

令和 3 年 4 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06487

研究課題名(和文) Barrel領野内局在型パルブアルブミン陽性ニューロンと視床 - 皮質間入力の関係

研究課題名(英文) Distribution pattern of thalamo-cortical inputs to the enclosed type parvalbumin expressing interneurons in the mouse primary somatosensory cortex

研究代表者

重松 直樹 (Shigematsu, Naoki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：30469613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス1次体性感覚野の4層におけるパルブアルブミン陽性GABA作動性ニューロン(以下PVニューロン)に対する視床 - 皮質間入力の分布パターンを形態学的手法を用いて解析した。これまでの研究から、この領域のPVニューロンには4種類のサブタイプが存在することを明らかにしたが、視床 - 皮質間入力はサブタイプに対する選択性は存在しないことが分かった。以前の研究でのPVニューロンのサブタイプ間で構築されるギャップ結合を考慮すると、視床からの感覚情報は皮質にはランダムに到達し、ギャップ結合を介したPVニューロンで情報の選択がなされている可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質は哺乳動物の脳内において最大の領域を占め、ヒトでは知覚・記憶・運動・思考などの高次脳機能を司る機関である。本研究では感覚入力の処理を行う体性感覚野に注目した。大脳皮質への主要な入力を行う視床の神経線維を可視化し、体性感覚野に存在する特定のGABAニューロンへの分布パターンを観察した。観察の結果、視床からの入力にGABAニューロンへの細胞選択性は存在しなかった。これまでに行ってきた研究の成果を合わせて考察すると、大脳皮質の特定のGABAニューロンが視床から無作為に入ってくる情報を取捨選択している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we tried to figure out the distribution pattern of the thalamo-cortical input against the parvalbumin GABAergic interneurons (PV neuron) in layer 4 of the mouse primary somatosensory cortex by using morphological strategies including CLSM microscopy and immunoelectron microscopy. From our previous study, PV neuron possess four subtypes depending on the location of soma and on the field of the dendritic arborization. Data from our present observation showed the distribution patterns of axon terminals from thalamus had no subclass selectivity. Take into consider out previous study that represent the subclass specific connection patterns via gap junctions of PV neurons in this region, our results from the present study suggest the possibility of the sensory information from thalamus which projects randomly against the sensory cortex. And the information may acquire the information segregation through gap junctions formed by the PV neurons in the area.

研究分野：神経科学

キーワード：ギャップ結合 コネキシン36 パルブアルブミン GABAニューロン パレル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

げっ歯類の1次体性感覚野4層に存在するBarrelは、ヒゲ(洞毛)からの情報を処理する。すなわち、洞毛入力 三叉神経 脳幹 視床 Barrelの順で情報伝達が行われ、それぞれの洞毛1本に由来する感覚入力が個別のBarrelに投射される。Barrelは視床からの興奮性入力の標的となっている。この投射経路はLemniscal pathwayと呼ばれている。このBarrelとその周囲を構成するSeptaと呼ばれる構造は大脳皮質のカラム構造の典型である。これまでの体性感覚に関する研究は興奮性の神経細胞の伝達に集中しており、PVニューロンを含む抑制性のGABAニューロンを加えた考察は現在でも少ない状況にある。

2. 研究の目的

マウス1次体性感覚野4層におけるBarrel/Septaに分布するPVニューロンには細胞の局在や樹状突起の形態から、4種類に分類することができた。

Type.1: 樹状突起がBarrel内に留めている細胞

Type.2: 細胞体がBarrelの中にあり、樹状突起をBarrel/Septaに伸ばしている細胞

Type.3: 細胞体がBarrelの外にあり、樹状突起をBarrel/Septaに伸ばしている細胞

Type.4: 樹状突起をSeptaにのみ伸ばしている細胞

分類したこれらのタイプのPVニューロンが受ける視床からの興奮性入力を免疫組織学的方法で検討した。Type1に分類されるPVニューロンが、他のタイプとは異なり、視床からの入力を細胞体で受けていた。神経細胞間のギャップ結合のマーカースタンパク質である、コネキシン36に対する抗体を用いた検討を行った。Type1のPVニューロンは同じタイプ同士の間でギャップ結合を作らなかった。Type1のPVニューロンはType3もしくはType4のPVニューロンとだけ、ギャップ結合を作っていた。

