

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06748

研究課題名(和文) 高次脳中枢による嗅球神経回路調節の形態学的基盤

研究課題名(英文) Structural basis for centrifugal regulation of synaptic circuit in the olfactory bulb

研究代表者

樋田 一徳 (Toida, Kazunori)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40253405

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)：本研究は、嗅球シナプス神経回路の調節機構の解明を目的とし、一連の解析知見と予備的実験に基づき、神経回路の調節に密接に関わっていると考えられる遠心性入力、シナプス結合を含めた詳細な微細構造解析を行なうものである。具体的には嗅球へ投射するセロトニンニューロン、アセチルコリンニューロン、ノルアドレナリンニューロンについて単一ニューロン標識と広範囲電子顕微鏡解析を組み合わせた統合解析を行った結果、3種のニューロンは嗅球各層で異なる線維分布を示し、そのシナプス標的ニューロンもそれぞれ異なっていることが分かった。精巧な嗅球シナプス回路は、他の脳領域から精緻な調節を受けていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research aims to establish structural basis for centrifugal regulation of synaptic circuit in the olfactory bulb, from our previously consistent studies with correlated laser and electron microscopy. We have paid special attention to serotonergic, cholinergic and noradrenergic neurons projecting to the olfactory bulb. These neurons have been examined by single-neuronal labeling as well as wide-field laser/electron microscopic analyses, correlated laser and volume EM study. Results indicated interesting findings exhibiting layer-specific distribution by three kinds of centrifugal projections to the olfactory bulb. These findings have suggested more elaborate features of regulation of the synaptic circuit in the olfactory bulb than previously considered.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経回路 嗅球 シナプス結合 遠心性調節 セロトニン アセチルコリン ノルアドレナリン

1. 研究開始当初の背景

嗅覚の一次中枢嗅球は、情報の入力と出力の伝達経路が独立し、また比較的少数のニューロン種による単純明瞭な層構造に、豊富な生理活性物質を含有するという特徴を有することから、脳神経回路の基本的構造と機能を理解するための魅力的な解析モデルと考えられ、Cajal 以来、脳研究の対象となって来た。

1990 年代初めの Axcel らの解析をはじめとした研究によって嗅受容細胞の匂い分子受容体遺伝子がクローニングされ、同じ遺伝子を発現する嗅受容細胞からの軸索は嗅球表層の糸球体に特異的に収束することがわかり (2004 年ノーベル医学生理学賞) 特定な匂い刺激に対し特定な糸球体が反応することから糸球体は嗅覚の機能的構造単位と考えられるようになった。

注目すべきは、無数の嗅受容細胞 (マウスで数百万) が少数の嗅球糸球体 (マウスで約 2 千個) に特異的に収束した後、より多数の投射ニューロンにシナプス結合し、高次中枢に匂い情報を伝えるという解剖学的な収束・開散パターンである。このことは、無数の化学的刺激源によってもたらされる嗅覚情報が一旦糸球体でいわば圧縮・解凍される、複雑な匂い情報を処理する精巧な神経回路が嗅球に存在すると推測される。しかし嗅球神経回路について一般的に信じられていた従来の定説は極めて単純で、分子レベルの嗅覚受容メカニズムを十分説明できるものではなかったため、申請者らは、より精度・確度の高いニューロンの同定に基づいたシナプス神経回路の解明の必要性を感じ、これまで一貫して電子顕微鏡による三次元構造解析を行ってきた。その結果、嗅球を構成するニューロンは化学的性質と形態的特徴の面で極めて多様であり、化学的・形態的に同定された異種のニューロンはまた異なるシナプス結合を形成することが明らかとなった (Toida 2008)。我々の形態学的知見は、専門書 (“Rat Nervous System” Paxinos 2004; “The Synaptic Organization of the Brain” Shepherd 2004) に引用され、また多様なシナプス結合を形成するニューロンは機能的にも異なる役割を神経回路内で演じていることが示唆され、多様な嗅球ニューロン種の個別の電気生理学的・薬理学的特性の同定が進んだ。 (Hayar J. Neurosci. 2005, Karnup J. Neurophysiol. 2005)

