

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19500301

研究課題名 (和文) 霊長類大脳の運動関連皮質における情報の流れと抑制／興奮神経回路網

研究課題名 (英文) Inhibitory and excitatory neuronal networks in the motor-related cortices of the primate

研究代表者

山下 晶子 (YAMASHITA AKIKO)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：30246889

研究成果の概要 (和文)：ラットやネコの大脳皮質ではパルブアルブミン (PV) 含有 GABA 抑制細胞は gap 結合 (電気的シナプス) で互いにつながり、同期発火する。サル大脳皮質でも gap 結合は PV 陽性樹状突起上に存在したが、ネコでは 1 個の PV 細胞が数十個の gap 結合を持つものに対し、サルでは 2～8 個の gap 結合を持つのみであった。錐体細胞の細胞体周囲に終末を持つバスケット細胞は GABA 抑制細胞であり、PV 陽性であることが知られている。霊長類では 1 つの錐体細胞を取り囲む PV 終末はげっ歯類よりも多い。げっ歯類では電気的シナプスを介した抑制細胞が同期発火し、興奮性錐体細胞を抑制するのに対し、霊長類では単一の抑制細胞が強力に錐体細胞を抑制し、GABA 細胞が同期して行う錐体細胞の抑制は弱いと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：In the cortex of the rats and cat, parvalbumin (PV) containing GABA inhibitory cells connected each other by gap junction (electric synapses). Thirty to fifty junctions were reported to exist on the dendrites of a PV cell in the cats. In the cortex of the monkey, on the other hand, only several gap junctions were observed on dendrites of each PV cells. PV cells were also known to have basket terminals on the excitatory pyramidal cells. A higher density of PV-containing basket terminals was observed on the pyramidal cells in the primate cortex than in the rodent. In the cortex of the primate, inhibitory cells inhibit the excitatory pyramidal cells stronger than in the cortex of the rodents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経科学 脳・神経 解剖学 細胞・組織 生理学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から、大脳皮質の抑制性 GABA 細胞を共存する化学物質によってさらに分類すると、パルブアルブミン (PV) 含有型、ソマトスタチン (SS) 含有型などのサブタイプに分類できることや、そのサブタイプによって細胞の形態、発火頻度などの生理学的特性にも違いがあることが主にげっ歯類を用いて明らかになっている。

(Kawaguchi & Kubota, 1993, 1997, Gonchar & Burkhalter, 1997 など)。さらにヒトの統合失調症例では PV 細胞の発達異常が観察されること (Goldman-Rakic, 1997 など) や自閉症モデルマウスで PV 細胞の異常が認められること (Fukuda, 2005 など) は以前からは知られている。また、SS 細胞に生じる異常は痴ほうやアルツハイマー病の原因の一つであるアミロイドβの蓄積と関係が深いという報告があり (Saito ら, 2005)、自然老化したサルやツパイでアミロイドの老人斑と SS 陽性の老人斑様構造が存在することを報告した (Yamashita ら, 2007, 2008 & 2010)。霊長類大脳皮質において、PV や SS を指標とした GABA 抑制細胞のサブタイプごとの性質を詳しく調べることは、これらのヒトで生じる疾患や症例の解明にもつながると考えられる。

皮質-皮質の相互結合は、これまでは層分布やカラム構造等が議論されてきた。最近、皮質を形成する個々の別の種類の細胞ごとにさらに詳しく調べる研究が進んできている。例えば、サルの視覚野では個々の軸索を調べる研究が行われはじめている (総説: Rockland, 2002)。ラットでは皮質-皮質間投射は興奮性錐体細胞が主に担っているが、そのターゲットとなる細胞は投射先の興奮性錐体細胞と PV を含有する GABA 細胞であることが分かり、回路網研究の手がかりとなっている (Gonchar & Burkhalter, 1997 など)。申請者もげっ歯類の視覚皮質領野間投射線維終末とその標的である GABA 細胞の結合についての研究 (Yamashita ら, 2003) やサル運動皮質の水平投射を個々に調べた研究 (Yamashita & Arikuni, 2001) を行ってきた。2004 年度には特定領域研究の助成を受け、霊長類大脳皮質では GABA 細胞そのものの密度は領野間の違いはないが、各サブタイプに属する細胞の比率が領野間で異なっていることや、視覚野と比べると運動野では GABA 細胞への投射終末のシナプスに含まれるミトコンドリアの密度に違いがあり、活動持続力に違いがあるのではないかなどの研究結果を得ている (Yamashita ら, 2006)。

