

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430039

研究課題名(和文) 嗅球のニューロン構成解析：糸球体近傍ニューロン群の再考

研究課題名(英文) The organization of the olfactory bulb: juxtglomerular cells revisited

研究代表者

小坂 克子 (Kosaka, Katsuko)

国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・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

研究成果の概要(和文)：嗅覚一次中枢主嗅球は感覚情報処理及び成体ニューロン新生のモデルとして広く解析されている。しかし、嗅球のニューロン構成はまだ不明な点が多いのが現状である。情報処理の機能的単位と考えられている糸球体の近傍ニューロン、特にドーパミン GABA糸球体近傍ニューロン(DA-GABA JG)について形態解析を進めた。DA-GABA JGは多様で、糸球体にタフト様の突起を有する典型的な傍糸球体細胞、樹状突起と考えられる突起を横に伸ばし複数の糸球体を通過しているニューロンも見られた。一方、optical fractionator定量解析でCRニューロンとSCGNニューロンの差異がより明確になった。

研究成果の概要(英文)：The main olfactory bulb (MOB) is now one of the most interesting parts of the brain as an excellent model for understanding the neural mechanisms of sensory information processing and as one of the most prominent sites whose interneurons are generated continuously in the adult periods. The neuronal organization of the MOB is fundamentally important, but it still remains to be revealed. We focused on the following two issues; 1) the heterogeneity and peculiarity of dopamine-GABAergic juxtglomerular cells (DA-GABA JG), and 2) the quantitative analyses of two subpopulations of juxtglomerular neurons containing calcium binding proteins calretinin (CR) and secretagogin (SCGN). With regards to DA-GABA JG, some small to medium-sized neurons displayed the characteristics of so-called periglomerular cells with tuft-like intraglomerular dendrites, whereas the structural features of large neurons participating in the long-range interglomerular connections remain to be revealed.

研究分野：神経解剖

キーワード：神経科学 解剖学 組織学 脳・神経

### 1. 研究開始当初の背景

近年、嗅覚一次中枢主嗅球は感覚情報処理のモデル及び成体ニューロン新生のモデルとして広く解析されている。特に、情報処理の機能的単位と考えられている糸球体の周辺部に存在するいわゆる糸球体近傍ニューロンは我々の研究や他の研究グループの解析によりその多様性が明らかとなってきた。それに伴い、かつては単純だとされていた嗅球のニューロン構成はまだ不明な点が多いということが認識されてきた。特に現在ドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロン(DA-GABA JG) と名付けたニューロン群はこれまで極めて特異な変遷を経てきている。カテコールアミン蛍光及び tyrosine hydroxylase(TH)陽性ニューロンとして検出された糸球体周辺の嗅球ドーパミンニューロンは当初大部分が興奮性の external tufted cell に属し、少数の小型のニューロンがいわゆる傍糸球体細胞 periglomerular cell に属すると考えられた。しかもそれらは GABA 性糸球体細胞とは別のグループであると報告されていた。しかし、その後の我々の解析により TH 陽性ニューロンが GABA ニューロンであることが明らかとなり、嗅球ドーパミンニューロンはドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロン(DA-GABA JG) とみなされるようになった。我々はこのドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロンの多様性に注目し、細胞体の大きさから大型と中～小型の2グループに大きく分けた。トレーサー実験により大型のドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロンが糸球体間の結合を担っている主体であることを示した。更に、ニューロン新生との関連で、中～小型の DA-GABA JG は成体でニューロン新生しているグループの一部であるが、大型の DA-GABA JG は胎児期に発生しているのみで、成体でのニューロン新生はしていない可能性が高いことを示した。更に、我々は軸索突起のマーカー・形態の検討から、大型の DA-GABA JG は明確な軸索を有し軸索突起を周辺に伸ばしているが、中～小型の DA-GABA JG では軸索の存在が明確ではないことを示した。しかし、DA-GABA JG の樹状突起の形態についてはこれまで不明であった。近年ある研究グループがこの DA-GABA JG ニューロン群はいわゆる傍糸球体細胞 periglomerular cell ではなくこれまで報告されていない短軸索ニューロンであると提唱した。しかし、その報告は軸索突起と樹状突起の区別を全くしておらず、また、これまででも観察されている DA-GABA JG でそのようなニューロン群と明らかに異なる特徴を示すものも多数存在することから、このドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロン(DA-GABA JG) の形態の詳細はまだ明確には確立していないといえる。