一連の解析の中で、未同定のニューロン種からのシナプス結合が発見された。嗅覚情報伝達を担う神経回路の調節に重要なシナプス結合を形成する嗅球介在ニューロンには、嗅受容細胞の他、投射ニューロン及び GABA ニューロンの樹状突起から様々なパターンで入力を受けるが、この他に、豊富な球形小胞と少数の有芯性小胞を含む軸索様構造から様々な程度の非対称性シナプス結合を受けるのがしばしば観察され、その数、シナプ

ス構造、シナプスの分布から、介在ニューロンの調節に重要な役割を担うと推測されていたが、研究開始当初の段階では、これらのシナプスを形成するニューロンは未同定であった。当時推測されたのは、古典的に嗅球にその存在が示された高次中枢からの遠心性入力、即ち、セロトニン (縫線核より)、アセチルコリン (対角束核より)、ノルアドレナリン (青斑核より) のニューロン群である。これら遠心性成分の嗅球内の線維分布と受容体の存在は報告されているが数少なく、それぞれどのタイプの嗅球ニューロンとどのようなシナプス結合を形成しているのかは解析されておらず、その機能的意義も推測の域に留まっていた。 (Toida 2008)

そこで、これら遠心性入力、前述のように我々の解析で未同定だった入力成分に相当するのではないかと着想した。それは、研究開始時に着手していた予備的形態解析、及び海外研究協力者らによる電気生理学的解析による裏付けがあったからである。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究は、嗅球シナプス神経回路の調節機構の解明を目的とし、一連の解析知見と予備的実験に基づき、神経回路の調節に密接に関わっていると考えられる遠心性入力の、シナプス結合を含めた詳細な微細構造解析を行なうものである。複雑な匂い情報を処理する嗅球シナプス神経回路をより正確に深く理解する為に、一連の研究を発展的に展開し、微細構造レベルでの確かな形態学的基礎を構築することが本研究の目的である。

この目的を達成するため、嗅球シナプス神経回路へ遠心性入力するニューロンのうち、予備実験データをもつアセチルコリンニューロンに注目して焦点を絞り、三次元構造とそのシナプス結合の定量解析を行ない、遠心性調節の機能的意義を明らかにする。また、その解析知見を基盤にして、期間後半より、他の遠心性入力成分の検討も計画した。

近年脚光を浴びる嗅覚系研究領域で、申請者らは比較的早く研究を始め、国際的にも遂行する者が少ない電子顕微鏡連続切片再構築法により、分子レベルの解析前に提唱された神経回路の定説を大幅に修正している。当該研究は、独自のこの解析法を更に発展的に遂行する点で、これまで同様に確かな微細構造的指針を嗅覚研究に提示すると考えられ、遂行する意義は極めて大きい。

加えて、抑鬱などの精神症状との関係で注目されるセロトニン、アセチルコリンによる嗅覚系の中枢性制御機構の解明は、辺縁系、前頭皮質系、間脳・脳幹系などによる情動や生体リズムが化学的感覚といかなる関係かを明らかにし、他の脳領域の神経回路メカニズムの解明に寄与すると考える。

嗅覚から他の脳機能に対し基礎的知見が提供できることに本研究の独自性がある。

3. 研究の方法

【実験動物】動物は C57BL6 系、Serotonin (5-HT) -Cre、Choline Acetyltransferase (ChAT ; アセチルコリン Ach 合成酵素) -Cre、Dopamine-β-hydroxylase (DBH ; ノルアドレナリン NA 合成酵素) -Cre、Tyrosine Hydroxylase (TH ; L-DOPA 合成酵素、ドーパミン合成律速酵素) -GFP の各種 transgenic mouse を用いた。これらは、川崎医科大学動物実験委員会、同組み換え DNA 委員会の審査と承認を受け動物を導入し、同動物委員会指針に基づき、川崎医科大学中央研究センターにより実施した。

