

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K14953

研究課題名（和文）梨状皮質興奮性ニューロンの軸索分枝：ウイルスベクターを用いた単一細胞標識

研究課題名（英文）Axonal arborizations of excitatory neurons in the piriform cortex: neuron labelling using virus vector

研究代表者

中村 悠 (Nakamura, Hisashi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70535484

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：梨状皮質は嗅球をはじめとする嗅覚関連領域との間で、匂いに関連した情報のやり取りを双方向的に行っている事が知られている。梨状皮質における嗅球出力細胞の投射様式については近年明らかにされたが、嗅球以外の脳領域から梨状皮質への入力様式についてはまだ十分に解析されていないのが現状である。そこで、前梨状皮質内に逆行性トレーサーを注入する実験を行ったところ、少なくとも一部の梨状皮質領域へ情報を送る脳部位は、他の前梨状皮質領域へ投射する部位とは異なる可能性が示唆された。逆行性トレーサーは通過線維からも取り込まれる可能性があるため、本研究では順行性標識を行い、更なる検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚系の一次皮質である梨状皮質は、末梢との点对点対応構造を持たず、また、多くの脳領域と相互連絡する。これらの構造は他の一次感覚皮質では見られない、嗅覚系に特有の特徴であり、匂い情報処理メカニズムの解明を困難にしている。本研究では、少なくとも一部の梨状皮質領域は、他の前梨状皮質部位とは違う情報を受けていることが示唆された。本研究成果は、梨状皮質における情報処理機構の理解に繋がる知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Piriform cortex connects bidirectionally to the olfactory related regions such as the olfactory bulb. Although the axonal arborizations of the output neurons from the olfactory bulb in the piriform cortex have been shown recently, the projections from the other olfactory regions excluding the olfactory bulb to the piriform cortex are unclear. When we injected retrograde tracers into a part of the piriform cortex, a specific distribution of labeled cell bodies was observed. At present, we are further analyzing the axonal arborizations in the piriform cortex using anterograde tracers, because the retrograde tracers can be taken up by not only axon terminals but also fibers of passage.

研究分野：神経解剖学

キーワード：梨状皮質 シンドビスウイルス ウイルスベクター 逆行性トレーサー 嗅球 嗅覚 投射様式 軸索分岐

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、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

嗅覚情報は初めに嗅球で処理され、嗅球の出力細胞である僧帽細胞と房飾細胞によって梨状皮質を主とする一次嗅皮質へ伝達される。梨状皮質は多くの脳領域と相互作用することで、他感覚との統合、内分泌・自律神経・情動出力の調節、匂い関連記憶といった、様々な機能に関わると考えられている。脳内における嗅覚神経回路の研究は 1990 年代初めの嗅受容細胞の匂い分子受容体遺伝子がクローニングを皮切りに、目覚ましい発展を遂げた。特に嗅上皮から嗅球までの経路について解析が進み、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明らかにされた。一方で、嗅球から出力された後の情報処理機構についてはいまだに不明な点が多い。梨状皮質ニューロンの匂い応答や嗅球出力細胞の投射様式により、梨状皮質の個々のニューロンは複数の糸球体情報を受け取っていると考えられているが、個々のニューロンがどのように情報を伝達するかはわかっていない。

従来の神経トレーサーはある領域に存在する多数の神経細胞集団を非選択的に標識することで、特定の脳内神経回路網を可視化することが可能であるが、「領域から領域」という、大まかな神経回路網しか解析できなかった。近年、遺伝子工学が発達したことにより、神経細胞の特異的標識が可能になった。その技術の一つがウイルスベクターであり、中でも Sindbis ウイルスベクター（Furuta et al., 2001）は、蛍光タンパク質を強力に発現させることができ、感染した細胞のみをゴルジ染色様に細胞の隅々まで可視化できる。Sindbis ウイルスベクターを用いた他の神経回路の研究では、これまでの神経科学の常識を覆すような新たな形態学的知見が次々と報告されている（Matuda et al., 2009; Kuramoto et al., 2009）。我々もこのウイルスベクターを用いた単一ニューロン標識を行うことで、新たな投射様式を発見することに成功した（Nakamura et al., 2015）。

