

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300127

研究課題名(和文) 大脳皮質神経回路の不可欠な構成要素としてのギャップ結合性神経細胞連結の解明

研究課題名(英文) Neuronal linkage through gap junctions as an essential component in cerebral circuitry

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) 15,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞はシナプスを介してネットワークを形成しているが、最近通常のシナプスとは異なる結合様式が、ほ乳類の脳でも存在していることが明らかになってきた。それはギャップ結合と呼ばれ、二細胞の細胞質が直接連絡する通路を作るために、電気シグナルが直接伝達され、脳の情報処理に重要である同期的活動(synchronization)を支える構造である可能性がある。しかし技術的な困難さから、ギャップ結合による神経細胞連結の具体的な姿はベールに包まれたままであった。本研究は大脳皮質視覚野とバレル野において、その三次元的な連結様式を初めて可視化し、種々の形態学的性質を見だし、大脳皮質研究に重要な知見をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Neuronal networks in the brain are generally mediated by synapses, but recent studies have shown the existence of another form of neuronal linkage in mammalian brains, that is the network through gap junctions. Gap junctions form intercellular channels through which cytoplasm of two neurons are directly connected to each other. This particular property of gap junctions is thought to underlie the synchronization of neuronal activities and play an important role in information processing in the brain. However, due to the technical difficulties, it remains almost unknown where and how neurons are linked through gap junctions within the tissue architecture of the brain. The present study has succeeded in visualizing the actual three-dimensional structure of gap junction-coupled network in the visual cortex and barrel field of somatosensory cortex. The detailed analysis of various morphological features of gap junction network led to novel findings on the cerebral cortex.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ギャップ結合 大脳皮質 パルプアルブミン GABA インターニューロン 視覚野 コネキシン36 バレル野

1. 研究開始当初の背景

(1) ほ乳類の中枢神経系においても、神経細胞間にギャップ結合が幅広く存在し、電気シナプスとして機能していることが、2000年前後から急速に明らかになってきた。それまでは、主に形態学における先駆的研究者により、脳のいくつかの場所で神経細胞間のギャップ結合の存在が、ある程度知られてはいたが、同定の技術的な難しさから、ギャップ結合の存在を電子顕微鏡により偶然とらえることはできても、それが脳の神経ネットワークの中にどのように位置づけられ、それにより機能発現においてどのような役割を果たしているかという問いかけに答えるまでには至らなかった。

(2) かつて私は、電子顕微鏡による同定により、新皮質と海馬のプルパアルブミン含有インターニューロン(PVニューロン)が、樹状突起間に豊富にギャップ結合を形成していることを既に見いだしていたが、特に2006年~2009年の研究において、ニューロン特異的なギャップ結合蛋白であるコネキシン36(Cx36)の免疫染色を利用し、共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡の二重観察法を駆使することにより、広い視野でギャップ結合による神経細胞連結を解析する方法を確立した。それにより、視覚野2/3層および線条体におけるPVニューロンのギャップ結合性連結の特徴を、詳細に解析した。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、これまでの研究をさらに発展させ、中枢神経系におけるギャップ結合の意義を、より直接的に示すような構造を見いだすことを目的とした。

(2) そのために、特に初期視覚野および体性感覚野バレル領域の4層におけるPVニューロンのギャップ結合性連結の具体的な姿を解明することをめざした。その理由として、

初期視覚野およびバレル領域は、大脳皮質の中でも大きな研究の積み重ねがある場所であること、4層は視床からの感覚入力を最初に受け取る場所であり、大脳皮質における感覚情報処理の鍵となる位置にあること、

特に4層のPVニューロンの電気生理学的特徴が近年注目されており、強力なfeedforward抑制に関わっている可能性が指摘されること、他方PVニューロン間のギャップ結合と相互抑制シナプス結合が、大脳皮質に幅広く見られる同期的神経活動に関わっていると考えられていること、以前に私が見いだした視覚野2/3層におけるPVニューロン間ギャップ結合の特徴と比較できること、このようなことがあげられる。

3. 研究の方法

(1) 視覚野における研究は、これまでの私の研究を発展させるために、以前と同様にネコの視覚野を研究対象とした。またバレル領域はマウスを用いた。ネコの脳は、明治国際