さらに、近年、大脳皮質の PV-GABA 細胞はラットでは互いの樹状突起間に gap 結合 (電氣的シナプス) を持つことが知られている (Fukuda ら, 2006)。通常のシナプス結合とは異なり、gap 結合 (電氣的シナプス) でつながっているということは、同期発火するということであり、抑制性細胞が同期発火すれば、その領域の活動を強力に抑制することができる。

皮質内には興奮性錐体細胞の細胞体をかご状に取り囲むバスケット細胞や錐体細胞の軸索初節を取り囲み姿がシャンデリアのろうそくのように見えるシャンデリア細胞という介在細胞が古くから報告されてきている。近年、それらは PV を含有する GABA 細胞であることが明らかになってきている。

皮質内の興奮性/抑制性回路網を明らかにするためには、PV-GABA 細胞と gap 結合について調べることは有効な手段であり得るということを示唆する。

## 2. 研究の目的

### (1) 興奮性 forward/feedback 投射と抑制細胞

PV-GABA 細胞への入力、運動指令の流れである運動前野→第一次運動野と、その逆である第一次運動野→運動前野では違いがあるのか、あるとすればそれはどのような違いであるのかを明らかにする。ラット視覚系の forward (第一次視覚野→第二次視覚野) と feedback (第二次視覚野→第一次視覚野) で見られた特徴との違いや相同についても検討する。

### (2) PV-GABA 細胞のバスケット終末とシャンデリア週末

多くのサブタイプに分類される GABA 細胞の中でも、錐体細胞の細胞体を取り囲むバスケット細胞と軸索初節に終末を持つシャンデリア細胞という、錐体細胞の発火の制御、しいては情報の流れに大きく影響を持つ細胞が PV-GABA 細胞である。その終末の分布密度に領野ごとの違いがあるかどうかを明らかにする

### (3) PV-GABA 細胞の同期発火 (gap 結合/電氣的シナプス)

PV-GABA 細胞はラットでは互いの樹状突起間に gap 結合 (電氣的シナプス) を持つことが知られている (Fukuda ら, 2006)。この gap 結合がサルでも存在するのか、また、存在する場合、その強力な抑制機構には領野間の違いがあるのかも調べる。

### 3. 研究の方法

(1) 運動前野にトレーサーを注入したサルの運動野(運動の指令方向)と前頭前野(運動指令と逆方向)における、トレーサー陽性終末がシナプス結合を持つ細胞の性質を光学顕微鏡レベルおよび電子顕微鏡レベルの2重染色をすることであきらかにする。

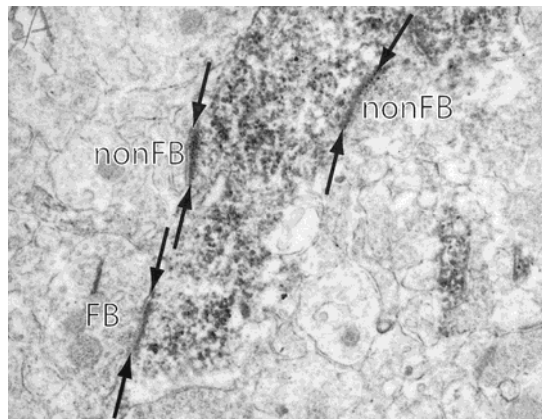
(2) PVに対する免疫組織化学を行った標本を用いて、バスケット細胞やシャンデリア細胞が錐体細胞に持つ終末密度を定性的に明らかにし、げっ歯類やツパイ類と比較し、さらに、霊長類の領野間の比較を行う。

(3) gap 結合の有無を電子顕微鏡で調べる。また、gap 結合特異的タンパク質であるコネキソン 36 に対する免疫組織化学方を行う。

### 4. 研究成果

(1)