以上の結果から、本研究はBarrelの中に細胞体と樹状突起を留める、Type1 PVニューロンに注目して、視床からの興奮性入力の分布パターンを詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

Type1 PVニューロンが、視床からの興奮性入力をどのような様式で受けているのかについて、7~8週齢の雄マウス(C57 Black/6J)を用いた以下の方法により解析を行った。

視床への順行性トレーサの注入

視床の後内側腹側核(Ventral posteromedial thalamic nucleus: 以下VPM核)に順行性のトレーサである、Biotinylated dextran amines (以下BDA)を微量注入し、1次体性感覚野のBarrelに分布する視床からの興奮性入力を標識した。

電子顕微鏡を用いた、視床からの興奮性入力とPVニューロンとの間のシナプス結合の観察
標識したBarrel内のPVニューロンを蛍光免疫染色で可視化して、細胞体や樹状突起上に付着する興奮性入力を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ここで観察する興奮性入力とPVニューロンとの間の付着した場所で、シナプス結合が形成されているのかを以下の方法で確認した。

まず、共焦点レーザー顕微鏡で観察した切片そのものを用いて、PVニューロンをジアミノベンチジン(以下DAB)染色で興奮性入力をDAB-Ni染色で、再度電子顕微鏡観察用に発色を行う。共焦点レーザー顕微鏡で観察した、興奮性入力の付着部位を電子顕微鏡下で直にシナプス結合の有無を確認した。

画像解析ソフトを用いた、視床からの興奮性入力の軸索とPVニューロンの3次元再構築
Type1 PVニューロンと標識した視床 皮質間入力の画像を共焦点レーザー顕微鏡で取得する。この画像をもとに、解析ソフトNeuroLucida(本基金で購入)を用いてPVニューロンと分布する視床 - 皮質間入力を3次的に再構築した。

4. 研究成果

と について

マウスを吸入麻酔条件下でstereotaxicに固定し、脳内へのBDAの微量注入を頭蓋骨のBregmaから1.2 mm後方、正中から1.8 mm外側の位置に、脳の表層から3.2 mmの深さの部位にガラス電極から注入した(図1A)。微量注入手術を行ったマウスを約1週間の回復期を経て、深麻酔条件下で高グルタルアルデヒド含有固定液(2.5 % Glutaraldehyde, 2.0 % Paraformaldehyde in 0.1 M Phosphate buffer)を経心臓的に注入して、灌流固定を行った。脳を摘出した後、冠状断片の連続切片を作成した。スクロース含有リン酸緩衝液で処理した後、脳組織標本に対して急速凍結融解反応を施した。その後、切片に抗PV抗体を用いた蛍光免疫染色法と蛍光標識されたstreptavidinを組み合わせて、PVニューロンと視床 - 皮質間入力を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて大脳皮質1次体性感覚野の画像取得を行い、PVニューロンの細胞体や樹状突起上に分布する視床 皮質間入力の画像を取得した(図1B)。

画像取得に使用した切片をプレパラートから外し、BDAをDAB-Ni染色で、PVをDAB染色で標識した。4酸化オスミウム溶液処理、酢酸ウラン溶液処理を経た切片を脱水の後、アラルダイト包

埋を行い、超薄切片を作成した。超薄切片を酢酸ウラン溶液とクエン酸鉛溶液を用いた電子染色を施した後、透過型電子顕微鏡を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。共焦点レーザー顕微鏡で観察された PV ニューロンの細胞体(図 1 C)や樹状突起(図 1 D)に付着する視床 皮質間入力について、シナプス結合の有無を観察した。細胞体に付着していた視床 皮質間入力のブトンは 83%の確率で(6個中5個)、樹状突起上に付着するブトンは75%(8個中6個)が標的にシナプスを形成していた。