【動物実験】動物飼育・系統維持、麻酔、ウイルスによる遺伝子導入定位脳手術、灌流固定、ピプラトーム切片作製、フリーフロート染色などは、研究代表者らの従来の方法による。

【基本手法】

(1) ニューロンの全貌 :

① 単一ニューロン標識法 : C57BL6 系および TH-GFP マウスには、sindbis virus による palmitoylation signal (pal-GFP, pal-mRFP) を組み込んだ recombinant sindbis virus を用い縫合線核 in vivo injection による脳定位標識を行い、単一ニューロンの完全再構築を試みた。各種-Cre マウスに対しては、アデノ随伴ウイルス AAV を用い、5-HT、ChAT、DBH-Cre により、5HT、Ach、NA ニューロンを標識した。

② 免疫組織化学法 : 5-HT ニューロンには抗 5-HT、ACh ニューロンには抗 Vesicular ACh transporter (VAChT)、そして NA ニューロンには抗 Norepinephrine Transporter (NET) 抗体を用い、ニューロンの脳内線維分布と嗅球への分布の度合いを検証した。更に嗅球各層内の線維群の三次元構造を、neurolucida により三次元的に複数切片の切片越え再構築し解析した。これら各種抗体と共に、calbindin (CB)、calretinin (CR)、parvalbumin (PV)、tyrosine hydroxylase (TH)、GABA、GAD65 & 67、TH-GFP マウスなど標識を用い多重蛍光標識を行った。確定的なマーカーのない投射ニューロンについては BDA 及び pal-GFP or pal-mRFP sindbis virus 脳定位 in vivo injection (前述) による標識を行い、上記抗体と併せて多重蛍光染色した。多重免疫標本をレーザー顕微鏡で連続光学断面解析と三次元再構築を行い、ACh ニューロンが接するニューロンについて voxel レベルの三次元定量解析による検証をおこなった。

(2) シナプスの解析 : 具体的には、電子顕微鏡ランダム/連続切片観察によりシナプスを同定した。各種抗体を用いた包埋前免疫染色 (DAB 発色) と抗 GABA 抗体を用いた包埋後免疫染色 (金粒子) の電子顕微鏡多重染色法を用いる。具体的方法は既報に準じる (Toida 1998, Suzuki 2015)。更に、各種ニ

ューロンの線維連絡について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 5-HT ニューロン (Suzuki et al 2015)

5-HT ニューロンは、当研究開始時にはシナプスの先行解析が進んでおり (鈴木ら ; 川崎医学会誌 40 (2) : 89-102, 2014 doi : 10.11482/KMJ-J40 (2) 89)、本研究では単一ニューロン標識による投射経路の全貌と、嗅球内の線維分布の定量、シナプス結合の同定を行い、論文発表を行った。単一ニューロントレースにて、起始核の縫線核 DRN: dorsal raphe nucleus から、red nucleus、hypothalamus、medial preoptic area、accumbens nucleus、そして anterior olfactory cortex を経て嗅球 OB: olfactory bulb に遠心性に投射した。嗅球内では糸球体層、内網状層、顆粒細胞層に線維分布密度が高く、ほぼ全ての介在ニューロンや投射ニューロンとシナプス結合をしていた。シナプスは非典型的な I 型・非対称性シナプスであった。

(2) Ach ニューロン (Hamamoto et al 2017)

