

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02529

研究課題名(和文) Gap junctionが形成する樹状突起の網を脳の神経回路に正しく組み込む

研究課題名(英文) Incorporation of gap junction-coupled dendritic nets into brain 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(医)・教授

研究者番号：50253414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：GABAニューロンは脳の各部位の局所回路で制御システムを担っていますが、その代表であるパルブアルブミン陽性ニューロンは、樹状突起間に豊富にGap junctionを形成し、電気シナプスによる樹状突起の網状構造を作っています。しかしこの顕著な構造は、各部位の神経回路にはまだ組み込まれていません。本研究では、記憶に重要な海馬と大脳皮質の体性感覚野における樹状突起のネットワークを目に見える形でとらえ、それぞれの場所における既存の神経回路に正しく組み込むことを目的としました。それぞれの場所への情報入力と出力を制御するのに適した形で、樹状突起ネットは既存の回路に組み込まれていることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶や大脳皮質の高次機能が実現するメカニズムについて、膨大な研究がなされてきたが、そこにはまだ欠落している要素がある。Gap junctionを介して大規模に結合している抑制性神経細胞のネットワークがそれである。既知の神経回路の中に如何にこれを組み込むかということを目指し研究を遂行した。得られた成果は、驚くべきネットワークの存在を可視化し、脳の機能原理の本質に新知見を提供した。記憶・認知・行動などをはじめとする神経科学各分野に新しい基盤を提供できる。さらに対象としたパルブアルブミンニューロンは、統合失調症をはじめとする精神疾患との関連が示唆されており、それらの病態解明と治療戦略への展望を与える。

研究成果の概要(英文)：GABAergic interneurons regulate activities in local circuits.

Parvalbumin-positive neurons are the representative of such neurons, and they are interconnected through dendritic gap junctions that work as electrical synapses. However, this gap junction-coupled network has not yet been incorporated in known neural circuitry mediated by conventional chemical synapses. We explored structural organization of dendritic gap junction network through studies in both hippocampus and somatosensory cortex (barrel field). In both regions, dendrites formed dense network links by gap junctions in such a way that input and output signals can be shared and synchronized through gap junctions in the conventional network mediated by chemical synapses.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ギャップ結合 海馬 歯状回 パルブアルブミン バレル GABA インターニューロン 樹状突起

1. 研究開始当初の背景

GABA ニューロンは脳の各部位の局所回路で制御システムを担うが、その代表であるパルプアルブミン陽性ニューロンは、樹状突起間に豊富に Gap junction を形成し、樹状突起の網状構造を作っている。しかしこの顕著な構造は、各部位の神経回路にはまだ組み込まれていない。Gap junction は直接電流を通す電気シナプスであり、神経回路図に、これまで欠落していた Gap junction ネットワークを補うことは重要である。この 20 年来、Gap junction が神経細胞間に存在していることは、多くの研究者により指摘されてきたが、Gap junction が作るネットワークの姿を目に見える形で示し、その大きな構造の三次元的特徴や、計算論的神経科学に応用できる形態学的測定値を発表してきたのは、私をおいて他にはいない。これまで私が海馬、新皮質、線条体で推進してきた Gap junction ネットワークの詳細な形態学的解析の経験をもとに、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、海馬および新皮質バレル野の各領域において、Gap junction ネットワークの realistic な姿を再現し、それを各領域の神経回路に正しく組み込むことを目指す。海馬は入力と出力の両面で、整然とした層構造を有しており、Gap junction ネットワークを形成するパルプアルブミン陽性ニューロンにおける、入力および出力構造の詳細な解析に適している。またバレル野 4 層には、齧歯類の洞毛一本ずつに由来する体性感覚入力を受ける単位構造(バレル)があり、バレル内部での Gap junction ネットワークの解析は、カラム構成を基本とする大脳皮質の作動原理の解明に重要な知見を提供する。得られる成果は、記憶・認知・行動などの高次機能を始めとする神経科学各分野の研究に新しい基盤を提供できる。

3. 研究の方法

Gap junction の形態学的同定は、神経細胞に特異的な Gap junction を構成する蛋白であるコネキシン 36 の免疫組織化学を用いる。パルプアルブミンとコネキシン 36 を含む多重免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得する。画像解析ソフト NeuroLucida により、パルプアルブミンニューロンの樹状突起に沿った Gap junction の位置や Gap junction ネットワークの三次元的定量解析を実施する。さらにパルプアルブミンニューロンへの入力構成を明らかにする。そのために、多彩な軸索終末のマーカータンパクに対する免疫組織化学を用い、Gap junction ネットワークに対する化学シナプスの結合様式を検討する。さらに電子顕微鏡観察により Gap junction と化学シナプス結合を直接同定し、微細構造の詳細を追究する。以上にに基づき、海馬と新皮質の各領域・各層で、神経回路に Gap junction ネットワークを組み込む。