医療大学の熊本賢三博士から、同大学において維持された動物を深麻酔下に灌流固定して得られたものを材料として提供を受けた。マウス脳は当教室において深麻酔下に灌流固定した。いずれも振動刃ミクロトームにより厚さ40ミクロンの脳連続切片を作成した。PV、Cx36、小胞型グルタミン酸トランスポーター2型(VGluT2)、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)などに対する抗体を用いて多重免疫蛍光染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)により、ネコ初期視覚皮質(17野、18野)およびマウスバレル領域におけるPVニューロン間のギャップ結合性神経連結を示す像を取得した。画像解析アプリケーション(Neurolucida)を用いて、CLSMM画像に基づき、ギャップ結合により連結したPVニューロンの樹状突起の3次元網状構造をトレースした。トレースはデジタルデータとしてコンピュータに記録されるので、それを用いてさまざまな定量的解析を行った。

(2) さらにPVニューロンが形成するギャップ結合性ネットワークを駆動する入力構造を形態学的に同定するために、共焦点レーザー顕微鏡によりVGluT2陽性ブトンとPVニューロンとの関係を調べた。その際に、CLSMMでとらえたブトンを、引き続き電子顕微鏡により同定し、実際にそれらが高い確率でシナプス結合を形成していることを確認した。同様にPVニューロンどうしの相互抑制性結合の有無を、CLSMM-EM法により追究した。

4. 研究成果

3年間の研究により、ギャップ結合により連結した大脳皮質PVニューロンの形態学的性質について、数多くの新しい知見を得た。それらを総合することにより、中枢神経系においてギャップ結合が果たす役割についての重要な示唆を与える、画期的な成果を得ることが出来た。

(1) ギャップ結合により連結する樹状突起は、網状構造reticulumを作っている

PVとCx36の二重免疫染色標本を最初に高倍率CLSMMにより観察し、引き続き同一構造物を電子顕微鏡観察することにより、PVニューロンの樹状突起間に存在するCx36陽性の点状構造が、電子顕微鏡的に確実なギャップ結合像を呈することを、まず確かめた。この結果に基づき、CLSMMでCx36陽性像としてとらえられるギャップ結合の存在様式を詳細に検討し、ギャップ結合は単純に二細胞間の連結として存在するというよりも、錯綜する多数の樹状突起間を網の目のように連結している姿が、初めて明らかになった。この構造を、dendritic reticulum(樹状突起細網)と命名した。

(2) dendritic reticulumは大脳皮質の組織構築に一致する3次元構成をとる

CLSMM像に捉えられる樹状突起細網は、複雑で密なメッシュワークのように見えるため

に、当初は無秩序な網目構造である可能性が考えられた。もしそうであるならば、ギャップ結合により細胞質が連結している PV ニューロンの reticulum は、一種の合胞体として、特定の空間的方向性を示さずに電氣的シグナルを伝達する装置である可能性が考えられる。そこで、18野において、ギャップ結合により連結した PV ニューロンの細胞体と樹状突起を網羅的にトレースし、三次元構成を再構築した。すると、PV ニューロンの樹状突起の中で、縦方向に伸びるものが集まり、束のように見える構造(dendritic bundling)を4層において形成していることが明らかとなった。18野の PV ニューロンは樹状突起を各方向に伸ばす多極型細胞であるが、そのなかで apical-basal 方向に伸びるものが特に集まっていた。またこの bundling はおよそ 100~150 ミクロンの繰り返しパターンを形成していた。このような構造は、大脳皮質の基本的組織構築であるカラムとの関連を強く示唆する。実際 dendritic bundling は、同じカラム状空間の中に存在する細胞体から伸びており、それらの細胞体の分布は3層底部、4層、5層上部に及んでいた。特に4層では細胞体が集まりクラスターを形成していた。

さらにこの dendritic bundling において、ギャップ結合による連結がどのように行われているかを解析したところ、次の二つの様式が存在していた。カラム状空間の中で縦方向に離れたニューロン間を、縦に伸びるギャップ結合が橋渡しするように連結するクラスター状に集まるニューロン間では、近位樹状突起間に存在するギャップ結合による相互結合がある。この場合、樹状突起の方向性は一定しない。

の結合様式は、層を越えた二細胞間にも存在しており、その場合、一組のペア間に複数のギャップ結合がしばしば認められた。たとえば3層底部と4層上部の一組の PV ニューロン間に、9個のギャップ結合を形成する例もあった。

