

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500292
 研究課題名（和文） 脊髄側角交感性ニューロンがアセチルコリンと GABA を利用する機序の形態学的研究
 研究課題名（英文） Morphological investigation of Ach and GABA in the spinal sympathetic neurons
 研究代表者
 野条 良彰 (NOJYO YOSHIAKI)
 福井大学・医学部・教授
 研究者番号：20079685

研究成果の概要：

交感神経系において、節前ニューロンの軸索が、節後ニューロンの樹状突起や細胞体棘にどのような3次元展開を示して終末するのか研究を進めた。今回、標的器官の違いによる相違を類型化することを目標として、促進性のアセチルコリンと抑制性の GABA の共存の観点から検討した。眼球、顔面上部と中部皮膚、耳下腺、顎下腺、口腔粘膜に投射する節後ニューロン周囲の GABA 含有終末を観察したが、特有の関係を見いだすことは出来なかった。一方、同時に観察した頸髄の γ 運動ニューロンの一部は GABA を含有することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We have examined spatial distribution of sympathetic preganglionic axon terminals on dendrites and somatic spines of postganglionic neurons. In this study, we focused on colocalization of acetylcholine (excitatory neurotransmitter) and GABA (inhibitory neurotransmitter) in preganglionic terminals to investigate whether there is association between target organ of postganglionic neurons and content of neurotransmitter in preganglionic terminals that innervate them. We examined spatial relationship between GABA-containing preganglionic terminals and retrogradely-labeled postganglionic neurons which project to eye, upper and lower facial skin, parotid gland, submandibular gland, or oral mucosa, and found there is no special relationship between them. We also found that a subpopulation of γ -motoneurons express GABA as well as acetylcholine. Released GABA from γ -fiber terminals is likely to be accumulated in sheath cells of muscle spindles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：交感神経節、GABA 陽性交感神経節前線維、脊髄側角ニューロン

1. 研究開始当初の背景

交感神経系は、1) 脊髄側角の節前ニューロンが交感神経節の節後ニューロンに終わる。2) この節後ニューロンが標的器官の細胞に接近して終わる。つまり、2段階の単純きわまりない神経路で機能している、と思われがちである。しかし、実際はそんな単純で簡単な2段階回路ではない。

動物が必死に闘い、必死に逃げる命の掛かった緊急事態が発生すると、交感神経系は、内臓機能を中心に、筋肉、心肺、脳感覚器などの血液流を一気に増加させ、機能を活性化させる。その際、一斉に多くの組織細胞を適正に調節するのである。そこには、相互協調と相互抑制の様式が混在している。そうした神経性調律は、脊髄灰白質と交感神経節内の局所神経回路網で対応している。私は、節後ニューロンの投射路の追跡や交感神経節内の局所回路網の形態学的解明を研究の大きな目標としてきた。順行性標識法を用いて、頭頸部の主要標的器官に向かう交感神経線維の走行を追い、新事実を報告してきた。

近年、私は、節前ニューロンの軸索が、節後ニューロンの樹状突起や細胞体棘にどのような3次元的展開を示して終末するのかを、明らかにする目的で節前ニューロンをPHA-L 順行性標識で染め、上頸神経節や星状神経節での終末叢の個々の形状と分布様式を観察し、連続切片から3次元の終末軸索展開像を2次元的に描画して所見を発表してきた。そして、ここ数年、標的器官の違いによる軸索展開像の相違を明らかにすることで、節前ニューロンの終末展開像を生理的機能の別に類型化することを研究目標としてきた。特に、節前ニューロンの一部に、促進性のアセチルコリンと抑制性のGABAが共存する事実が報告されていることを知って、このニューロン系を特に注目して形態学的検討を始めた。

交感神経系ではアセチルコリンとGABAが共存するニューロンは、数が限られており、なおかつ、軸索の走行と終末展開像の詳細な追跡、観察が可能である。この節前ニューロンが終末する節後ニューロンが組織と細胞を支配しているのかを探索することで、機能的な類型化の可能性が高いと考え、集中的に形態学的調査を始めたところである。