4. 研究成果

(1) 海馬における検討

歯状回は海馬体の入力部位に相当するが、緻密な層状構造を持ち、各層へ入力する軸索の由来が明確に区別される。したがって Gap junction ネットワークを神経回路に組み込む本研究には好適な場所であり、以下の一連の研究成果を得た。

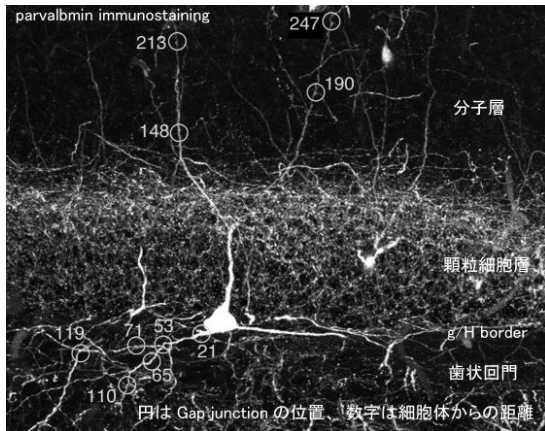
パルプアルブミンニューロンの三次元的形態

歯状回を冠状断方向や水平断方向にスライスして切片を作成すると、顆粒細胞層が V 字型を呈し、二股に分かれた顆粒細胞層の間にはさまれて歯状回門(hilus)が存在する。パルプアルブミンニューロンの細胞体は、その多くが顆粒細胞層と歯状回門の境界部分(g/H border)に存在していた。細胞体から伸びる樹状突起には apical-basal の極性が認められ、顆粒細胞側(apical側)に伸びる 1 本の樹状突起は顆粒細胞層を垂直に貫いたのち、分子層で初めて数本に枝分かれして側方に広がっていた。分子層における樹状突起は、他のパルプアルブミンニューロンから伸びる樹状突起とのコンタクトが観察された。一方細胞体から basal 側には数本の樹状突起が伸びていたが、その空間的分布は極めて特徴的であった。すなわち、g/H border 面に平行に広がり、他のパルプアルブミンニューロンに由来する樹状突起と重なりつつ、多くの場所でコンタクトし、Gap junction の存在を示唆した。そこで水平方向の連続切片画像から三次元再構成を行うと、g/H border 面を広い平面として捉えることができたが、パルプアルブミンの細胞体はその平面内に散在し、各細胞体から basal 側に伸びる樹状突起は、g/H border 面に広がる大きな網の目を作っているという驚くべき姿が立ち現れた。重要なことは、この網の目の結節点に Gap junction が存在して、電氣的に直結したネットと言えるかどうかである。果たして、コネキシン 36 の免疫組織化学により、確かにそこに Gap junction があることを見出した。一方分子層において側方に伸びる樹状突起の枝でも Gap junction による連結を確認することができた。

Gap junction の空間的分布

Gap junction の機能的意義を考える上で、細胞体から樹状突起に沿った距離が重要である。パルプアルブミンニューロンの樹状突起は、電気生理学的には passive cable として考えられて

おり、Gap junction を介して伝わる電流の影響は、樹状突起に沿って減衰するからである。そこで NeuroLucida による三次元トレースをもとに定量解析を行なった結果、上記の g/H border 面における樹状突起ネットワークにおいて、Gap junction の多くは、細胞体から 100 μm 以内



の近距離にあることを見出した。したがって、そこではパルプアルブミンニューロンの活動電位が spikelet として相互に伝達する可能性が高く、またシナプス後電位も大きさが比較的保たれたまま伝達して活動電位発生の制御に関わる可能性が示唆された。一方、分子層における apical 側の樹状突起間の Gap junction は、細胞体から 100 μm 以上の遠い位置にあり、活動電位への関連は少ないと想定されるが、入力レベルにおける相互作用が示唆される構造である。すなわち、嗅内野から到来する海馬体への driving input は嗅内野に入るが、そこでは顆粒細胞の樹状突起だけでなく、パルプアルブミンニューロンの樹