先の特定領域研究助成により明らかにしたように、皮質-皮質投射のターゲットとなる GABA 細胞はサルでも PV 陽性細胞である。

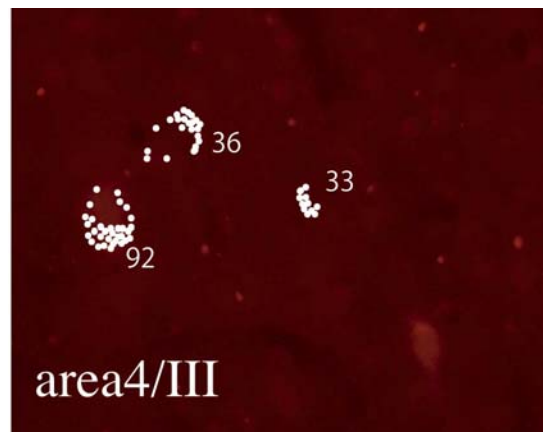


げっ歯類では一次感覚野→高次感覚野という感覚情報の流れと同じ方向である forward 投射線維の終末にはミトコンドリアが多く、逆に情報を上位から制御する feedback 結合の終末にはミトコンドリアはほとんどないということをすでに報告している(Yamashitaら、2003)。また、forward 終末は PV-GABA 細胞の細胞体に近い太い樹状突起に、feedback 終末は細胞体から遠い細い樹状突起に終末を持つ。ミトコンドリアがない終末はより疲労しやすいと考えられ、forward と feedback の終末には発火頻度や発火持続時間などに違いがあると考えられる。また、PV-GABA 細胞への入力も forward の方がより細胞体に近いことから、大きな影響を持つのかもしれない。しかし、霊長類では、視覚野の forward (第一次視覚野→第2

次視覚野)や feedback (第2次視覚野→第1次視覚野)にも、運動野の運動指令方向(運動前野→第一次運動野)とその逆の方向(第一次運動野→運動前野、運動前野→前頭前野)である線維のシナプス終末において、ミトコンドリアの存在量に違いは見られない。写真示すように FB 終末(運動皮質では運動前野→前頭前野)終末は、黒く染まっている PV 細胞の太い樹状突起にミトコンドリアを含む終末でシナプスを形成している。実は、げっ歯類では生後2週間程度の臨界期前では、forward と feedback には違いがないので、霊長類はげっ歯類のより幼弱な様子を残しているのかもしれない。

サルにおいて、PV-GABA 細胞への皮質-皮質投射線維入力において、forward と feedback という情報の流れる方向による差異はないと考えられる。

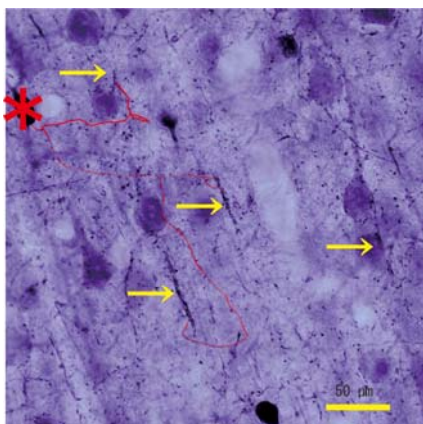
(2)



霊長類では、1つの錐体細胞を取り囲むパルブアルブミン終末はげっ歯類(<20個)よりも多く、軸索初節におけるシャンデリア終末密度は高かった。

この図は一次運動野である4野III層と前頭前野である46野III層において、錐体細胞の細胞体上のPV終末の数を数えた例である。数字は単一の錐体細胞の細胞体の上に存在したPV終末の数を示す。前頭前野では最大

で 134 個もの PV 陽性終末が錐体細胞を取り囲んでいる。また、運動関連皮質内で比較すると、前頭前野の錐体細胞への終末は第一次運動皮質や運動前野と比べると多い。



ヒトの脳皮質細胞の形態研究から、錐体細胞の軸索初節に多数の終末を持ち、あたかもシャンデリアのろうそくのように見える細胞にシャンデリア細胞という名前がついている。この写真で示すように、サルの大脳皮質でも赤い星印の PV 陽性シャンデリア細胞が黄色い矢印で示す複数の錐体細胞の軸索初節に終末集団を作っていた。ラットやマウスでは Somogyi (1977) はシャンデリア細胞とは呼ばずに axo-axonal interneurons と呼んでいたほど、その密度が低いことが知られている。

(3) 霊長類でもギャップ結合があるかどうかをすでに樹脂包埋してあるマカクサル大脳皮質標本を用いて電子顕微鏡で調べた。さまざまな包埋方法の標本を用いても gap 結合像は観察されなかった。

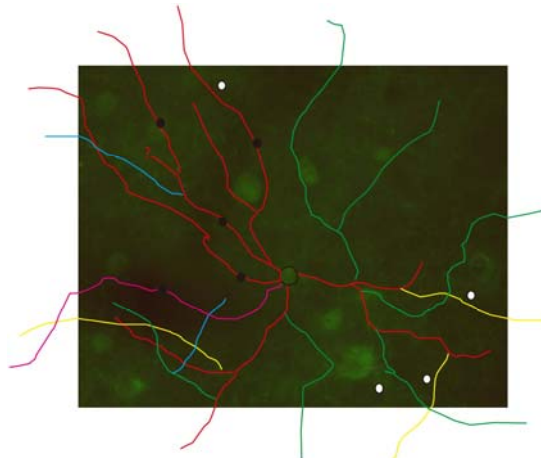
一方、gap 結合の特異的タンパク質であるコネキシン 36 を指標とした免疫組織化学法がネコで報告され (Fukuda ら, 2006 など)、抗体も各社から市販され入手が容易になった。そこですでに保存してあるサル標本を用いて適応可能かどうかを調べた。その結果、サル大脳皮質標本でもコネキシン 36 を指標とすれば、gap 結合が検出可能であった。

