

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18825

研究課題名(和文) デジタル電子顕微鏡三次元再構築法による嗅球カルレチニン免疫陽性ニューロンの解析

研究課題名(英文) Synaptic analysis of calretinin immunoreactive neurons in the rat olfactory glomerulus by electron microscopy

研究代表者

野津 英司 (NOTSU, EIJI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80388933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、匂い情報の一次中枢である嗅球で、情報の調節に重要な役割を果たしている介在ニューロン群のなかで、神経回路の解析が進んでいないcalretinin免疫陽性ニューロン(CRニューロン)を形態学的手法で解析するものである。ラット嗅球CRニューロンを免疫染色と電子顕微鏡によって解析をおこなった結果、樹状突起に、抑制性伝達物質であるGABAを含むことが示唆される小胞が集積している部位を確認した。一方で、これまでに起こった広範囲電顕観察ではCRニューロンが形成するシナプスは観察できず、他の傍系球体ニューロンと比較して出力となるシナプスが少ないことが示唆される結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、嗅球の主要な介在ニューロンの1つでありながら、未だその機能的基盤となる神経回路が明らかになっていないCRニューロンのシナプスを形態学的な観点から解析したものである。シナプス結合はナノメートルレベルの構造物であり、その存在や形態については電子顕微鏡を用いた解析が必要であるが、これまでにその報告は少数であった。今回得られた研究成果は、CRニューロンがこれまでに解析されているcalbindin免疫陽性ニューロン(CBニューロン)やtyrosine hydroxylase免疫陽性ニューロン(THニューロン)と異なる回路特性を有していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The olfactory bulb is the first processing center of odor information, and interneurons located there are thought to play an important role in information processing. Calretinin immunoreactive neurons (CR neurons) are one of the major subpopulations of olfactory bulb interneurons. However, the neural circuits underlying odor processing are not clear. The aim of this study is to characterize the morphological features of synapses, a major component of the neuronal circuit, in CR neurons by electron microscopy. Immunostaining and electron microscopic analysis of rat olfactory bulb CR neurons suggest that vesicles containing the inhibitory transmitter GABA are accumulated in several regions of the dendrites. On the other hand, no clearly identifiable synapses formed by CR neurons could be observed in the wide range of high-resolution images obtained by electron microscopy montage at present, suggesting that there are fewer output synapses compared to other periglomerular neurons.

研究分野：神経解剖学

キーワード：嗅球 神経回路 シナプス結合 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

嗅球は匂い情報の一次中枢で、鼻腔の嗅粘膜で受容された匂い情報の入力を受け、その情報を処理した後により高次の中枢へと投射する。無数に存在する匂いを限られた匂い分子受容体によって識別する嗅覚のメカニズムは未だ明らかではない。匂い分子受容体からの情報は、嗅球で空間的に分布した糸球体の組合せに変換されるが、嗅球から投射される線維の分布には空間的な特性は見られず、空間的情報ではない様式に変換されていると考えられている。この嗅球での匂い情報の処理には、嗅球に存在する介在ニューロン群が重要な役割を果たしていると考えられており、嗅球の投射ニューロンである僧帽細胞および房飾細胞と介在ニューロンとの間に形成されるシナプス神経回路の解析が進められている。