2. 研究の目的

(1) GABA 共存の節前ニューロンの軸索が、上頸神経節や星状神経節でどの様に分布するのか、どの様な3次元展開像を示して節後ニューロンに終わるのかを観察し描画する。先行させた予備的実験から、対象とする節後ニューロン周囲に繊細な終末叢を形成することは、すでに観察している。本研究の中でGABA 陽性節前ニューロンの軸索終末叢の形態を数多く、詳細に神経節内の位置情報も考慮して描画し、記録する。

(2) GABA 陽性節前ニューロンの神経終末叢と節後ニューロンの樹状突起の位置的関係を探る。つまり、節後ニューロンをNA合成酵素であるDBHに対する免疫組織化学法で染色して細胞体や1次樹状突起を明らかにして、GABA 陽性軸索が樹状突起のこういった高さに終末鈕を接触させかを観察する。

(3) GABA 陽性節前軸索が支配する節後ニューロンは、どの様な標的を支配するのか、逆行性標識法とGABA合成酵素免疫組織化学法を同時に使うことで、解明する。以前、我々はWGA-HRPを各種標的に予め注入しておいたラットを注入固定し、上頸神経節を摘出、NO関連酵素であるNADPH-dの組織化学法で節前ニューロンの軸索終末を染め、頬粘膜、口唇部皮膚などに投射する節後ニューロンがNADPH-d含有節前軸索の終末叢に取り巻かれる傾向が強いことを観察した。この方法と同様な方法を適用して、GABA 陽性節前軸索が、どの様な器官、組織、細胞を標的とする節後ニューロンに密な終末叢を形成するのか、形態学的に検討する。

また、GABAがアセチルコリンと共存するとして、その機能的意義はどのようなであろうか。シナプス前から放出される化学物質とそれに対するシナプス後膜にある各種受容体の存在のために、複雑な関係が成立している筈である。GABAの共存の生理学的意義は、本研究の対象とはしないが、機能的に極めて興味深い事柄であるといえる。

3. 研究の方法

(1) 複数の交感神経節で GABA 含有神経終末叢の密度などを調べる：

①GABA 陽性神経終末を抗 GABA 抗体 や 合成酵素 GAD65、GAD67 に対する抗体を用いて免疫組織化学法で染色する（動物と切片の処理：分担者 伊藤、観察写真撮影：代表者 野条および分担者 伊藤）。

実験動物は成熟ラットあるいは幼若ラットを使用する。上頸神経節、星状神経節、さらにこれより下位の胸部交感神経節を観察対象にする。

GABA 陽性神経終末は、頭側の2つの神経節に豊富であるが、星状神経節においては数がかなり減少する。複数の神経節で GABA 陽性神経終末を探し、それによって取り囲まれた節後ニューロンの細胞体の大きさや細胞の数（密集度）などについて観察、写真撮影を行う。切片は可能な限り、連続切片として並べ、隣あった切片の像も撮影して3次元再構築を試みる。レーザー共焦点顕微鏡を使用し、高解像度の画像を効率良く、撮影、処理する。なお、写真撮影は、以下の観察のほぼ全てで同様に使用することになる。

②上記の抗 GAD65、GAD67 抗体とノルアドレナリン合成酵素の DBH に対する抗体の2重免疫組織化学染色を実施し、GABA 陽性線維の終末がアドレナリン作働性節後ニューロンの細胞体表面や樹状突起などにどのように接触するか、観察、写真撮影を行う。また、神経節間でそうした所見に異同があるか調べる（動物と切片の処理：分担者 伊藤、観察写真撮影：代表者 野条および分担者 伊藤）。

上頸神経節は顔面頭部の主要器官と組織に交感神経を送る。これに対し、胸部交感神経節は主として体壁を構成する組織と血管が主な標的器官である。こうした標的差が GABA 陽性終末の交感神経節分布にどのような違いを見せるか、興味深い。上頸神経節は、眼、唾液腺、口唇、松果体、内耳など、他の交感神経節とは大いに異なる組織・細胞を標的としている。上頸神経節について特に綿密に観察を行う予定である。