一方、我々は近年発見されたカルシウム結合蛋白 secretagoin (SCGN) を含有してい

る糸球体近傍ニューロンを解析し、その多様性、及び一部の糸球体近傍ニューロンにおける SCGN ともう一つのカルシウム結合蛋白 calretinin (CR) の共存関係を示した。しかし、両者の関係の詳細はまだ不明であり、嗅球ニューロン構成の解明にはその詳細の解明が必要であった。

### 2. 研究の目的

我々は上記のドーパミン-GABA 糸球体近傍ニューロンの多様性をより明確に認識し、形態の詳細を明らかにすることが必要であると考えた。また、カルシウム結合蛋白 secretagoin (SCGN) 含有糸球体近傍ニューロンとカルシウム結合蛋白 calretinin (CR) 含有糸球体近傍ニューロンのステレオロジー定量解析を進めることで、両者の差異を明確にすることを目指した。

### 3. 研究の方法

これまで解析してきた C57BL/6J 系マウス中心に解析を行った。更に、type 1, type2 periglomerular cells 提唱の基盤となったラットを比較しながら解析を進めた。マウス及びラットはリン酸緩衝4%パラフォルム液で経心臓的に還流固定し脳を取り出し、嗅球を寒天に包埋し、ヴィブラトームで50ミクロン厚の50~60枚の水平断連続切片を作成した。

#### (1) ニューロン形態の解析

a. 糸球体近傍ニューロン特にその多様性の解明のために脳定位固定装置を用いてごく微量のトレーサー(ビオチン標識デキストラン BDA) を電気泳動的に嗅球糸球体層に注入し数日後に還流固定し標識ニューロンを解析した。BDA はパシフィック・ブルー標識ストレプトアビジンで染色し、多重蛍光免疫組織化学法により、標識ニューロンの化学的性質を同定した。蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡で観察した。一部は、その後、同一標本を ABC 法で DAB 発色し、形態の詳細をカメラルシダ装置で3次元解析した。

b. DA-GABA JG cells の解析の第1の方法としては鼻腔閉鎖による機能的入力除去を用いた。機能的入力除去で TH 陽性要素が減少するので、少数の孤立して残存している個々の TH 陽性ニューロンの形態が解析できる。鼻腔閉鎖後4週で還流固定したラット及びマウスの嗅球で、TH 免疫組織化学を行い、ABC 法で処理し、カメラルシダ装置でニューロン形態を解析した。

c. DA-GABA JG cells の解析の第2の方法としては遺伝子改変マウス TH-GFP マウス嗅球スライスでの蛍光顕微鏡直視下でスライスパッチ法で単一ニューロン標識(バイオサイチン)を行い、標識ニューロンの3次元構造解析を行った(イタリア Ferrara 大の Dr. O. Belluzzi との共同研究)。

#### (2) ステレオロジー定量解析

各嗅球から作成した 50~60 枚の水平断連続切片をカルシウム結合蛋白 secretagoin (SCGN)あるいは calretinin (CR)に対する抗体を用い免疫組織化学法を行った。SCGN 含有糸球体近傍ニューロン、CR 含有糸球体近傍ニューロンは良好に染色されており連続切片の欠落がないと考えられたそれぞれ4嗅球を選び、3次元画像解析システム stereoinvestigator を用いた optical fractionator 解析を行った。

#### 4. 研究成果

4週間の鼻腔閉鎖による機能的入力除去でマウス及びラット嗅球では部位による差異はあるが、TH陽性要素が減少した。比較的少数の孤立して残存している個々のTH陽性ニューロンの形態解析は DA-GABA JG cells の多様性を明らかに示していた(図1、2:ラット嗅球)。明らかにタフト様の突起を糸球体で伸ばしている典型的な傍糸球体細胞 periglomerular cell と考えられるもの、層に平行な方向に長くスムーズな突起を伸ばしているもの、近接あるいは少し離れた複数の糸球体に突起を出しているもの等様々な TH陽性ニューロンが観察できた。