状突起にも興奮性シグナルを伝えることを示す形態学的所見を得たので(後述)、樹状突起遠位部における Gap junction は入力信号の同期性を生み出すと考えられる。

分子層における層構造を厳密に区分する方法の開発

これまで歯状回分子層は大雑把に 1/3 ずつ外側、中間、内側の sublayer に分けられていた。この順に外側嗅内野、内側嗅内野、歯状回 mossy cell からそれぞれ入力を受けることが知られている。それらを買いて伸びるパルプアルブミンニューロンの樹状突起における、Gap junction の分布や各種シナプス入力の分布を知るために、それぞれの sublayer を厳密に区分する方法を追究した。その結果、Vesicular glutamate transporter type 2 (VGluT2)の免疫染色の強度の違いにより、3層を客観的に区分できることを見出した。またそれは GAD, calretinin, Zinc transporter 3 などによる区分にもよく一致していた。この区分を利用する定量解析を実施した。

歯状回 g/H border における電子顕微鏡研究

上記のように、歯状回 g/H border に面として広がるパルプアルブミンニューロンの樹状突起ネットワークへのシナプス入力の解明と、Gap junction の同定を、電子顕微鏡により行なった。パルプアルブミンニューロンの樹状突起ネットワークには、顆粒細胞由来の大型 mossy fiber terminal が多数のシナプス結合を形成していることを確かめた。また樹状突起間に、確実な Gap junction の微細構造を電子顕微鏡でとらえることができた。すなわち、歯状回における feedback 回路に Gap junction ネットワークが組み込まれていることを、形態学的に実証した。三次元的な位置関係から考察すると、顆粒細胞の軸索は、g/H border 面に広がる樹状突起ネットを通過して標的の CA3 領域に向かうことになる。その過程で、興奮性入力をパルプアルブミンニューロンに与え、それを受けて feedback 回路としてパルプアルブミンニューロンの GABA 終末が顆粒細胞の細胞体にシナプスを作るが、その過程で Gap junction ネットワークによる電氣的活動の共有化・同期化がもたらされると考えられる。一方、分子層における樹状突起間の Gap junction は、入力レベルにおける信号の共有と同期化が期待され、これは feedforward 回路に Gap junction ネットワークが組み込まれていることを意味する。以上のような豊富な所見を得て、研究目的はほぼ達成された。

(2) 大脳皮質バレル野における研究

体性感覚皮質バレル野の4層には、動物の顔面にある高感度センサーのヒゲ(洞毛)からの情報を個別に受けるバレル構造がある。バレル内部での情報処理機構に、主要なインターニューロンであるパルプアルブミンニューロンがどのように関わるかということは、大脳皮質の作動原理を解明する上で重要な研究テーマである。さらに Gap junction の関与を追究することはこれまで全く行われていなかったが、詳細な研究結果を Cerebral Cortex 誌に発表した(Shigematsu et al., 2019)。本研究ではそれを発展させ、バレル野に隣接するミニバレル領域での検討を行った。ミニバレルはマウスの口唇の周囲に密生するミニチュア洞毛に対応する構造である。形態学的解析から、ミニバレル内部におけるパルプアルブミンニューロンの密度は通常のパレル(マクロバレル)よりも優位に高いことを明らかにした。また以前の研究で通常のパレル野の4層においてパルプアルブミンニューロンを4タイプに分類したが、もっとも多いタイプ1(細胞体がバレル内にあり、樹状突起が一つのバレル内に収まるもの)がミニバレルでは極めて少なく、細胞体がバレル内にあるが樹状突起がバレルの外に伸びるタイプ2が多いことを見出した。樹状突起へのシナプス入力密度は、マクロバレルとミニバレルで大きな違いはなかった。しかしながら、タイプ2ニューロンにおける Gap junction の密度は、マクロバレルに対してミニバレルで優位に小さいことが明らかとなった。これらの結果は、マクロバレルとミニバレルの機能的な違いに対応する形態学的特性として捉えることができる。

以上(1)(2)どちらの研究においても綿密な解析を要するが、すべての形態学的データの取得と解析を終えて、投稿準備がほぼ終了した段階にある。なお、私は熊本大学医学部の解