コネキシン 36 と PV の 2 重免疫組織化学法により、gap 結合はサル大脳皮質内の PV 陽性樹状突起上に存在することが確認できた。SS-GABA 細胞やカルレチニン陽性 GABA 細胞には gap 結合は観察されなかった。ラットやネコと同じく、PV-GABA 細胞が gap 結合で互いつながっているのが霊長類でも確認された。同時に、別の実験に用いたツパイ大脳皮質標本についても検索したが、ツパイでも PV-GABA 細胞に gap 結合が存在した。

ネコでは 1 個の PV 陽性細胞が数十個の gap 結合を持つのにに対し (Fukuda ら, 2006)、サルやツパイでは gap 結合を全く持たない PV 細胞もあり、gap 結合を持っている細胞でも

2-8 個の gap 結合を持つのみであった。

先に電子顕微鏡を用いてサル大脳皮質において gap 結合が確認できなかったのは、灌流固定方法や保存方法など、実験方法の問題ではなく、むしろ、分布密度が低いためであると考えられる。



写真は運動皮質 III 層に存在する PV 細胞の樹状突起の上に見つかった gap 結合の分布を表している。黒い点がこの単一 PV 細胞が持つコネキシン 36 陽性 gap 結合である。白い点は同じ視野の中にあるが、この PV 細胞ではなく、近隣の別の PV 樹状突起上にある gap 結合である。この細胞の場合、5 つの gap 結合は観察されたのみであった。

ヒトの大脳皮質組織では 2 重染色ができなかったため、PV 陽性樹状突起に gap 結合が存在するかどうかは確認できなかった。運動皮質や体性感覚皮質において、コネキシン 36 陽性構造の密度はサルと同程度であり、PV-GABA 細胞が gap 結合を持っているとしても、ラットと比べて少ない数の gap 結合しか存在しないと予想される。

#### < 結語 >

① 投射性錐体細胞の標的は PV-GABA 細胞であること、gap 結合を持ち電氣的につながっている PV-GABA 抑制性細胞が存在することなど、げっ歯類や食肉類、ツパイ類、霊長類では大脳皮質を構築する興奮性/抑制性細胞には多くの共通する特徴がある。

② げっ歯類では、電氣的シナプスにより同期した抑制性 GABA 細胞が、興奮性細胞の代表である錐体細胞を抑制する。霊長類では、単一の抑制細胞が強力に多数の錐体細胞を抑制するが、GABA 細胞が同期して行う抑制は弱いと考えられる。興奮性錐体細胞をどのように抑制することができるかに関しては、同じほ乳類大脳皮質でも動物種によって違いが見られた。

③ 大脳皮質領野間比較を行った場合、サルではどの領野でも gap 結合の数は少なく、領



野差は見られなかった。一方、錐体細胞を取り囲むPV終末の数は一次感覚野では少なく、運動関連皮質では多い。さらに、運動関連皮質の中でも前頭前野が最も多く、各領野の機能の違いを反映していると考えられる。

#### 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6件)

- ① Yamashita, A., Fuchs, E., Taira, M., Hayashi, M., Amyloid beta (AB) Protein- and Amyloid Precursor Protein (APP)-immunoreactive Structures in the Brains of Aged Tree Shrews, *Current Aging Science*, 査読有, 2010, 印刷中.
- ② Katsuyama, N., Yamashita, A., Sawada, K., Naganuma, T., Sakata, H., Taira, M., Functional and histological properties of caudal intraparietal area of macaque monkey, *Neuroscience*, 査読有, 167: 1-10, 2010.
- ③ Shijo, K., Katayama, Y., Yamashita, A., Kobayashi, K., Oshima, H., Fukaya, C., Yamamoto, T., *c-fos* expression after chronic electrical stimulation of sensorimotor cortex in rats, *Neuromodulation*, 査読有, 11: 187-195, 2008.
- ④ 澤田香織, 宮地重弘, 山下晶子, 今西美知子, 勝山成美, 泰羅雅登, 高田昌彦: 大脳皮質頭頂連合野から一次運動野への多シナプス性投射様式-狂犬病ウイルスを用いた研究-, *日本医学雑誌*, 査読有, 67: 115-122, 2008.
- ⑤ Murata, Y., Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M., Yamane, S.: Effects of motor training on the recovery of manual dexterity after primary motor cortex lesion in macaque monkeys. *Journal of Neurophysiology*, 査読有, 99: 773-786, 2008.
- ⑥ Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Murata, Y., Matsuda, K., Hayashi, M., Expression of protein kinase-C substrate mRNA in the motor cortex of adult and infant macaque monkeys, *Brain Research*, 査読有, 1171: 30-41, 2007.