以上のように、大脳皮質カラム構成との関連を強く示唆する結合様式が見いだされたが、詳しく観察すると、ギャップ結合による PV ニューロンの連結は、決してカラム内で排他的に形成されるのではなく、隣の dendritic bundling どうしの間にもある程度存在していた。さらに、大型 PV ニューロンではより遠く離れた相手との結合も認められた。したがって、以前から指摘されているように、大脳皮質のカラム構成は決して排他的モザイクではなく、横方向に連続性を有していると考えられるが、ギャップ結合によるインターニューロンの連結様式も、それを指示する形態をとっていた。

他方、カラム構成と並び、大脳皮質の組織構築を特徴づけるのは、層別の特異化である。そこで1層から6層まで、ギャップ結合の空間密度を定量し比較したところ、4層におい

て最も高い密度を示し、1層および6層に向けて密度が低下していた。

以上から、18野の4層において、PV ニューロンがギャップ結合を介して形成する樹状突起細網構造は、縦方向のカラム構成、および横方向の層別構成のどちらにおいても、それに合致するような形態学的特徴を示すことが明らかとなった。

一方マウスバレル領域においては、バレルとセプタに存在する PV ニューロンの樹状突起の形態を4タイプに分類した。それぞれのタイプ間のギャップ結合による連結様式には、バレル構造に深く関連する特徴的なパターンが見られた。

(3) ギャップ結合の位置(細胞体からの距離)における非対称性の発見

上に述べたように、視覚野においてカラム間を縦に走る樹状突起の束(dendritic bundling)は、縦方向に離れたニューロン間をギャップ結合に寄って連結する役目を持つことが形態学的に明らかになった。しかしここでその生理学的意義を考える上での大きな問題が提起される。すなわち、樹状突起は軸索と異なり、シグナルの伝達において passive であるため、遠位樹状突起にギャップ結合があっても、ほとんど機能していないのではないかという考えが以前から出されていた。そこで、ギャップ結合の一つ一つにおいて、細胞体までの距離を樹状突起に沿った道のりとして測定したところ、204個のペアのうち、158個(77.6%)において、少なくとも片方の細胞体までの距離は50ミクロン以下であり、さらに186個(91.2%)において、少なくとも片方の細胞体までが75ミクロン以下であった。すなわち、多くの場合、ギャップ結合を形成する二つのニューロンの少なくとも一つは、ギャップ結合を近位樹状突起上に作っていた。これまでの電気生理学的研究によって、ギャップ結合により連結した二細胞間の距離が100ミクロン以下のペアでは、活動電位が相手に spikelet として同期的に伝わり、その大きさ(amplitude)は化学シナプスにおける EPSP と同程度であること、またこの伝達は両方向性に起きる事が示されている。従って、上述の、ギャップの位置における非対称性は、近い方のニューロンが presynaptic、遠い方のニューロンが postsynaptic となるギャップ結合(電気シナプス)の結合様式を意味していると考えられる。他方、クラスターを形成する近接ニューロン間では、それぞれの樹状突起の近位部どうしにギャップ結合を持つことから、この場合、どちらも presynaptic として働きうる両方向性の連結を作っていると考えられる。これはまさに、二細胞同時パッチクランプにより電気生理学的に示されてきたギャップ結合の性質に対応するものである。一方、カラム内で縦方向に離れたニューロン間のギャップ結合は、一方が presynaptic、他方が postsynaptic として、カラム内での同期性

を強める役割が期待できる。さらに水平方向に離れたニューロン間を結ぶギャップ結合も、同様の pre-post の関係を有する連結様式により、カラム間のシグナル伝達を担っていると考えられる。

(4) ギャップ結合性ネットワークへの駆動性入力

大脳皮質感覚野の4層は、視床からの駆動性入力を受ける場所である。視覚野では外側膝状体からの入力に該当する。このような入力を担う軸索終末は、VGluT2の免疫染色陽性であることを利用して、視覚野においてPVニューロンネットワークへの駆動性入力構成を調べた。