嗅球表層には匂い情報の入力を受ける糸球体が並んでおり、その周囲には傍糸球体ニューロンと呼ばれる介在ニューロンが存在する。傍糸球体ニューロンは含有する神経化学物質によっていくつかのサブポピュレーションに分類されており、そのサブポピュレーションを対象として解析が進められてきた。主要な傍糸球体細胞では、免疫染色によって同定される calbindin 免疫陽性ニューロン (CB ニューロン) は投射ニューロンである僧帽細胞・房飾細胞の樹状突起から興奮性のシナプスが形成され、その近傍に CB ニューロンから僧帽細胞・房飾細胞に向けて抑制性のシナプスを形成する、reciprocal synapse と呼ばれる精緻なシナプス神経回路を形成することがあきらかになっており (Toida et al., 1998) 匂い刺激を受け取った嗅受容細胞からの入力によって興奮した僧帽細胞・房飾細胞の興奮を速やかに抑制し、時間的な分解能を挙げることができると考えられる。また、tyrosine hydroxylase 免疫陽性ニューロン (TH ニューロン) は近接する嗅受容細胞などから入力を受け、隣接する神経要素に対して抑制性のシナプスを形成する serial synapse を形成する (Toida et al., 2000) など、嗅球糸球体での匂い情報処理機構の基盤となるシナプス神経回路の形態学的な知見が得られている。しかしながら、傍糸球体ニューロンの最大のサブポピュレーションの 1 つである calretinin 免疫陽性ニューロン (CR ニューロン) については、どのような神経回路を形成しているかは明らかではない。その原因の 1 つとして、CR ニューロンの標識となる calbindin について、僧帽細胞も僅かに免疫陽性を示すことが知られており、その判別が困難であることから解析が進んでいない。我々はこれまで、免疫染色によって標識したニューロンをレーザー顕微鏡で撮影し、その光学顕微鏡レベルで形態の情報を取得した後、同一の標本を電子顕微鏡標本で観察する手法を用いて、ニューロンの全体像とシナプス結合についての解析をおこなってきた。電子顕微鏡での観察では、連続切片を高倍率でモニター撮影をおこなう手法を組み合わせることで、対象となるシナプスとその周囲の要素についても三次元的に情報を取得しての解析をおこなっており、同手法であればこれまで明らかでない CR ニューロンのシナプスについての解析も行えるものと考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CR ニューロンの機能的な基盤となる神経回路を明らかにする上で必要となるシナプス結合についての知見を得ることである。前述のように、傍糸球体ニューロンの主要なサブポピュレーションである CB ニューロン、TH ニューロンについては形成するシナプス結合の形態、結合する相手側のニューロンおよび CB および TH ニューロンへの入力となるシナプスを形成するニューロンについての詳細な報告がなされており、その機能的な解析の基盤となっている。本研究で対象とした CR ニューロンは、傍糸球体細胞の中でも GABA 免疫陽性ニューロンと共に最大のサブポピュレーションでありながら、形成するシナプス結合の形態や相手となる神経が明らかになっておらず、これらを明らかにすることにより、糸球体における匂い情報調節を理解する際に必要な知見を得られると期待できる。

3. 研究の方法

実験動物には、これまでに嗅球傍糸球体ニューロンの神経回路の解析が行われてきたラットを使用した。動物実験については川崎医科大学動物実験委員会の審査と承認を受け、同動物委員会指針に基づいておこなった。

本研究では CR ニューロンのシナプスの形態的な解析と、 γ -amino butyric acid (GABA) を中心とした神経化学的な特性の解析をおこなった。CR ニューロンの神経回路の解析には、共焦点レーザー顕微鏡による三次元解析と、電子顕微鏡連続切片法による微細構造レベルでの再構築法を組み合わせる解析手法を用いる。この手法では解析対象となるニューロンの全体像を光学顕微鏡レベルで記録し、記録後の標本を電子顕微鏡標本へと置換する。これにより、ニューロン全体を電子顕微鏡レベルで解析することが可能となり、免疫組織化学的には明確に識別することが現状では不可能な、嗅球投射ニューロンと CR ニューロンを形態学的に識別し、同時にシナプス結合の解析が行える。神経化学的特性は複数の抗体を用いての多重免疫染色での検証をおこなった。具体的な手法は以下に示す。

【ニューロン標識】

解析対象となる CR ニューロンは、Anti-CR 抗体による免疫染色を行い標識した。標識には、Biotin 標識二次抗体と FITC-conjugated streptavidin を使用し、この段階でレーザー顕微鏡による CR ニューロンの全体像および他のニューロンマーカーとの局在について検討した。FITC の蛍光標識による観察をおこなった後、同一の抗原に結合している streptavidin に対して biotin の結合性を利用して化学的な標識法に用いる Horseradish peroxidase を結合させ、3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 標識をおこなった。DAB は電子顕微鏡観察では電子密度の高い沈殿として確認できるため、同一のニューロンをレーザー顕微鏡と電子顕微鏡で観察することが可能となる。

多重染色では、Anti-CR 抗体に加え、神経伝達物質である GABA および GABA と関連する vesicular GABA transporter (VGAT) に対する抗体を使用した。VGAT はシナプス小胞に GABA を輸送するタンパクであり、GABA の機能的なマーカーとして知られている。

【電子顕微鏡連続切片法による神経回路解析】

上述のニューロン標識法で作製した標本をレーザー顕微鏡観察後、60nm 厚の電顕連続超薄切片を作製する。レーザー顕微鏡の立体構築像を元に、CR ニューロンと投射ニューロンが同定できる範囲を、一連の連続切片でモニタージュ撮影し、標識されたニューロンをトレースする。同時に、そのプロファイルに形成されているシナプスを画像上にプロットする。トレース像とシナプスプロットから立体再構築を行い、形態的な特徴からニューロンの同定とシナプス結合の解析をおこなった。VGAT との共染色では、CR ニューロンのレーザー顕微鏡像の撮影の際に、CR ニューロンの樹状突起上で VGAT 陽性を示す部位を記録し、電子顕微鏡で周囲の細胞体や血管などを目印として同一部位を同定し、撮影した。