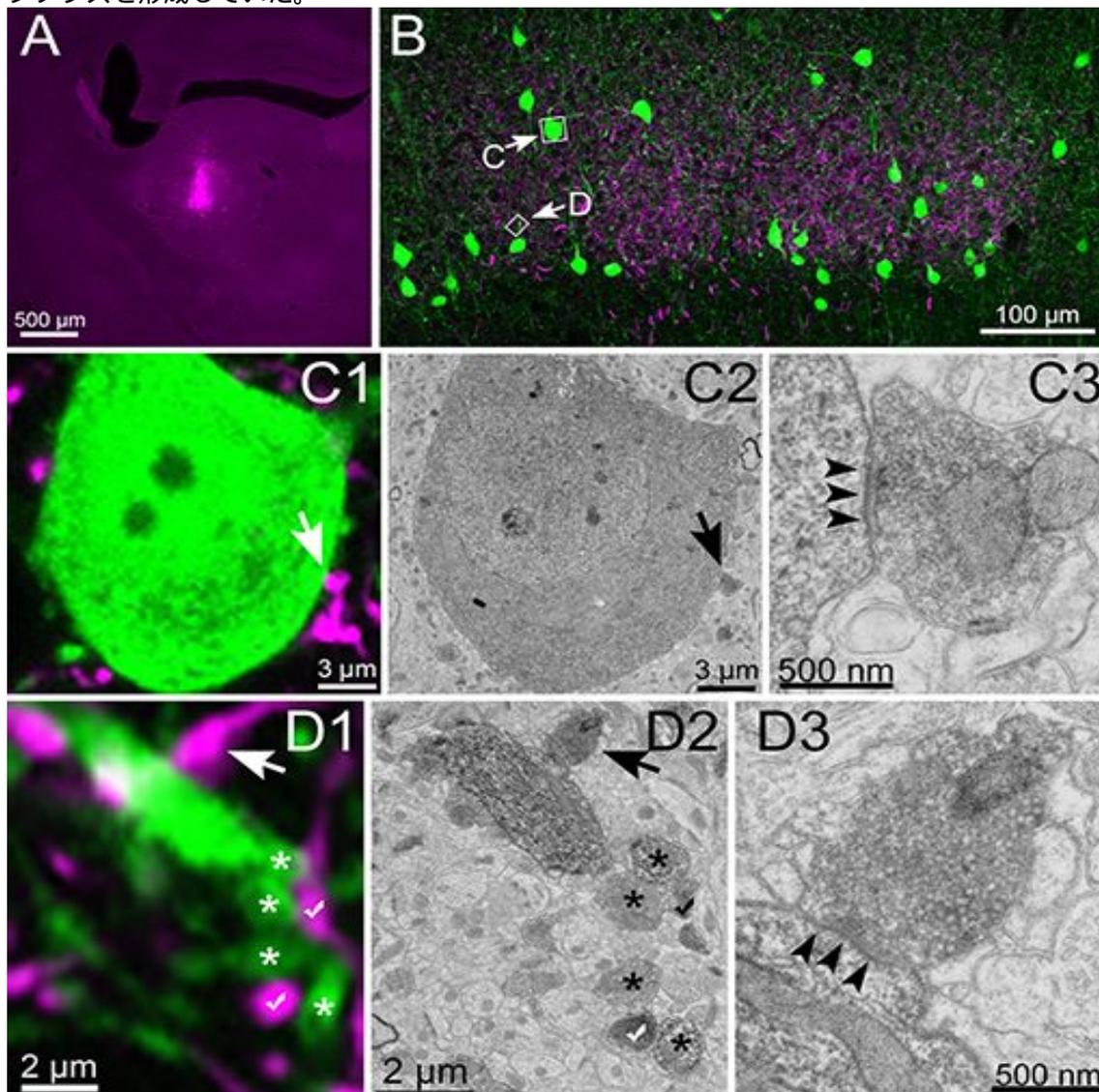


図 1 視床への BDA の微量注入と共焦点レーザー顕微鏡に続く電子顕微鏡観察

(A)視床の VPM 核の BDA 注入箇所(Magenta) (B)大脳皮質 1 次体性感覚野の低倍率の共焦点レーザー顕微鏡画像 PV ニューロン(Green)と視床 皮質間入力(Magenta) C と D で指し示す領域は高倍率で観察した箇所を示す。(C)細胞体と(D)樹状突起上に付着する視床 皮質間入力の例 それぞれ(1)は共焦点レーザー顕微鏡で取得した蛍光 2 重染色像、(2)は電子顕微鏡で取得した(1)に相当する低倍率画像、(3)は(1)と(2)の矢印で指し示した部位の高倍率画像を示している。D1 と D2 中のマークはそれぞれ同じ染色部位を指し示している。

と の結果を受けて、共焦点レーザー顕微鏡で網羅的に観察した PV ニューロンの細胞体・樹状突起上の視床 皮質間入力は高い確率でシナプスを形成していると判断し、 の過程を行った。

の結果について

・ と同様に、視床の PM 核へ BDA を微量注入したマウスに対して、グルタルアルデヒドを含まない固定液(4.0% Glutaraldehyde in 0.1 M PB)を用いて灌流固定を行った。1 次体性感覚野を含む、厚さ 40 μm の冠状断片を連続切片として作成した。