図1

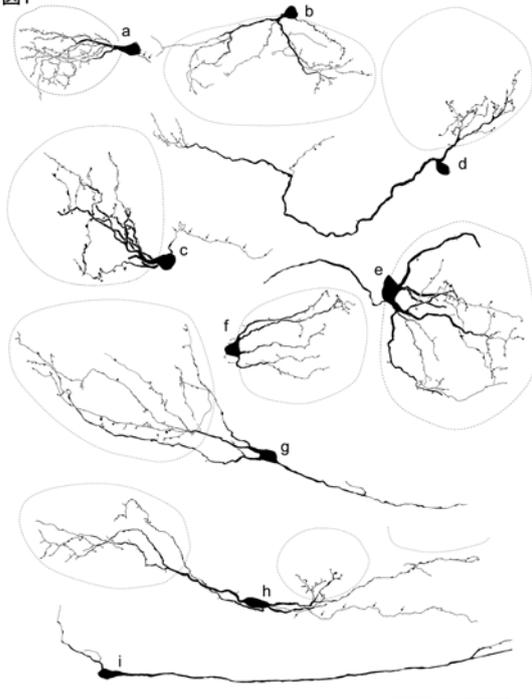
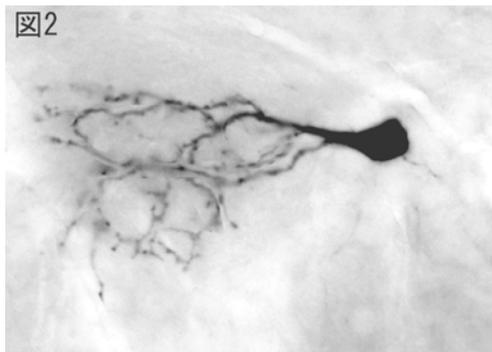


図2

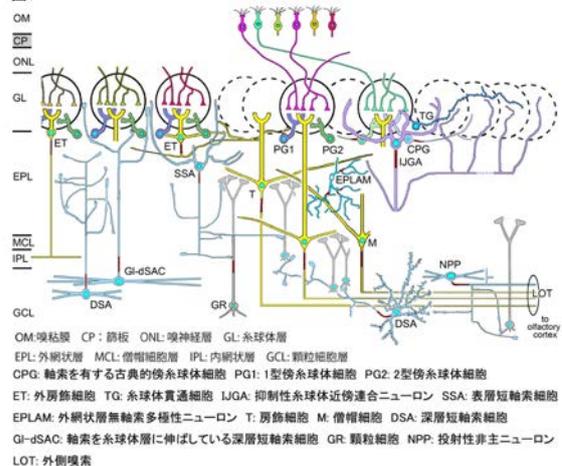


BDA 標識実験及び TH-GFP マウスでのスライスパッチ法による染色でも同様に多様な TH-GFP 陽性ニューロンが観察できた。これまでの実験では DA-GABA JG cells の多様性は確認できたが、まだサブグループを明確に分類できるまでには至っていないのが現状であり、より多数のニューロンの解析が必要である。

Optical fractionator によるステレオロジ定量解析は CR 含有糸球体近傍ニューロンは SCGN 含有糸球体近傍ニューロンの約3倍存在していることを示唆しており、両者の重複はみられるものの、CR 含有糸球体近傍ニューロンの大部分は別のニューロングループであると考えられる必要性が示唆された。

これまでの我々の解析を中心に嗅球局所回路のスキームを図3に示す。

図3



#### 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. T. Kosaka, S. Yasuda and K. Kosaka (2017) Calcium-binding protein, secretagoin, characterizes novel groups of interneurons in the rat striatum. *Neurosci Res.* 119, 53-60. Doi: 10.1016/j.neurores.2017.01.004.
2. T. Kosaka and K. Kosaka (2016) Neuronal organization of the main olfactory bulb revisited. *Anat Sci Int.* 91, 115-127. Doi: 10.1007/s12565-015-0309-7.
3. 小坂俊夫, 小坂克子 (2015) 嗅覚一次中枢嗅球のニューロン構成とシナプス結合 *福岡医学雑誌* 106, 1-15.

4. 小坂克子、小坂俊夫 (2014) げっ歯目嗅球において新たに発見された3種類の介在ニューロンに関する検討 日本味と匂学会誌 21、423-424.

5. K. Kosaka and T. Kosaka (2013) Secretagoin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb. Neurosci Res. 77, 16-32.

[学会発表] (計 2件)

1. 小坂克子、小坂俊夫 (2014) げっ歯目嗅球において新たに発見された3種類の介在ニューロンに関する考察 味と匂学会第48回大会 2014年10月2日~10月4日 静岡市

2. 小坂克子、小坂俊夫 (2014) 嗅覚一次中枢である嗅球の神経構成の解明：新たなニューロン群の解析 国際医療福祉大学学会 2014年8月30日~8月31日 栃木県大田原市

[図書] (計 1件)

T. Kosaka and K. Kosaka (2014) Olfactory bulb anatomy. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.04705-X.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

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・福岡保健医療学部・教授  
研究者番号：60202058

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

小坂 俊夫 (KOSAKA TOSHIO)  
国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・特任教授  
研究者番号：00126054

(4) 研究協力者

( )