続切片の輪郭と主な内部構造をコンピュータ上でトレースした。海馬体内部の領域区分をトレースに書き込みながら、新たに見いだしつつあるユニット構造を同定し、その位置をプロッ

トした。

### 4. 研究成果

(1) 厚さ 100 ミクロンの完全連続切片を作成し Nissl 染色の後、コンピュータを利用してトレースし、再構成を行った (図 1)。様々な手技的工夫により、レンダリング等の修正を行うことなく、非常に正確に形態が再現された。ここでは海馬体を含む厚さ 1cm の部分のみを提示しているが、実際には一側の大脳半球のほぼ全体から、再構成像を得た。

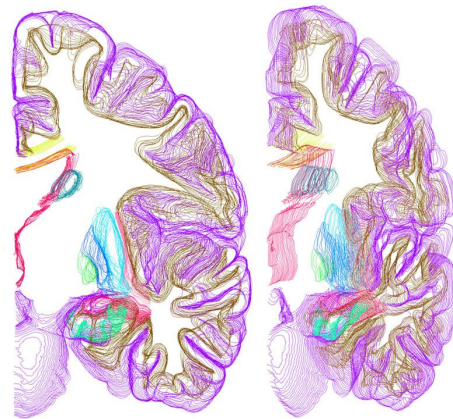


図 1 海馬足を含むヒト脳組織標本の再構成像。レンダリングは行っていないが、正確な再構成が得られている。角度を変えた 2 種類の透視像において、側頭葉内側深部に位置する海馬体を青緑色で示す。

(2) 次に顕微鏡観察による検討から、側頭葉の内側深部に存在する海馬の形態は、尾側においては実験動物と同様の単純な領域区分 (歯状回、CA3、CA1、海馬台) が同定可能であったが、最吻側に位置する海馬足は入り組んだ構成をとっており、組織学的にも CA3-CA1-海馬台の区分が容易ではなかった。またそれぞれの領域の三次元的配置も複雑であった。すなわち実験動物では錐体細胞の大きさに基づき、大型の CA3 領域と小型の CA1 領域を明瞭に区分でき、ヒト海馬の尾側部分でもほぼ同様の組織構築が存在していたが、吻側部分では、大型の錐体細胞の分布様式から、少なくとも 3 つの大型細胞領域が存在していた。歯状回の顆粒細胞層に囲まれた領域 (hilus とは異なる部分) において、広く散在性に分布するもの (マウスの CA3c に相当すると考えられる) そこから歯状回の外に出たところでは、大型錐体細胞が幅の狭い帯状を呈し、遠位部分で CA1 に接する領域。ここは実験動物の CA3 に相当すると考えられる。

ヒト海馬の尾側では、この領域が実験動物の CA3 と同様の形態を示していた。また吻側部分でも同様の形態を示す領域が認められ、その領域から外側方向へは CA1 に移行していた。しかしながら、同部位から内側方向へは、次に述べる繰り返しパターンを呈する大型細胞領域へと移行していた。海馬足内部において、上述の CA3 領域から内側方向へは、表層に CA3 と同様のサイズの大型ニューロンが集まり、キャップ状、もしくはドーム状の繰り返し構造を呈する領域が存在していた。そこからさらに内側へ進むと、CA1 領域と同様の小型細胞からなる領域へと移行していた。

### (3) 繰り返しパターンを示す大型錐体細胞が属する領域の検討

上記のように、大型錐体細胞が形成する繰り返しパターンが、海馬体のどの領域に属するかということが課題として浮かび上がった。この問題を解決するために、免疫組織化学的検討を行った。海馬 CA3 領域の錐体細胞は、歯状回顆粒細胞から mossy fiber として知られる軸索投射を受ける。そこで繰り返し配列をとる大型細胞領域が、mossy fiber の投射を受けるか否かを調べた。

歯状回顆粒細胞および mossy fiber は、カルシウム蛋白である calbindin 陽性であることが知られている。研究に用いたヒトの脳は、通常の解剖学実習に用いられるご遺体としての取り扱いをしたものであるため、免疫染色性は比較的弱いものとならざるを得なかった。しかしそれでも、実験動物と組織構成が似ているヒト尾側海馬での検討から、上記(2)の、領域は、calbindin 陽性の mossy fiber を受けており、CA3 としての特徴を有していた。一方(2)の領域は calbindin 陽性の mossy fiber を受けていないことが分かった。