作成した切片に対して、PV と VGlut2 についてはそれぞれの抗原に対する抗体を用いた蛍光染色、BDA については蛍光標識を施した streptavidin による蛍光標識を組み合わせ、蛍光 3 重染色として標本を作成した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像取得を行い、Serial optical slice のデジタル画像を保存した。

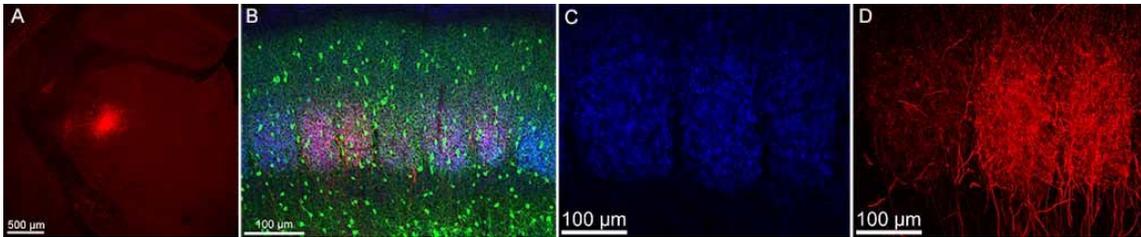


図2 視床へのBDAの微量注入と蛍光3重染色に続く、共焦点レーザー顕微鏡画像取得 (A), 視床VPM核にけるBDAの注入部位(赤) (B), 蛍光3重染色によるPV(緑)、VGlut2(青)、BDAで可視化された視床皮質間入力(赤)。共焦点レーザー顕微鏡による低倍率画像を示している。(C)(D), (B)の画像の中の左側3つのBarrel構造の高倍率画像(C)がVGlut2(青)、(D)がBDAをそれぞれ示している。

保存したデジタル画像をもとに画像解析ソフト NeuroLucida を用いて3次元再構築を行っていくのであるが、その際、可視化された視床-皮質間入力の軸索は構造が複雑であることから、BDAによって標識された軸索が疎であるBarrelを選択して再構築に使用することとした。すなわち、図2C,Dで例示されている3個のBarrelのうち、1番左のBarrelを選択した。選択したBarrelの中に細胞体を局在させるPVニューロンを再構築したところ、Type1が3個、Type2が7個、それぞれ存在することが判明した。さらにこのBarrel内に軸索を投射している視床皮質入力の軸索を13本再構築したところ、複数のPVニューロン上にブトンを付着させているものが12本存在した。