剖学教育（マクロと神経解剖学）を責任者として担っているが、本研究期間の大半を、新型コロナウイルスによる医学科教育の対応に忙殺され、特にコロナ禍における安全な肉眼解剖学実習に大きなエフォートを捧げた。そのような状況下においても、上記のように多数の研究成果を得ることができたことを申し添えたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Esumi Shigeyuki, Nasu Makoto, Kawauchi Takeshi, Miike Koichiro, Morooka Kento, Yanagawa Yuchio, Seki Tatsunori, Sakimura Kenji, Fukuda Takaichi, Tamamaki Nobuaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization and Stage-Dependent Lineage Analysis of Intermediate Progenitors of Cortical GABAergic Interneurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 Article
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.607908	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 -
1. 著者名 Sugiyama Keita, Kuroiwa Mahomi, Shuto Takahide, Ohnishi Yoshinori N., Kawahara Yukie, Miyamoto Yuta, Fukuda Takaichi, Nishi Akinori	4. 巻 41
2. 論文標題 Subregion-Specific Regulation of Dopamine D1 Receptor Signaling in the Striatum: Implication for L-DOPA-Induced Dyskinesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6388 ~ 6414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0373-21.2021	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 -
1. 著者名 Miyamoto Yuta, Nagayoshi Issei, Nishi Akinori, Fukuda Takaichi	4. 巻 224
2. 論文標題 Three divisions of the mouse caudal striatum differ in the proportions of dopamine D1 and D2 receptor-expressing cells, distribution of dopaminergic axons, and composition of cholinergic and GABAergic interneurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Structure and Function	6. 最初と最後の頁 2703 ~ 2716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00429-019-01928-3	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 -
1. 著者名 Miyamoto Yuta, Katayama Sachiko, Shigematsu Naoki, Nishi Akinori, Fukuda Takaichi	4. 巻 223
2. 論文標題 Striosome-based map of the mouse striatum that is conformable to both cortical afferent topography and uneven distributions of dopamine D1 and D2 receptor-expressing cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Structure and Function	6. 最初と最後の頁 4275 ~ 4291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00429-018-1749-3	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 -

1. 著者名 Odaka Haruki, Numakawa Tadahiro, Soga Minami, Kido Jun, Matsumoto Shiro, Kajihara Ryutaro, Okumiya Toshika, Tani Naoki, Tanoue Yuki, Fukuda Takaichi, Furuya Hirokazu, Inoue Takafumi, Era Takumi	4. 巻 152
2. 論文標題 An iPSC-based neural model of sialidosis uncovers glycolytic impairment-causing presynaptic dysfunction and deregulation of Ca ²⁺ dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105279 ~ 105279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105279	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 -

1. 著者名 福田孝一	4. 巻 97
2. 論文標題 神経解剖学領域で培われてきたCEM技法の紹介	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 解剖学雑誌	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Esumi S, Nasu M, Kawauchi T, Miike K, Morooka K, Yanagawa Y, Seki T, Sakimura K, Fukuda T, Tamamaki N	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization an stage-dependent lineage analysis of intermediate progenitors of cortical GABAergic interneurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers ni Neurosciences	6. 最初と最後の頁 A607908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.607908	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 -

1. 著者名 Miyamoto Yuta, Fukuda Takaichi	4. 巻 226
2. 論文標題 The habenula-targeting neurons in the mouse entopeduncular nucleus contain not only somatostatin-positive neurons but also nitric oxide synthase-positive neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Structure and Function	6. 最初と最後の頁 1497-1510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00429-021-02264-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihisa Ishihara, Takaichi Fukuda	4. 巻 150
2. 論文標題 Internal structure of the rat subiculum characterized by diverse immunoreactivities and septotemporal differences	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 17-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 重松直樹、福田孝一
2. 発表標題 体性感覚皮質ミニバレル領域におけるパルプアルブミン陽性ニューロンへの視床-皮質間入力分布と、同ニューロン間のギャップ結合の定量解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田孝一
2. 発表標題 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？
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松直樹、福田孝一
2. 発表標題 体性感覚野ミニバレル領域におけるパルプアルブミン陽性ニューロンの分布と形態の3次元解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田孝一
2. 発表標題 形と機能の本質に迫るためのさまざまな顕微鏡解析技法
3. 学会等名 第60回日本顕微鏡学会九州支部集会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Shigematsu, Takaichi Fukuda
2. 発表標題 Gap junctions mediate the connectivity among different subtypes of parvalbumin-positive interneurons in layer 4 of the mouse barrel cortex.
3. 学会等名 Neuroscience 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山佐知子、宮本雄太、福田孝一
2. 発表標題 マウス線条体内の新しい領域区分におけるparvalbumin陽性GABAニューロンの分布様式
3. 学会等名 日本解剖学会第74回九州支部学術集会
4. 発表年 2018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			
ロシア連邦	Southern Federal University			