一方、梨状皮質からの投射様式に関しては、ラットで順行性トレーサーを用いた所見が報告されており、我々はマウスにおいても同様の所見が得られることを確認した。しかし、梨状皮質には樹状突起の形態が異なる投射ニューロンが複数存在することが知られており、こうした標識軸索線維がどの細胞に由来するかはわかっていない。一般的なトレーサーでは注入量を小さくすると標識強度が下がり、少数の細胞を隅々まで可視化するのが困難であったためである。そこで本研究では、Sindbis ウイルスベクターを用いて梨状皮質の単一ニューロンを標識し、その投射様式を比較するという着想に至った。

2．研究の目的

本研究の究極的な目的は、嗅覚情報処理に関わる脳内の神経回路網を明らかにすることである。梨状皮質は、嗅覚系の一次中枢である嗅球をはじめとする、多くの嗅覚関連領域と双方向的に結合することが知られている。情報処理の初期の段階から広い領域で情報をやり取りする形式は、他の感覚系では見られない、嗅覚系に特化した特徴である。我々は当初は梨状皮質の投射ニューロンを標識し、その軸索分岐を解析する予定であったが、梨状皮質のニューロンがどのような領域から情報を受け取るかという問題についても検討した。

3．研究の方法

本研究では、ウイルスベクターを用いて梨状皮質のニューロンを単一標識し、個々の投射ニューロンに由来する軸索線維の分布を解析していく。まず始めに、梨状皮質の単一ニューロンにウイルスを感染させ、適切に蛍光タンパク質を発現させるための条件を設定する必要がある。さらに、感染細胞を隅々まで可視化するための染色条件の確認を行う。実験条件が設定されたのち、脳内の単一ニューロンの樹状突起、軸索線維を完全に再構築する。投射先は対比染色により細胞構築を明確にしたうえで同定する。

● ウイルスベクターを用いた標識法の条件設定

脳の領域、神経細胞種により、ウイルスへの感染のしやすさは異なるため、ウイルスベクターの濃度や注入量を適切に設定する必要がある。実験手順は以下の通りである。

1. マウスを麻酔下で脳定位装置に固定し、Sindbis ウイルスベクターの希釈液を空気圧により梨状皮質へ注入する。
2. 灌流固定したマウスから脳を摘出し、凍結切片を作製する。
3. 蛍光顕微鏡下で感染細胞の樹状突起や細胞体を観察する。
4. 免疫組織化学染色法により、投射ニューロンの軸索線維を可視化する。

ウイルスベクターを注入する際には、毎回の注入量を極力一定にするため、圧注入法を用いる。まず、実験手順 1-3 により、ウイルス濃度・注入量を調節し、当該領域で数個だけ感染するような注入条件を設定する。次に、実験手順 3, 4 の結果を観察し、軸索線維の隅々まで可視化されるような染色条件を設定する。すなわち、抗体濃度、染色時間、シグナル増感法について検討を

行う。

- 梨状皮質ニューロンの単一標識

定まった条件を用い、梨状皮質ニューロンの少数標識および、完全再構築を行う。手順は以下のとおりである。

1. ウイルスベクターの注入（前述。）
2. 灌流固定、凍結切片の作製（前述。）
3. 蛍光顕微鏡下で感染細胞の数を確認後、注入部位周辺を蛍光ニッスル様染色し、細胞体の局在を確認する。
4. 免疫組織化学染色法（前述。）
5. 神経線維トレースと再構築

再構築が終了した標本は、一度カバーガラスを外し、対比染色により細胞構築を可視化してから再び封入する。個々のニューロンにおける軸索長の全長や投射先、特に、大脳皮質内投射（梨状皮質内外、嗅覚皮質内外、層構造との関係）、嗅球へのフィードバック、皮質下への投射に着目し、解析・比較を行う。細胞種毎に投射様式の特徴を明らかにする。

- 逆行性トレーサーの注入

本研究で用いる逆行性トレーサー（Fluorogold、FG）は、電気注入法が適用可能であるため、圧注入法に比べて試薬をより微量に、より限局した部位へ注入することが可能である。FG を注入してから3日後に灌流固定して脳を摘出し、脳を50 μm の厚さに薄切する。FG はそれ自身が蛍光シグナルを呈するため、簡便に注入部位を確認することができる。一方、FG 抗体を用いた免疫ペルオキシダーゼ染色を行うことで、より高感度に標識細胞を検出することも可能である。本研究では、解析対象が脳領域の広範囲にわたるため、明視野顕微鏡下で効率的に観察・解析を行う。逆行性トレーサーは神経終末から取り込まれるだけでなく、終末を形成せずに通過する軸索線維から取り込まれてしまう可能性もある。そこで、逆行性標識された領域のニューロンについては順行性標識による解析を行い、所見を確実にする。