③ほとんど、GABA 陽性線維は無い可能性が高いが、腹腔神経節や腸間膜神経節など、消化管との関係が深い神経節でどのような終末像が得られるか興味深い。また、前肢後肢の足底の無毛部、つまり肉趾には汗腺が準備されている。この汗腺には特別に分化したアセチルコリン作働性の交感神経節後ニューロンが準備されている。コリン作働性の出力ニューロンが GABA 陽性線維とどういう神経終末叢を作って接続するか観察する（動物と切片の処理：分担者 伊藤、観察写真撮影：代表

者 野条および分担者 伊藤）。

(2) GABA 陽性線維終末の3次元展開像を連続切片から再構築する：

上頸神経節、星状神経節、あるいはこれらより下位の交感神経節で得られた GABA 陽性節前ニューロンの軸索像をレーザー共焦点顕微鏡で撮影。得られた軸索像のうち、再構築し易いと判断した軸索を選び出して画像をかなり細かい階層で連続再生しながら、軸索を連続的に追跡し、軸索の走行、および分岐展開像を再構築する（代表者 野条、分担者 伊藤）。

節後ニューロンを籠状に囲む終末叢と神経網（ニューロヒル）領域に展開する陽性線維の軸索展開像を追跡し再構築を試みる。

(3) GABA 陽性神経終末を高密度で受ける節後ニューロンは、如何なる標的に投射するか：

上頸神経節や星状神経節の節後ニューロンが投射する器官、組織に逆行標識物質（フルオロ金、デキストラン、ファースト青、核イエロー、WGAHRP など）を投与する（分担者：伊藤）。それぞれの標識物質にふさわしい時間を経過させた後、麻酔下にラットを還流固定。上頸神経節や星状神経節を摘出して連続切片を作製する。

抗 GABA 抗体か、合成酵素の GAD65、GAD67 に対する抗体を使って GABA 陽性線維を染色する（分担者 伊藤）。こうした切片を観察して、密度の高い神経終末叢と逆行性標識された節後ニューロンの重なりを探し、その実験例では、投射先の組織あるいは細胞が何であったかを検討する。

この時間の掛かる実験と観察を様々な組織、細胞に対して行うことで、GABA 含有節前ニューロンがどのような機能を有しているか、重要な手がかりを得ることが期待できる。

予想であるが、顎下腺など、副交感性で機能する組織について、交感神経興奮時にも働かせたい場合など、線維を送り出す星状神経節や仙骨部の交感神経側方抑制を加える必要があると考えられる。こうした、副交感性機能組織を重点的に観察する予定である（代表者 野条）。

また、前肢や後肢の無毛部皮膚の下層に存在している汗腺へのアセチルコリン作働性節後ニューロンと GABA 陽性節前ニューロンとに関係があるか無いか、特に注目したい。

4. 研究成果

(1) 逆行性標識物質である「ニュークリアー黄」や「WGA-HRP」を眼球、顔面上部の皮下、顔面中部の皮下に注射し、3-7日後にラットを麻酔、注入固定して両側の上頰神経節を摘出、後固定を経て、凍結切片作製。浮遊法でGAD65、あるいはGAD67抗体で免疫組織化学法を実施。蛍光顕微鏡で観察を行った。

眼球、顔面上部および中部の皮下に逆行性標識剤を投与した例では、逆行性標識された上頰神経節後ニューロンの細胞体、あるいは細胞体近傍をGABA陽性線維が取り囲む所見を見つけることは出来なかった。

(2) 上記と同様の逆行性標識法を耳下腺、顎下腺、口腔粘膜などに実施した場合、ごく少数のニューロンに接近するGABA陽性の節前線維終末が認められたが、GABA陽性終末はこうした逆行性に標識された節後ニューロンには明瞭な取り巻き終末構造は示さなかった。唾液腺を支配する交感神経節後線維に特異的に終わるとは判断できなかった。

