

令和元年6月2日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0174

研究課題名(和文) 脳内の秩序的構成原理と並立して同じ組織空間を共有する無秩序構成原理の解明

研究課題名(英文) Exploration of the non-systematic organizing principle of the brain that coexists with and share the same tissue space with the systematic organizing principle

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(医)・教授

研究者番号：50253414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：海馬と新皮質の主なGABAニューロンであるパルブアルブミン(PV)陽性ニューロンが、錐体細胞とは異なり無秩序的な構成原理に基づく分布を示している可能性を免疫組織化学により追究した。マウス海馬CA1領域のPVニューロンは上昇層/白質の境界部で平面的に分布し、その分布様式の数学的解析はランダムパターンを示した。歯状回PVニューロンも顆粒細胞層とhilusの境界部の平面内でランダムに分布していた。PVニューロンの樹状突起はこれら2領域の平面内に大きく広がり、ギャップ結合により網状に連結していた。以上の構造は記憶形成回路におけるflexibleな制御に適している。新皮質でも部位特異的な分布を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの神経科学は、脳における情報処理過程の解明において、その緻密な秩序的構成に注目して解析が行われてきた。しかしながら、情報処理を担うニューロン群と並立する制御システムニューロン(GABA作動性インターニューロン)の解剖学的構造は、むしろ無秩序性に基づいた構成原理を示唆している。本研究は、このことをマウスの海馬において明らかにし、記憶形成回路に革新的見方をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Distribution pattern of parvalbumin (PV)-positive neurons that are major GABAergic interneurons in the hippocampus and neocortex was explored using immunohistochemical method and mathematical analysis. PV neurons in the CA1 region of the hippocampus were distributed in both the stratum pyramidale and a thin lamina at the border between the stratum oriens and alveus. Somata of the latter population showed a random pattern with their dendrites extending in the same lamina and forming gap junction-coupled plexus. PV neurons in the dentate gyrus were also distributed in a thin lamina between the granule cell layer and hilus, showed a random pattern, and formed gap junction-coupled dendritic nets in the lamina. These structures are thought to facilitate flexible regulation of neuronal activities involved in memory formation.

研究分野：神経解剖学

キーワード：GABA インターニューロン ギャップ結合 海馬 歯状回

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の組織構造や線維連絡には非常に秩序だった構成がある。それは脳の各領域の特徴を決める本質的要素として、脳内のいたるところで見ることができる。しかし過去15年間、私が追究してきた構造を顕微鏡下に見ていると、脳内にはもうひとつの構成原理があり、ランダム性をむしろ最大の特徴として脳の機能、特にその柔軟性を別の面から支えているものがあるにちがいないという思いに至った。それが、抑制性介在ニューロンのみが作る、gap junction を介して直結する樹状突起の網のような広がり、dendritic reticulum である。新皮質では興奮性主ニューロン(錐体細胞)が縦に配列しカラムを作っているが、私は大脳皮質の代表的抑制性介在ニューロンである parvalbumin (PV)陽性 GABA ニューロンの樹状突起が、カラムとは無関係に各方向に広がり、かつそれが gap junction を介して横方向に電氣的に直結する網を作っていることを見いだした(Fukuda et al., *J Neurosci* 26:3434-3443, 2006)。しかもこのニューロンの分布パターンは数学的にランダムであった。即ち情報処理の担い手である主ニューロンは秩序的構成をとるのに対して、制御系である抑制ニューロンはカラム横断的、連続的、かつランダムさを特徴としている。それは秩序に伴うステレオタイプや硬直性のアンチテーゼとして、脳の活動の柔軟性を支えている可能性がある。本研究では、このような秩序的構成と無秩序的構成の並立が脳の原理的構成である可能性を追究する。

2. 研究の目的

本研究では、秩序的構成と無秩序的構成が並立する構成要素として存在している可能性を、それまで研究を進めて来た視覚野 2/3 層以外の場所で幅広く検証することを目的とした。具体的な課題は以下の通りである。(1)記憶形成の初期過程を担う海馬において、PV ニューロンが数学的にランダムな分布パターンをとっているのか？(2) gap junction により広く連結する樹状突起網が確かにそこに存在するのか？横方向へいかなる網を作っているのか？(3) 視覚野で視床からの入力を最初に受ける 4 層ではギャップ結合ネットワークはどのような形態学的特徴を持つのか？(4) 一次体性感覚皮質パレル野 4 層におけるギャップ結合ネットワークの特徴は視覚野 4 層と同じか？以上の課題を形態学的に明らかにした。