4. 研究成果

本研究はまだ遂行中であり、未発表データを含むため、公表に差し支えない部分にのみ記載する。

嗅球から前梨状皮質の投射には明確なトポグラフィーがなく、一つの糸球体からの情報が広範囲に拡散して伝達されるため、前梨状皮質での情報処理は全体で均一に進められていくと考えられる。ところが、本研究で逆行性トレーサーを前梨状皮質内の様々な部位へ注入し、標識された細胞体の分布を確認した結果、少なくとも前梨状皮質の一部の領域に関しては、その周囲の領域とは情報の入力元が異なっている事が示唆された。逆行性トレーサーは神経終末から取り込まれるだけでなく、終末を形成せずに通過する軸索線維から取り込まれてしまう可能性があるため、順行性トレーサーで軸索線維を標識し、梨状皮質への投射についても解析を試みた。市販されている順行性トレーサー（レクチンや多糖類を用いたもの）を用いると、注入部位周辺のニューロンが多数標識されてしまう。本研究で逆行性標識が見られた部位には、注入時のトレーサー拡散域よりも狭い脳領域が含まれており、こうした従来の順行性トレーサーでは確実な所見が得られなかった。また、注入量が一定ではないため、定量性のある所見が得られないという欠点もあった。そこで本研究では、Sindbis ウイルスベクターを微量注入し、少数のニューロンのみが順行性標識された標本の作製を試みた。

Sindbis ウイルスは細胞毒性を有するため、蛍光タンパク質を発現させる時間には限りがある。そのため、長期の実験や生理学的な研究には向かないが、従来の順行性標識ツールに比べて短時間で標識が可能である。また、Sindbis ウイルスは中枢神経系においてはニューロンとグリア細胞の両方に感染するが、グリア細胞の方がニューロンより早く死滅するため、生存時間を適切にすることでグリア細胞像を減少させることができる。これまで Sindbis ウイルスを用いた報告は多くがラットを用いたものであり、注入してから脳を摘出するまでの時間は36～55時間程度であった。マウスにおいては、少なくとも本研究の対象部位では同じ条件でニューロン標識が可能であり、グリア細胞像も問題にならないことを確認した。しかし、軸索末端の標識強度については、ラットを用いた場合に比べ、明らかな減弱が見られた。そこで、マウスにウイルスを注入した後ニューロンの細胞形態を経時的に観察すると、注入後96時間程度までは光学顕微鏡レベルの構造に問題が見られないことが分かった。

小さい領域へ正確に注入する成功率の低さや、動物種差・実施環境の変化等による実験条件の差異等により、標本の作製過程において計画の遅延が生じているが、現在、目的の部位で少数のニューロンが標識された標本が複数得られており、軸索投射の解析を進めている。

これまでの結果により、少なくとも前梨状皮質は均一な領域ではないことが示唆されている。当初実施する予定だった、梨状皮質ニューロンの軸索投射の解析については、梨状皮質のどの領域を対象にするか、検討をしたうえで進めていく必要がある。また、今後はSindbis ウイルスに加え、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた、新しい神経標識ツールの開発を進め、電子顕微鏡

を用いた超微細構造解析にも着手し、それぞれの投射線維がシナプスする相手の細胞も明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hioki Hiroyuki, Sohn Jaerin, Nakamura Hisashi, Okamoto Shinichiro, Hwang Jungwon, Ishida Yoko, Takahashi Megumu, Kameda Hiroshi	4. 巻 1695
2. 論文標題 Preferential inputs from cholecystokinin-positive neurons to the somatic compartment of parvalbumin-expressing neurons in the mouse primary somatosensory cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 18 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.05.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 悠
2. 発表標題 扁桃体から前梨状皮質への軸索投射様式：ウィルスベクターと逆行性トレーサーを用いた形態学的解析
3. 学会等名 第10回 川崎医科大学 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 悠
2. 発表標題 嗅覚系梨状皮質における遠心性調節の構造基盤
3. 学会等名 第9回 川崎医科大学 学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 悠
2. 発表標題 マウス梨状皮質からの遠心性投射様式：PHA-Lを用いた研究
3. 学会等名 第8回 川崎医科大学 学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------