(3) 我々は上頰神経節に投射するGABA含有線維が脊髄交感神経節前ニューロンに由来することを示した。この際、我々はGABA含有線維がC5前根のような交感神経節前線維を含まない神経にも存在することを観察した。そこで、観察対象を拡大し、この線維の由来についても調査を行った。GABA産生線維(GABA合成酵素のGAD67陽性線維)はC5からT5までの前根、腕神経叢などに観察された。また上腕、前腕の筋の筋紡錘内筋に絡み付いていた。これらのGABA含有線維はコリン作動性のマーカーも同時に発現した。腕神経叢の切断後、筋紡錘のGAD67陽性は完全に消失した。上腕三頭筋に逆行性トレーサーのfluorogoldを注入後、脊髄切片に対してGAD67 mRNAに対するin situ hybridizationとfluorogoldに対する免疫組織化学を同時に行ったところ、逆行性標識された中型ニューロンの一部がGAD67 mRNAを発現することが明らかになった。これらのことは上腕に投射する頸髄のγ運動ニューロンの一部がGABAを含有することを示している。これらのニューロンはGABAのシナプス小胞放出のマーカーであるVGATを発現しなかった。また、上腕三頭筋においてGABA AおよびB受容体mRNAは検出されなかった。このためGABA含有γ運動ニューロンの機能は目下不明であり、さらなる研究が必要である。また、腕神経叢座滅後、4日経過すると、運動ニューロンがGADを発現する現象を発見した。座滅部位を観察すると、再生中の神経突起がGABAおよびGAD免疫反応陽性であり、神経再生

とGABAになんらかの関係があると考えられた。今後実験条件を検討することによってこの事象の分子機構について解明を試みる。

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9件)

- ① Immunohistochemical demonstration of c-Kit-negative fibroblast-like cells in murine gastrointestinal musculature., Arch Histol Cytol., 72(2):107-15. (2009), Iino S, Nojyo Y. 査読有
- ② The expression of soluble guanylate cyclase in the vasculature of rat skeletal muscle., Arch Histol Cytol., 72(2):117-26. (2009), Fukutani T, Iino S, Nojyo Y. 査読有
- ③ W(sh)/W(sh) c-Kit mutant mice possess interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus layer of the small intestine. Neurosci Lett, 14;459(3):123-6(2009), Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y. 査読有
- ④ c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor alpha in the murine gastrointestinal musculature., Histochem Cell Biol., 131(6):691-702. (2009), Iino S, Horiguchi K, Horiguchi S, Nojyo Y. 査読有
- ⑤ Interstitial cells of Cajal contain signalling molecules for transduction of nitrergic stimulation in guinea pig caecum., Neurogastroenterol Motil., 21(5):542-50, (2009), Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y., Ward SM, Sanders KM. 査読有
- ⑥ Some gamma-motoneurons contain gamma-aminobutyric acid in the rat cervical spinal cord., Brain Res., 1201:78-87. (2008), Ito T., Hioki H, Nakamura K, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. 査読有
- ⑦ Interstitial cells of Cajal are innervated by nitrergic nerves and express nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the guinea-pig gastrointestinal tract., Neuroscienc

e., 152(2):437-48. (2008), Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y. 査読有

- ⑧ Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of W mutant mice., Arch Histol Cytol., 70(3):163-73. (2007), Iino S, Horiguchi S, Horiguchi K, Nojyo Y. 査読有
- ⑨ Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion., J Comp Neurol., 502(1):113-25. (2007), Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ①飯野 哲, 堀口 和秀, 堀口 里美, 野条 良彰, マウス消化管筋層における線維芽細胞の免疫化学的特徴, 第 50 回日本組織細胞化学学会総会, 2009. 09. 27, 大津市
- ②飯野 哲, 堀口 和秀, 堀口 里美, 野条 良彰, W ミュータントマウスにおける小腸カハール介在細胞の発生, 第 50 回日本組織細胞化学学会総会, 2009. 09 .27, 大津市
- ③S. Iino, K. Horiguchi, S. Horiguchi, Y. Nojyo, Immunohistochemical demonstration of c-Kit-negative fibroblast-like cells in the murine gastrointestinal musculature., Post-Genomic Advances in the Physiology of Smooth Muscle Satellite Symposium of the IUPS 2009, 2009. 07. 23, 名古屋市
- ④堀口 里美, 堀口 和秀, 野条 良彰, 飯野 哲, 胎生 W マウスを用いたカハール介在細胞の発生に関する形態学的・分子生物学的解析, 第 51 回日本平滑筋学会総会, 2009. 07. 22, 名古屋市
- ⑤飯野 哲, 堀口 和秀, 堀口 里美, 野条 良彰, マウス消化管筋層に分布する c-Kit 陰性線維芽細胞の免疫化学的特徴, 第 51 回日本平滑筋学会総会, 2009. 07. 22, 名古屋市
- ⑥飯野 哲, 堀口 和秀, 堀口 里美, 野条 良彰, マウス小腸カハール介在細胞の発生における Kit チロシンキナーゼ, 第 114 回日本解剖学会総会・学術集会, 2009. 03. 30, 岡山市