[学会発表] (計12件)

- ① Yamashita, A., Taira, M., Oishi, T., Hayashi, M.: Parvalbumin/GABA cells in the monkey cerebral cortex: gap junctions, chandelier- and

basket-terminals. 第32回日本神経科学大会, 名古屋, 2009.9.17

(*Neuroscience Research* 65/S1 (2009) S143)

- ② Yamashita, A., Morishita, T., Shijo, K., Kobayashi, K., Oshima, H., Fukaya, C., Takamitsu Yamamoto Yoichi Katayama: Reaction of neurons and glia by chronic cortical stimulation in rats: neurogenesis and morphological changes in astroglia. XXXVI International Congress of Physiological Science. 京都, 2009.7.30
- ③ 勝山成美, 山下晶子, 沢田香織, 佐藤暢也, 海野俊平, 泰羅雅登: Cortical connections of caudal intraparietal area (CIP) in macaque monkeys. 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.11 (*Neuroscience Research* 61/S1 (2008) S245)
- ④ 山下晶子, Fuchs, E., 泰羅雅登, 林基治: Amyloid  $\beta$ -immunoreactive structures in the brain of aged tree shrews, 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.10 (*Neuroscience Research* 61/S1 (2008) S201)
- ⑤ 沢田香織, 宮地重弘, 山下晶子, 勝山成美, 今西美智子, 黒田呈子, 泰羅雅登, 高田昌彦: Organization of multisynaptic projections from posterior parietal cortex to primary motor cortex in macaque monkeys. 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.10 (*Neuroscience Research* 61/S1 (2008) S170)
- ⑥ 森下登史, 四條克倫, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 山下晶子, 深谷親, 山本隆充, 片山容一: ラットの sensorimotor cortex に対する長期慢性電気刺激によるグリア細胞の変化, 第47回日本定位・機能神経外科学会, 浜松, 2008.1.26
- ⑦ Murata, Y., Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M.: Effects of motor training on the recovery of hand movement after primary motor cortex damage: what can be recovered and what cannot be recovered, 37th Annual meeting Society for Neuroscience, San Diego, 2007.11.5 [Society for Neuroscience Abstracts 33 (2007)]
- ⑧ Oishi, T., Higo, N., Yamashita, A., Murata, Y., Matsuda, K., Hayashi, M.: Characterization of GAP-43

immunoreactive structures with neurotransmitter in the anterior horn of the macaque spinal cord, 37th Annual meeting Society for Neuroscience, San Diego, 2007.11. 4 [Society for Neuroscience Abstracts 33 (2007)]

- ⑨ Yamashita, A., Shimizu, K., Fuchs, E., Hayashi, M., Taira, M. : Somatostatin-immunoreactive degenerating structures in prefrontal cortex of aged tree shrews (*Tupaia*) and macaque monkeys, 第30回日本神経科学, 横浜, 2007.9.10 (Neuroscience Research 58/S1 (2007) S117.)
- ⑩ 林 基治, 山下晶子, 清水慶子, Fuchs, E., 泰羅雅登: 成熟期と老齡期のツパイ海馬体におけるBDNFとTrkBの免疫陽性構造, 第23回日本霊長類学会, 彦根, 2007.7.14
- ⑪ Yamashita, A., Shijo, K., Kobayashi, K., Oshima, H., Fukaya, C., Yamamoto, T., and Katayama, Y. : Long-term effects of STN-DBS: nigral cell degeneration and glial reactions in cortico-thalamo-basal ganglia system, The 6th Congress of Asian Society for Stereotactic Functional and Computer Assisted Neurosurgery, 静岡, 2007.5.24
- ⑫ 山下晶子, 四條克倫, 森下登史, 小林一太, 大島秀規, 深谷親, 山本隆充, 片山容一: ラットのsensorimotor cortex長期慢性電気刺激によるニューロンおよびグリア細胞におけるc-fos蛋白の発現, 第23回日本ニューロモデュレーション学会, 東京, 2007.5.12

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 晶子 (YAMASHITA AKIKO)  
日本大学・医学部・講師  
研究者番号: 30246889