4. 研究成果

今回の研究は、CR ニューロンのシナプスに焦点を当てて解析をおこなうものであり、シナプスを確認することが可能な分解能で、CR ニューロンが分布する嗅球系球体層を広範囲に撮影し、シナプスの検索をおこなったが、これまでのところ、当初の予想に反して CR ニューロンが形成するシナプスであると明確に同定出来る構造を確認できていない。一方で、CR ニューロンがシナプス後細胞となる CR ニューロンへの入力シナプスは比較的容易に確認することが可能であり、技術的な要因でシナプス結合が確認できない可能性は低いものと考えている。

今回確認した CR ニューロンへの入力となるシナプスは、形態的な特徴として、シナプス後膜側に電子密度の高い明瞭なシナプス後肥厚が確認でき、シナプス前終末側には円形を示すシナプス小胞が認められ、興奮性の非対称性シナプスの特徴を示した。また、シナプス前終末側の神経要素は比較的低い電子密度を呈していることから、僧帽細胞・房飾細胞であると考えられ、僧帽細胞・房飾細胞から興奮性の入力を受けていることが明らかになった。興奮性の入力については、嗅球系球体に軸索を投射する嗅受容細胞からの入力を受けているかどうかは重要な要素であるが、嗅受容細胞の電子顕微鏡的な特徴である電子密度が高いニューロンからの興奮性のシナプス入力は確認できなかった。嗅球系球体において、傍系球体細胞では、CR ニューロンと CB ニューロンの樹状突起は、嗅受容細胞の軸索が分布している領域には分布していないことから、嗅受容細胞からの直接の入力は受けないとされており、CB ニューロンでは電子顕微鏡レベルで確認されていたが、今回の研究で CR ニューロンでも同様の結果が確認できた。

CB ニューロンは僧帽細胞・房飾細胞からの興奮性入力の近傍で、CB ニューロンから僧帽細胞・房飾細胞への抑制性入力を形成する reciprocal synapse が存在することが報告されているが、CR ニューロンへの僧帽細胞・房飾細胞からの興奮性入力の近傍には CR ニューロンからのシナプスは確認できておらず、reciprocal synapse は形成されていない、もしくは形成されるとしても少数であると考えられる。また、先行研究で報告されている嗅球系球体層 CB ニューロンのシナプス結合 (Toida et al., 1998) では、CB ニューロンへの僧帽細胞・房飾細胞からの入力となるシナプスの数に対して、CB ニューロンからの出力となるシナプスの数は、解析の手法によって違いがあるが、60%程度は存在しており、CR ニューロンでは、CB ニューロンと比較して、興奮性のシナプス入力数に対する出力となるシナプス数が極端に少ないことが示唆される。

神経化学的な性質として、ラット嗅球系球体の CR ニューロンは GABA に対して免疫陰性を示すことが知られているが、マウス嗅球系球体層の CR ニューロンでは神経伝達物質として GABA を用いると考えられていることから、ラット嗅球系球体層の CR ニューロンについて GABA および関連するマーカーでの検証をおこなった。今回我々がおこなった抗 CR 抗体および抗 GABA 抗体を用いた多重染色では、CR ニューロンは GABA 免疫陽性であることが知られている TH ニューロンと比較して非常に弱い GABA 染色強度を示した。しかしながら、嗅球に存在する興奮性ニューロンである僧帽細胞・房飾細胞と比較すると CR ニューロンの GABA 染色強度は強く、GABA を用いている可能性が否定出来ない結果となった。そのため GABA の機能的なマーカーである VGAT を用いた多重染色をおこない、その結果、CR ニューロンの樹状突起に VGAT 陽性を示す部位を確認した。同部位を電子顕微鏡で観察すると、CR ニューロンの樹状突起にシナプス小胞と同定度の大きさを示す小胞が多数観察された。これらの結果は CR ニューロンが GABA を神経伝達物質として用いていることを示唆するものであると考えられる。

今回の研究で、ラット嗅球系球体層の CR ニューロンの神経回路について、僧帽細胞・房飾細胞とみられる神経からの興奮性の入力を受け、嗅受容細胞からの入力を受けていないことが示唆された。CR ニューロンからの出力については、研究を遂行中であるが、GABA を伝達物質として用いるが非常に数が少ないことが考えられる。今後 CR ニューロンが形成するシナプスについての検索を進め、そのシナプスの形態や CB ニューロンなど他の傍系球体細胞が形成するシナプスと定量的な比較をおこなう予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野津 英司、樋田 一徳
2. 発表標題 電子顕微鏡によるラット嗅球糸球体カルレチニン免疫陽性ニューロンのシナプス解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学解剖学教室 http://www.kawasaki-m.ac.jp/anatomy/
--

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
---------	---------