3. 研究の方法

(1) マウス(C57BL/6J)を深麻酔下に心臓からアルデヒド混合液で灌流固定した。海馬の CA1 錐体細胞層は 3 次元的にはシート状に広がっている。それに平行な連続切片(接線方向切片)を振動刃マイクロトームで作成し、PV に対する免疫組織化学染色を行った。海馬の PV ニューロンは、よく知られた錐体細胞層に存在するもの(type1)に加えて、別の集団(type2)が、上昇層と白質(海馬白板)との間に存在していることを、以前に明らかにした(Fukuda and Kosaka, 2000)。両者とも、錐体細胞同様に二次元的な分布をしているため、その分布パターンの秩序性を数学的に解析した。

そのために、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)によりこの 2 つの集団の画像を取得し、画像解析ソフト NeuroLucida を用いて、細胞体が位置する空間座標を記録した。次にそれぞれの平面内に散在する細胞体の分布パターンを、記録した細胞体の位置座標をもとに Nearest neighbor distance 解析により判別した。ランダムパターンを帰無仮説として、99 回のモンテカルロテストを実施し、5%の有意水準で帰無仮説の棄却の有無を判定した。帰無仮説が棄却される場合は、分布パターンは clustered, もしくは regular のどちらかになるので、empirical distribution plot のグラフから見分けた。

さらに歯状回においても同様の検討を行った。さらに PV ニューロンがギャップ結合による広

く連結する樹状突起ネットワークを形成しているか否かを、NeuroLucida によるトレースにより検討した。標本は、PV と connexin 36 の二重蛍光免疫染色を行なったものを使用した。また樹状突起ネットワークへの入力を明らかにするために、各種の軸索終末マーカーを用いて多重免疫染色を行なった。

(2) 視覚野 4 層のギャップ結合ネットワークの 3 次元的形態を明らかにするために、ネコの初期視覚野 (area 18) を PV と connexin 36 に対する抗体で二重染色し、CLSM による画像取得後、NeuroLucida を用いて解析した。

(3) マウスの体性感覚パレル野 4 層において、PV, connexin 36, vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2; パレルの描出に利用) それぞれに対する抗体で三重蛍光免疫染色を行い、NeuroLucida を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 海馬 CA1 領域における PV 陽性 GABA ニューロンの細胞体の分布パターンを Nearest neighbor distance analysis によって調べた結果、錐体細胞層にある type 1 ニューロンでは clustered パターン、上昇層/海馬白板境界層に存在する type 2 ではランダムパターンであった。一方歯状回においては、PV ニューロンのほとんどが顆粒層基底部と hilus の境界面付近に分布していたが、この境界平面における二次元的分布パターンの解析はランダム配列を示した。

これらの結果の意義を考えるために、各ニューロンタイプの樹状突起の形態と、ギャップ結合による連結の形態学的特徴を検討した。ランダムパターンを示した CA1 type 2 ニューロンは、樹状突起を上昇層/海馬白板境界層内で横方向に広く伸ばし、ギャップ結合により他の PV ニューロンの樹状突起と連結して、密な樹状突起ネットワークを形成していた。これと同様の水平方向樹状突起ネットワークが、歯状回顆粒細胞/hilus 境界面にも存在し、ギャップ結合により密な連結を形成していた。さらにこれら 2 つの樹状突起ネットワークは、受け取る主な興奮性入力のある方においても共通性が認められた。すなわち、CA1 type 2 PV ニューロンは錐体細胞の軸索が通過する場所に樹状突起網を作り、顆粒細胞/hilus 境界面の PV ニューロンも顆粒細胞の軸索が通過する場所に同様の樹状突起網を形成し、どちらの樹状突起も、VGLUT1 陽性の軸索終末を密に受けていた。特に後者では mossy fiber terminal の独特な形態を示す終末が PV ニューロンの樹状突起をびっしりと取り囲んでいた。

これらの構造は、主ニューロンの軸索の反回側枝が、ギャップ結合で連結した PV ニューロンの樹状突起網に driving input を提供する回路構成を意味する。そしてこの樹状突起網により連結した細胞体が、ランダムな分布をしているというきわめて特徴的な構成が明らかとなった。歯状回と海馬 CA1 領域のどちらも、入力側の嗅内野や CA3 領域のニューロン活動を単純に再現しているわけではなく、それぞれの中で新たな時間的空間的パターンからなる活動電位の集合を生み出して次の領域にそれを送ると考えられる。この、それぞれの場で新たな神経活動が生み出される過程には、その出力で駆動される反回抑制制御機構が組み込まれていることになり、そこでは秩序にしばられない構成原理が新たな活動の発生に寄与していると考えられる。

一方 CA1 錐体細胞に存在する type 1 PV ニューロンの樹状突起は、方線層と上昇層において錐体細胞層に垂直な方向に伸びており、CA3 からの feedforward 入力に相当する VGLUT1 陽性の軸索終末を密に受けていた。またギャップ結合による連結の横方向への連結は、樹状突起の 3 次元形態から必然的に限定的なものであり、新皮質のカラムと同様の小集団内部での連結を示唆する構成であった。しかも細胞体が clustered パターンの分布をとっていたことから、CA3