- ⑦堀口 里美, 堀口 和秀, 野条 良彰, 飯野 哲, マウス胎生期小腸におけるカハール介在細胞の発生に関わる遺伝子群の探索, 第 114 回日本解剖学会総会・学術集会, 2009. 03. 30, 岡山市
- ⑧飯野 哲, 堀口 里美, 堀口 和秀, 野条 良彰, 消化管筋層において PDGF 受容体 α を発現する非カハール間質細胞, 第 114 回日本解剖学会総会・学術集会, 2009. 03. 30, 岡山市
- ⑨堀口 和秀, 堀口 里美, 飯野 哲, 野条 良彰, 小室 輝昌, W 変異マウスの胎生期小腸における c-KIT 発現細胞の動態, 第 114 回日本解剖学会総会・学術集会, 2009. 03. 30, 岡山市
- ⑩飯野 哲, 堀口 和秀, 堀口 里美, 野条 良彰, マウス小腸における Kit チロシンキナーゼ非依存性カハール介在細胞発生, 第 68 回日本解剖学会中部地方会, 2008. 10. 12, 愛知
- ⑪堀口 里美, 堀口 和秀, 野条 良彰, 飯野 哲, 消化管ペースメーカー細胞の発生に関わる遺伝子群の探索, 第 7 回日本神経消化器病学会, 2008. 09. 30, 東京
- ⑫飯野 哲, 堀口 和秀, 野条 良彰, カハール介在細胞における一酸化窒素受容システム, 第 7 回日本神経消化器病学会, 2008. 09. 30, 東京
- ⑬堀口 里美, 堀口 和秀, 野条 良彰, 飯野 哲, カハール介在細胞の発生に関わる遺伝子群, 第 50 回日本平滑筋学会総会, 2008. 07. 4, 弘前市
- ⑭飯野 哲, 堀口 和秀, 野条 良彰, カハール介在細胞は cGMP シグナル伝達系分子を発現する, 第 50 回日本平滑筋学会総会 2008. 07. 4, 弘前市
- ⑮堀口 和秀, 堀口 里美, 飯野 哲, 野条 良彰, 小室 輝昌, モルモット尿管粘膜固有層の線維芽細胞, 第 113 回日本解剖学会総会・学術集会, 2008. 03. 28, 大分市
- ⑯飯野 哲, 堀口 里美, 堀口 和秀, 野条 良彰, W ミュータントマウスにおける消化管カハール介在細胞, 第 113 回日本解剖学会総会・学術集会, 2008. 03. 28, 大分市

- ⑰飯野 哲, 堀口 和秀, 野条 良彰, 消化管カハール介在細胞における cGMP シグナル伝達系分子, 第 113 回日本解剖学会総会・学術集会, 2008. 03. 28, 大分市
- ⑱S. Iino, K. Horiguchi, H. Suzuki, S. Horiguchi, Y. Nojyo, Loss of interstitial cells of Cajal and neuromuscular transmission caused by imatinib administration in the murine gastric fundus, The 4th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience, 2007. 10. 28, 京都
- ⑲伊藤 哲史, 野条 良彰, GABA を含有する体性運動ニューロン, 日本解剖学会第 67 回中部支部学術集会, 2007. 10. 13, 長久手
- ⑳飯野 哲, 堀口 和秀, 鈴木 光, 堀口 里美, 野条 良彰, イマチニブ投与によるマウス胃底部でのカハール介在細胞欠損と神経筋伝達不全, 日本解剖学会第 67 回中部支部学術集会, 2007. 10. 13, 長久手

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野条 良彰 (NOJYO YOSHIAKI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：20079685

(2) 研究分担者

伊藤 哲史 (ITO TETHUFUMI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：90334812
(H19 年度のみ)