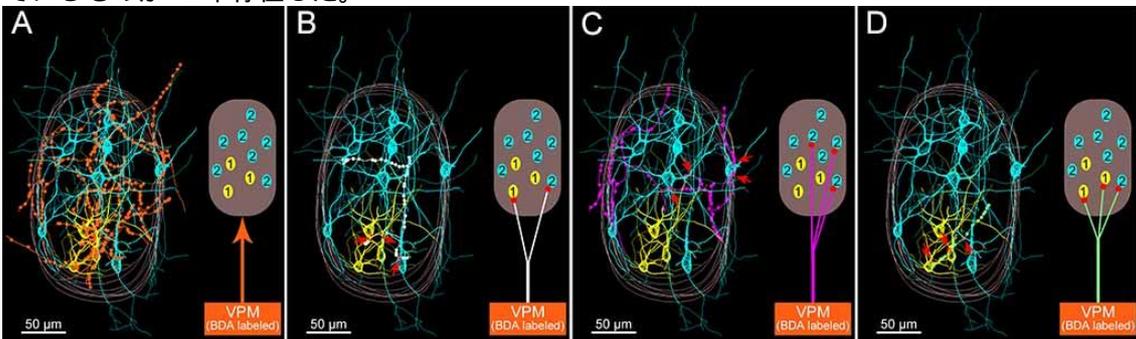


図3 画像解析ソフト NeuroLucida を用いたPVニューロンとBarrel、および視床皮質間入力の3次元再構築像 (A), 選択したBarrelの中に細胞体を局在させているPVニューロンのうち、Type1(黄色)に属するものが3個、Type2(シアン)に属するものが7個存在した。このBarrel内に投射されている視床-皮質間入力の軸索のうち13本を再構築した(橙色)。(B), 軸索うちType1とType2のPVニューロンにブトンを付着させている軸索の例(白)赤矢印で示した部位で軸索上のブトンはPVニューロンに付着していた。(C), 複数のType2のPVニューロンにブトンを付着させていた軸索の例(マゼンタ)。赤矢印で示した部位でType2のPVニューロン上にもブトンを付着させていた。(D)複数のType1にブトンを付着させていた軸索の例(薄緑)赤矢印で示した部位で2個のType1 PVニューロン上にブトンを付着させていた。この例の場合、Type2のPVニューロン上にもブトンを付着させていた。

12本のうち5本の軸索はType1とType2にPVニューロンの樹状突起もしくは細胞体上にブトンを付着させていた(図3B)。また、12本中5本が複数のType2 PVニューロン上にブトンを付着させていた(図3C)。最後に12本中3本が複数のType1 PVニューロン上にブトンを付着させていた。

この結果は、1次体性感覚野4層のBarrelに投射される視床皮質間入力は、これまで我々が分類したPVニューロンのサブタイプに対する選択性は存在しないことを示していた。つまり、PVニューロンは視床からの入力を受動的に受けていることを示唆している。特にType1 PVニューロンは同じサブタイプの樹状突起間でGap junctionを介した相互の結合がないことから、そのType1 PVニューロンにも視床は選択性を示さなかったのは驚きであった。

本研究の結果は、視床からの興奮性入力には選択性は存在せず、その標的となる視床の4層のPVニューロンで信号の選別が行われている可能性を示唆している。

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 Shigematsu Naoki, Nishi Akinori, Fukuda Takaichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Gap Junctions Interconnect Different Subtypes of Parvalbumin-Positive Interneurons in Barrels and Septa with Connectivity Unique to Each Subtype	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 1414 ~ 1429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhy038	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2件（うち招待講演 0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形態の3次元解析
3. 学会等名 124回 日本解剖学会
4. 発表年 2019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 SfN's 48th annual meeting, Neuroscience 2018（国際学会）
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
---------	---------