領域から受ける feedforward 入力による制御過程に関わる CA1 type 1 PV ニューロンは、秩序的構成をとるといふ特徴が明らかとなった。

本研究を通じて、feedforward 制御を担う介在ニューロンは cluster を形成する秩序的構成をとり、一方 feedback 制御を担う介在ニューロンは無秩序的構成をとるといふ原理が見出された。これは海馬における記憶形成過程に、全く新しい洞察を加えるものである。以上の内容を日本解剖学会シンポジウムで発表し、現在は論文出版の準備をしている。

(2) 視覚野 4 層の PV ニューロンは、ギャップ結合による密な連結からなる樹状突起網を 3 次元的に形成していた。連結する相手の空間的位置は、水平方向よりも縦方向のものが有意に多く、カラム内での連結が優勢であることを示唆した。しかし横方向への連結に目を転じると、連結相手の細胞体と cluster を作っているわけではなく、近距離のものと遠距離のものどちらとも自由に連結している様子が認められた。feedforward 入力と考えられる VGlut2 陽性の視床軸索終末が、細胞体や近位樹状突起に密に存在しており、かつ終末のサイズは大型であり、4 層 PV ニューロンは強力な feedforward 制御回路に組み込まれていることが示唆された。一方樹状突起上には密な VGlut1 陽性終末が分布していたので、feedback 回路の構成要素でもあると考えられる。この二面性は、樹状突起網の 3 次元形態における縦方向の強い連結と横方向への幅広い連結にも現れていると考えられる。以上の内容を国際雑誌に発表した(Fukuda, 2017)。

(3) パレル野 4 層の PV ニューロンを、個々のパレルに対する細胞体の位置(パレルの中か外か)と樹状突起の広がり(パレル境界を貫くか否か)により 4 タイプに分類することができた。その中でパレル内に存在する細胞体から伸びる樹状突起がパレル内に限局するものを type 1 と名付けた。この type 1 ニューロンは、1 本の洞毛からの情報を受け取るきわめて限定的な入力構成をとっていると考えられ、実際細胞体や近位樹状突起上に VGlut2 陽性の視床軸索終末が密に存在していた。しかし驚くべきことに、type 1 どうしは決してギャップ結合を作らず、相手は必ず別のタイプであった。すなわちパレル野 4 層は、個々のパレルが 1 本の洞毛からの情報を個別に受け取る非常に秩序だった構成を示しているといふ一般的に考えられているが、秩序的構成にもっとも忠実であると想定される type 1 ニューロンが相互のギャップ結合連結を回避しているという構造が見出された。このことは、パレルが洞毛からの情報を単純に中継するのではなく、パレル野 4 層内部で、すでに新たな神経活動が生み出されることを意味している。以上の内容を国際雑誌に発表した(Shigematsu et al., 2019)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Fukuda T. Structural organization of the dendritic reticulum linked by gap junctions in layer 4 of the visual cortex. *Neuroscience* 340:76-90, 2017.

Shigematsu N, Nishi A, Fukuda T. Gap junctions interconnect different subtypes of parvalbumin-positive interneurons in barrels and septa with connectivity unique to each subtype. *Cerebral Cortex* 29:1414-1429, 2019.

[学会発表](計 7 件)

福田孝一 連続切片三次元再構築の威力 第 48 回日本臨床武士形態学会総会・学術集会 2016 年 9 月 24 日

福田孝一 脳内の秩序的構成原理と対立する無秩序構成原理の解明 第 49 回日本臨床武士形態学会総会・学術集会 2017 年 9 月 15 日 岐阜

福田孝一 中枢神経 GABA ニューロンがギャップジャンクションを介して作る樹状突起の網状構造 dendritic reticulum は脳の場所ごとに多彩な形を織りなす 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 9 日 神戸

重松直樹、福田孝一 マウス1次体性感覚野におけるパレル局在型パルブアルブミン陽性ニューロンに対する視床-皮質間入力の分布様式 第123回日本解剖学会全国学術集会 2018年3月28日 東京

Shigematsu N, Fukuda T. Gap junctions mediate the connectivity among different subtypes of parvalbumin-positive interneurons in layer 4 of the mouse barrel cortex. Neuroscience 2018. 2018年11月6日 San Diego

福田孝一 海馬と新皮質の制御系を構成する GABA ニューロンがギャップ結合を介して連結するネットワークを既知の神経回路にいかに関与しているか? 第124回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム 2019年3月28日 新潟

重松直樹、福田孝一 体性感覚野ミニパレル領域におけるパルブアルブミン陽性ニューロンの分布と3次元解析 第124回日本解剖学会全国学術集会 2019年3月28日 新潟

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 重松 直樹

ローマ字氏名: Naoki Shigematsu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。