Ach ニューロンは、本研究では ChAT-Cre マウスと AAV の組み合わせによる単一ニューロン標識による投射経路の全貌と、嗅球内の線維分布の定量、シナプス結合の同定を行い、論文発表を行った。単一ニューロントレースにて、起始核のプロローカの対角帯水平脚 HDB から olfactory tubercle、ventral tenia tecta を経て、嗅球 OB: olfactory bulb に遠心性に投射した。嗅球内では 5-HT より密ではないものの、糸球体層、内網状層に線維分布密度が高く、そこでほぼ全ての介在ニューロン (特に TH ニューロン) とシナプス結合をしていた。シナプスは非典型的な I 型・非対称性シナプスであった。

(3) ノルアドレナリンニューロン (Horie et al J. Comp. Neurol. 2018 投稿準備中)

NA ニューロンは、本研究の Ach ニューロンの解析が順調に進んだために、更に発展して行ったものであり、既に多くの研究データを得られて学会発表し (日本解剖学会 2018 年、日本顕微鏡学会 2018 年)、現在論文発表準備中である。現時点で報告出来る内容としては、以下の通りである。NA ニューロンでは DBH-Cre マウスと AAV の組み合わせによる単一ニューロン標識による投射経路の全貌と、嗅球内の線維分布の定量、シナプス結合の同定を行った。単一ニューロントレースにて、起始核の青斑核 LC から mesencephalic reticular formation、nigrostriatal tract、medial hypothalamus、medial forebrain bundle、rhinal fissure を経て、嗅球 OB: olfactory bulb に遠心性に投射した。嗅球内では 5-HT、Ach より密ではないものの、外網状層 (深層)、そして内網状層に著しく線維分布密度が高く、糸球体層では他の 2 種のニューロンと異なり、傍糸球体領域に線維が分布している。現在、シナプス結合について対象のニューロン種とシナ

プスタイプの同定を進めている。

(4) その他：

当研究の遂行中に、単一ニューロン及び同種ニューロンを特定標識した後に、レーザー顕微鏡、ニューロロシダで解析し、更に解析した標本そのものを電子顕微鏡で解析するという **Correlated Laser and Volume EM study** 法を確立した。その手法により嗅球からの投射ニューロン (mitral cells, tufted cells)、介在ニューロン (TH ニューロン) について、デジタル電子顕微鏡広範囲モニタージュ・連続切片三次元再構築を行い、シナプス結合の定量と空間分布を行った。

① 投射ニューロン (Matsuno et al 2017)

C57BL6J 系マウスに sindbis ウイルスを定位脳注入し、遺伝子導入により単一の投射ニューロン (mitral/tufted cells) を標識した。ニューロロシダでデジタルトレースした後、電顕標本として 600 枚超の連続切片、広範囲モニタージュ法によりトレースしたニューロンをほぼ全て電顕再構築を行った。その結果、mitral cells の二次樹状突起が外網状層深層に、tufted cells が外網状層浅層により分布すること、PV ニューロンとのシナプスは mitral cells の二次樹状突起の近位により多く分布していることがわかった。

② 介在ニューロン (Kiyokage et al 2017)

当研究において TH-GFP マウスを用いたが、このニューロンのシナプス結合の立体的定量解析を行った。電子顕微鏡モニタージュは一超薄切片あたり 25x25 のモニタージュを行い、600 枚超の連続切片から再構築を行った。その結果、TH ニューロンのシナプス分布には 2 種類あり、嗅覚系一次ニューロンである嗅受容細胞からの I 型シナプスを遠位に受けるものと、嗅受容細胞以外のニューロンから I 型シナプスを近位に受けるものの 2 種類が同定された。これらのシナプスの形態学的解析結果と以前の我々の電気生理学的解析結果の比較検討を行っている。

(5) 今後の解析：

① GABA ニューロンによる遠心性調節

Ach ニューロンの解析の過程で、起始核の HDB には嗅球へ並行投射する GABA (PV) ニューロンの存在が明らかとなった。PV ニューロンの存在位置と数は、StereoInvestigator で解析が進み、現在、HDB から嗅球への PV ニューロンの投射の全貌と、嗅球内での線維分布、シナプス結合について解析を進めている。