このことをさらに確かめるために、mossy fiber をより明瞭に描出する他の方法を検討した。その結果、mossy fiber terminal に存在することが最近明らかになった、zinc transporter type 3 (ZnT3) が calbindin よりも明瞭に mossy fiber terminal を描出することを見いだした。そこでこの ZnT3 を用いて繰り返しパターンを示す大型細胞領域を調べた所、calbindin と同じく、mossy fiber を受けていなかった。一方、上記(3)の領域では ZnT3 陽性の mossy fiber pathway が明瞭に認められた。

マウスやラットでは、CA3 と同様の大型錐体細胞が CA1 との移行部に少数存在し、

そこは mossy fiber を受けていないことで CA3 と区別され、CA2 と称されてきた。問題としている、繰り返しパターンを示す大型細胞領域は、(i) CA3 と同程度の細胞体のサイズ、(ii) ZnT3 や calbindin の免疫染色で見ると mossy fiber を受けていないこと、(iii) CA1 類似の小型細胞領域へと続くこと、以上の観点から、CA2 と考えることが一応合理的であろう。しかしながら、その領域の広がりにはげっ歯類に比べてはるかに大きく、CA3 に匹敵する広がりを含んでいる可能性がある。しかも、他の動物には見られない特徴的な繰り返し配列をとっている。この2点において、ヒト海馬に独自の構造であるということが出来る。

### (4) サルにおける検討

同様の構造が、同じ霊長類であるアカゲザルにおいて認められるか否かを、脳連続切片を作成して検討した。その結果、やはりヒトの海馬にしか存在しないことが明らかとなった。

(5) 上述の ZnT3 免疫染色の検討においては、ヒトに応用する前に、まず最適な染色条件を設定できるマウスにおいて、詳しく調べた。その結果、ZnT3 が mossy fiber を描出するだけでなく、歯状回分子層や海馬台において、特異的染色を示すことが明らかとなった。またマウスの背側海馬と腹側海馬において、ZnT3 免疫染色性が異なっていることを見いだした。これらの内容を、平成26年度日本解剖学会全国学術集会で発表し、ヒト海馬での検討のための基礎的データとした。

### (6) さらに新規繰り返しパターンの同定

本研究を開始した時点では、ヒトの海馬体にはのみ存在する繰り返し配列を一つの領域として捉えていた。しかしながら、細胞体の大きさや免疫染色による詳しい検討の結果、実は繰り返し配列は、(3)で述べた、ヒト独自の CA2 領域だけでなく、よく似ているパターンが、小型細胞領域にも認められることが次第に明らかとなってきた。しかしこの領域を、直ちに CA1 と呼ぶことが必ずしも適当であるとは限らないこともわかった。なぜなら、実験動物の CA1 領域によく対応する部分、すなわちヒト海馬の尾側部分や、吻側海馬でも CA3 から内側方向へ進むと到達する CA1 領域では繰り返し配列は明瞭ではなかったからである。言い換えると、以前から知られている CA3-CA1-海馬台という軸に沿った CA1 領域では、繰り返し配列は明瞭ではない。一方、上記の

CA2 相当の繰り返し配列を示す大型細胞領域に隣接する物側部分を観察すると、繰り返し配列をもつ小細胞領域が出てくる。従って、ここが実験動物でいうところの CA1 に匹敵する場所なのか、ヒト海馬に特異的な領域なのかは、なお検討の余地がある。しかしながら、少なくとも繰り返し配列を示すという性質においては、この小細胞領域がヒト海馬独特の領域であることは疑いない。

(7) 海馬周囲の構造で、ヒトの脳に特徴的な繰り返し構造として以前から知られているものに、嗅内皮質および前海馬台のユニット構造があげられる。今回の研究でもそれらの構造を明確に同定することが出来た。これらと、海馬体内部に初めて見いだした大細胞および小細胞の二つの領域における繰り返し構造を、連続切片を用いて三次元的トレースを行い、それらの空間的配置と、各領域におけるユニットの数の定量を行ってきたが、その際、海馬体内部で繰り返しを示す領域を異なる二つの部分にわけて定量することや、属する領域の同定をどのように考えて行うべきであるかは、上に述べたように本研究を通じてようやく明らかになったところである。その成果を受けて、以上の解析を現在鋭意続行中である。