4層PVニューロンに認められた顕著な特徴として、その細胞体がVGluT2陽性の多数の大型ブトンによって取り囲まれていた。さらにCLSMによってとらえたブトンを直接電子顕微鏡で観察し、そのような像において多くの場合、実際に非対称型シナプス結合がそこに形成されていることを定量的に確認した。これに基づき、CLSM観察で多数のPVニューロン細胞体を対象に、その上にあるVGluT2陽性ブトンの密度(単位周長あたりの数)を計測し、層別、およびPV陽性GABAニューロンとPV陰性GABAニューロン間で比較検討した。その結果、4層PVニューロンは他の層に比べて細胞体上に高い密度でVGluT2陽性ブトンを受けていること($p < 0.001$ Kruskal-Wallis test)、またそれは4層のPV陰性GABAニューロンよりも有意に高い密度であることを示した。4層のspiny stellate cellへの視床入力、樹状突起棘(spine)上に形成され、視床から感覚皮質への情報伝達が行われていると考えられているが、PVニューロンでは細胞体上に多数の大型ブトンがあり、すなわち細胞の中心部分に直接入力していることになる。このstrategicalな位置は、生理学的には、PVニューロンが視床入力を受けて強力なfeed forward制御を、spiny stellate cellに及ぼしていると考えられている構造にまさに合致するものであった。そしてこの視床からの駆動性入力により4層PVニューロンが興奮し活動電位を発生すると、恐らく上記のようにギャップ結合を介して相互に同期的興奮性入力として影響を及ぼしあうと考えられる。

(5) 相互抑制性結合

4層PVニューロンは上述の視床由来入力だけでなく、PV/GAD二重陽性のブトンも、細胞体および樹状突起近位部に多数存在している像が観察された。そこでVGluT2同様の定量解析により、やはり4層PVニューロンは他の層に比べて細胞体上に高い密度でPV/GADn二重陽性ブトンを受けていること($p < 0.001$ Kruskal-Wallis test)、またそれは4層のPV陰性GABAニューロンよりも有意に高い密度であることを示した。す

なわち、4層PVニューロンは相互抑制性結合を特に密に形成していることを明らかとした。このことは、生理学的に示されている結果に合致する構造であり、相互抑制性結合は、大脳皮質における同期的振動現象(oscillation)の発生機序に関わると考えられている。

以上のように、これまでその存在自体は証明されてきたが、具体的に神経回路のどこに存在しどのような機能的意義をもちうるかということが全く謎であった、神経細胞間のギャップ結合について、さまざまな形態学的特徴を明らかにすることが出来た。dendritic reticulumと命名した構造は、100年以上前のゴルジとカハールの論争以来の神経解剖学の大前提、すなわち軸索と化学シナプスによるネットワークを基盤とするニューロン説に対して、網状説の復活ともいえる大きな問題提起であるため、研究結果の論文化に先立ち、慎重を期すべく、さまざまな観点からの詳細な解析を実行し、毎年学会において発表を行ってきた。3年間の膨大なデータを論文化するために十分な成果が得られ、近く投稿する段階にある。なお、様々なデータを示す図表は、投稿論文における著作権の問題から、ここでは割愛した。

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)

上記のように、本研究課題により得られた成果は、神経科学の根本概念に変革を迫る内容であり、論文発表に際しては正確を期すために、論文化を急がず、幅広い観点から精密かつ慎重な検討を行った結果、三年間の研究により十分なデータを得た。下記学会発表の内容をまとめ、論文投稿の準備を行っている。

[学会発表](計7件)

重松直樹、福田孝一 マウス体性感覚野パレル皮質4層におけるパルブアルブミン陽性細胞の特徴的な形態 第118回日本解剖学会全国学術集会 2013年3月28-30日 サポートホール高松(香川県高松市)

福田孝一 大脳皮質parvalbumin陽性ニューロンがギャップ結合を介して形成する樹状突起細網“dendritic reticulum” 第119回日本解剖学会全国学術集会 2014年3月27-29日 自治医科大学(栃木県下野市)

重松直樹、福田孝一 マウス体性感覚野4層におけるパルブアルブミン陽性ニューロンのギャップ結合を介した特徴的な樹状突起網 第119回日本解剖学会全国学術集会 2014年3月27-29日 自治医科大学(栃木県下野市)

宇都宮貴史、重松直樹、福田孝一 マウスパレル皮質におけるインターニューロンの

立体構築解析 第 119 回日本解剖学会全国学術集会 2014 年 3 月 27-29 日 自治医科大学 (栃木県下野市)

福田孝一 ギャップ結合は視覚皮質パルプアルブミン含有 GABA ニューロン間の樹状突起結合をカラム状空間内およびカラム間に形成する 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11-13 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

重松直樹、福田孝一 マウスバレル野 4 層におけるパルプアルブミン陽性ニューロン間のギャップ結合を介した多様な樹状突起網 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11-13 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

福田孝一 大脳皮質にはもう一つの神経ネットワークが基本構造として存在する：ギャップ結合を介して抑制性ニューロンが形成する樹状突起細網 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

(2) 連携研究者

重松 直樹 (SHIGEMATSU, Naoki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：30469613