② ステロイドホルモンの神経回路調節

性行動と嗅覚は一般的にも生理的にも関連性の指摘があるが、詳細は明らかになっていないためエストロジオールを投与した影響について、TH ニューロンを始めとする嗅球ニューロンの化学的性質、形態的特徴、遺伝学的背景、シナプス結合の変化について、詳細な解析を進めている。そして TH ニューロンに対する影響について解析知見を学会に発表 (日本解剖学会 2018 年、日本顕微鏡

学会 2018 年)、論文にまとめている (Kiyokage et al J. Comp. Neurol.2018 投稿準備中)。

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 11 件)

① Afroz S, Yagi A, Fujikawa K, Rahman MM, Morito K, Fukuta T, Watanabe S, Kiyokage E, Toida K, Shimizu T, Ishida T, Kogure K, Tokumura A, Tanaka T. Lysophosphatidic acid in medicinal herbs enhances prostaglandin E2 and protects against indomethacin-induced gastric cell damage in vivo and in vitro. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2018 Mar;135:36-44. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2018.01.003. Epub 2018 Feb 17. (査読有)

② Tsuchiya S, Higashide T, Toida K, Sugiyama K. The Role of Beta-Adrenergic Receptors in the Regulation of Circadian Intraocular Pressure Rhythm in Mice. Curr Eye Res. 2017 Jul;42(7):1013-1017. doi: 10.1080/02713683.2016.1264605. Epub 2017 Jan 25. (査読有)

③ Kiyokage E, Kobayashi K, Toida K. Spatial distribution of synapse on tyrosine hydroxylase expressing juxtglomerular cells in the mouse olfactory glomerulus. J Comp Neurol. 2017 Apr 1:525(5):1059-1074. doi: 10.1002/cne.24147. Epub 2017 Jan 10. cover image (査読有)

④ Matsuno T, Kiyokage E, Toida K. Synaptic distribution of individually labeled mitral cells in the external plexiform layer of the mouse olfactory bulb. J Comp Neurol. 2017 May 1:525(7):1633-1648. doi: 10.1002/cne.24148. Epub 2017 Mar 3. Erratum in: J Comp Neurol. 2017 Aug 1:525(11):2611. (査読有)

⑤ 松野 岳志、清蔭 恵美、樋田 一徳 シナプスマーカー-VGLUT1, VGAT を用いた嗅球神経回路の新たな形態学的解析 川崎医学会誌 42 巻 2 号, 127-142, 2016. doi : 10.11482/KMJ-J42(2)127 (査読有)

⑥ Hamamoto M, Kiyokage E, Sohn J, Hioki H, Haratda T, Toida K. Structural basis for cholinergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. J Comp Neurol. 2016 Aug 4. doi:

10.1002/cne.24088. (査読有)

⑦ Nagasu H, Satoh M, Kiyokage E, Kidokoro K, Toida K, Channon KM, Kanwar YS, Sasaki T, Kashihara N. Activation of endothelial NAD(P)H oxidase accelerates early glomerular injury in diabetic mice.

Lab Invest. 2016 Jan;96(1): 25-36. doi: 10.1038/labinvest.2015.128. Epub 2015 Nov 9., cover image (査読有)

⑧ 野津 英司、樋田 一徳
ラット嗅球神経回路における非 GABA 系在ニューロンのシナプス結合の微細構造解析
川崎医学会誌 42 巻 1 号 : 103-119, 2015
doi:10.11482/KMJ-J41(2)103 (査読有)

⑨ 徳岡 晋太郎、清蔭 恵美、樋田 一徳
成体マウス脳における嗅覚系新生ニューロンの遊走に関する三次元構造解析
川崎医学会誌 41 巻 1 号 : 57-73, 2015
doi:10.11482/KMJ-J41(1)57 (査読有)