(8) 腹側線条体(嗅結節)および脳室下帯におけるヒト脳固有の構造

前有孔質として知られる領域は、大脳半球の中でも古い部分として底部に押込められているというのが通念である。しかしそこにもヒト脳固有の複雑な構造があることを見いだした。図2、3は連続切片のトレースに基づく再構築像であるが、腹側線条体(特に嗅結節)の複雑なモザイク構造とその中を横切って広がるカレハ島の分布を詳細に解析した。実験動物でも昔から存在のみは知られている、小さな細胞がコンパクトに島状に集積して作るカレハ島に加えて、その周囲にやや大きいサイズの細胞集団が広がり、加えてもう一回り大きなサイズの細胞集団がこれらの延長上に分布していた。

一方実験動物に共通して存在する脳室下帯 SVZ は、生後も細胞分裂により新しい神経細胞を嗅球に供給する場所であり、そこから新生ニューロンが嗅球へと移動する通り道には、rostral migratory stream と呼ばれる細胞の列が認められる。しかしこれらの構造がヒトでは実験動物と異なっていることが明らかとなった。すなわち、連続切片の再構築により、上衣層(ependyma)が側脳室から深く狭い井戸の様に落ち込ん

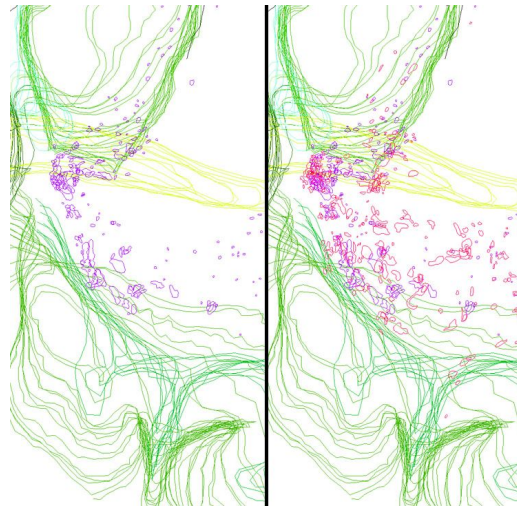


図2 前有孔質付近に広がるカレハ島(紫色)とその周囲に分布するやや大型の細胞集団(赤および橙色)

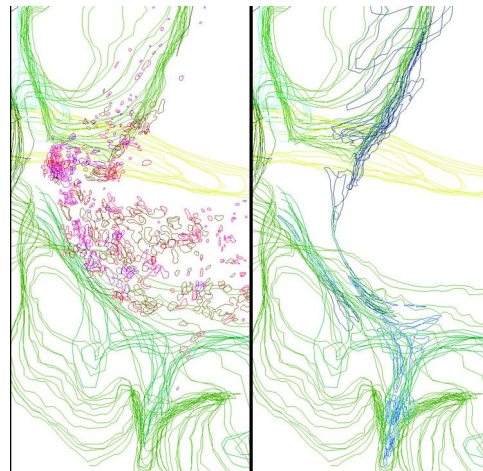


図3 左は図2に加えて、さらにサイズが大きい細胞集団を茶色で示す。一方右は、脳室下帯 SVZ を青色で、SVZ から延長する細胞遺残を青緑で示す。

でいるが、それは腹側線条体の底部で終わっていて、かつてヒトの脳にあると主張された、嗅球まで開いている脳室は存在しなかった、おなじ部分まで SVZ が ependyma を取り囲むように存在していたが、これは rostral migratory stream(RMS)として嗅索に入ることはなかった、しかし から連続するように、嗅索の中に向かう不思議な球形の構造物(中に均一に淡く染まる物質が含まれている)の列が認められた。おそらく、これはかつて嗅球まで連続して存在していた SVZ もしくは RMS の遺残物であり、死んだ細胞の残りが球形の構造物として嗅索の中に向かっていていると考えられた。すなわち、ヒトでは RMS は嗅球にまで至ることなく、途中で終わっていた。

(総括) 以上のように、本研究の結果、ヒト大脳半球連続切片の解析を通じて、サルを含めた他の動物に比べても顕著に大きな海馬体の中に、ヒトの海馬にしか存在しない繰り返し配列をとるユニット構造の存在とその詳細な性質を、明らかにすることが出来た。さらに嗅結節および脳下帯においてもヒト脳独自の構造が存在しており、その三次元的形態を明らかにした。

#### 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 件)

現在、論文投稿に向けて鋭意結果のまとめを行っている。

〔学会発表〕(計 2 件)

福田孝一 脳の形の縦断的研究：ニューロンの超微形態からヒト脳組織アトラスデジタル再構築まで 第 45 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2013 年 9 月 13-14 日 アクロス福岡(福岡県福岡市)

石原義久、福田孝一 マウス海馬台の構造に関する免疫組織科学的研究 第 120 回日本解剖学会全国学術集会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

#### 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