⑩ 石田 剛、小曾戸陽一、冨末拓治、中井祐一郎、中村隆文、樋田 一徳、下屋浩一郎
Cyclin dependent kinase inhibitor による神経前駆細胞の分化誘導と脳形成
川崎医学会誌 41 巻 1 号 : 83-96, 2015
doi : 10.11482/KMJ-J41(1)83 (査読有)

⑪ Suzuki Y, Kiyokage E, Sohn J, Hioki H, Toida K.
Structural basis for serotonergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb.
J Comp Neurol. 523:262-280 (2015), 2014 Sep 19. doi: 10.1002/cne.23680. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

① 清蔭 恵美、樋田 一徳
マウス嗅球でのエストロゲンによる TH 発現調整
日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会 (2018 年)

② 堀江 沙和、樋田 一徳
ノルアドレナリン作動性神経 : 単一神経細胞トレース、レーザー、電子顕微鏡による解析
日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会 (2018 年)

③ 清蔭 恵美、樋田 一徳
Differential effects by estrogen exposure on expression of catecholamine synthesizing enzymes in the mouse olfactory bulb.
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2018 年)

④ 清蔭 恵美、樋田 一徳
Structural basis of centrifugal projection to

the mouse olfactory bulb: noradrenergic neurons
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2018 年)

⑤ 濱本 真一、清蔭 恵美、樋田 一徳
Structural basis for cholinergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. Society for Neuroscience 2016 (2016 年, San Diego, USA)

⑥ 松野 岳志、樋田 一徳
Synaptic distribution of individually labeled mitral cells in the external plexiform layer of the mouse olfactory bulb. Society for Neuroscience 2016 (2016 年, San Diego, USA)

⑦ 松野 岳志、樋田 一徳
Synaptic distribution of individually labeled mitral cells in the external plexiform layer of the mouse olfactory bulb. 日本解剖学会第 71 回中国・四国支部学術集会 (2016 年)

⑧ 堀江 沙和、樋田 一徳
マウス嗅球におけるドーパミン代謝酵素の局在と合成細胞の形態学的解析
日本解剖学会第 71 回中国・四国支部学術集会 (2016 年)

⑨ 樋田 一徳
各種固定法について (招待・教育講演)
日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会 (2016 年)

⑩ 堀江 沙和、清蔭 恵美、樋田 一徳
Differential localization of catecholamine synthesizing enzymes and their related substances in the mouse olfactory bulb
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2016 年)

⑪ 中村 悠、清蔭 恵美、樋田 一徳
Efferent projection from subdivisions of the piriform cortex: A phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the mouse
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2016 年)

[図書] (計 3 件)

① 樋田 一徳 (監訳、訳)
ラング臨床神経解剖学 (樋田一徳監訳、訳 ; 樋田一徳、村上龍文、清蔭恵美、藤本久貴) (原書 ; Lange Clinical Neuroanatomy) 西村書店、(2018 出版予定)

② 樋田 一徳 (監訳、訳)
Lippincott ポケット組織学 (樋田一徳監訳、訳 ; 園田祐治、樋田一徳)

(原書 ; Lippincott's Pocket Histology)
西村書店、(2017)

③ 樋田 一徳 (監訳、訳)
バンスキー・ジェスト解剖学 基礎と臨床に
役立つⅢ
頭部・頸部・脳と脳神経 (樋田一徳監訳、訳 ;
樋田一徳、園田祐治、清蔭恵美)
(原書 ; Lippincott's CONCISE
ILLUSTRATED ANATOMY, Volume3) 西村
書店、(2016)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/anatomy/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋田 一徳 (Toida, Kazunori)
(川崎医科大学・医学部・教授)
研究者番号 : 04253405

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

清蔭 恵美
(川崎医療福祉大学教授)

堀江 沙和 (川崎医科大学助教)

松野 岳志 (川崎医科大学大学院生)

濱本 真一 (川崎医科大学大学院生)