

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591032

研究課題名（和文）前海馬台、傍海馬台領域における神経結合関係の形態学的研究

研究課題名（英文）Morphological analysis of neural connections of the presubicular and parasubicular areas.

研究代表者

本多 祥子（HONDA YOSHIKO）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：40287313

研究成果の概要（和文）：前海馬台を含む海馬周辺皮質領域は空間認知／場所記憶情報の処理や統合に関与することが知られている。しかしながらこれらの領域の神経結合関係に関する形態学的情報は未だ十分ではない。申請者はこれらの領域の皮質間結合関係、即ち嗅内野、海馬台、脳梁膨大後部皮質等との線維連絡を部位・層レベルで調べてきた。本研究では前海馬台の機能を解明する目的で、GFP 発現ウイルスベクター法により前海馬台 V 層の皮質投射ニューロンを可視化し、単一ニューロンからどの皮質領域に何本の軸索側枝が送られているのかを形態解析した。その結果、前海馬台 V 層を構成する皮質投射細胞の中には、複数の反回側枝と共に単一もしくは二種類の海馬および海馬周辺皮質領域に軸索側枝を送る、6 タイプ以上の皮質投射細胞が存在することが初めて明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The parahippocampal regions including the presubiculum are known to be responsible for processing and integrating spatial representation information. However, details of input- and output connections of these areas are still unknown. To understand better the functional roles played by the presubiculum, we studied the axonal morphology of single layer V neurons of the presubiculum, which were visualized in the rat with a viral vector expressing membrane-targeted green fluorescent protein. We found that individual layer V neurons provide axonal branches to one or two cortical areas with several recurrent collaterals to the presubiculum itself. Our data demonstrated that there are at least six types of neurons which have different patterns of axonal collateralization in layer V of the rat presubiculum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：臨床神経形態学、記憶

## 1. 研究開始当初の背景

前海馬台領域を始めとする海馬周辺領域は、海馬領域と同様に、記憶形成機構およびアルツハイマー型認知症やてんかん発作の発症機構に深く関与することが示唆されながら、これまで詳細な形態学的解析が殆どなされなかった。その理由はこれらの領域の複雑な立体構築にある。すなわち海馬および海馬周辺皮質領域は、多くの実験動物種において海馬と同様に吻-尾/内-外方向に3次元のカーブを持つ細長い領域であるため、前顎断を始めとする通常の切片作成法では領域境界や組織構築の識別が難しく、過去の報告間にも矛盾が認められる状況であった。

そこで我々は、脳組織固定の際に大脳半球を固定液中で穏やかに整形し、海馬および海馬周辺皮質領域の長軸をほぼ直線にしてこれに直交する連続切片を作成すれば、これまで把握できなかった領域全体の細胞構築を精確に観察することができると考えた。まずはラットの脳を記憶形成神経回路の基本モデルとし、上述の切片作成法を用いて、従来の標識物質注入法や新しいウイルスベクター注入法で複数または単一のニューロンを可視化すれば、前海馬台を始めとした海馬周辺領域の未知の神経結合関係を調べることが出来ると考えた。

更に大脳辺縁系が発達しているウサギ脳でも、同じ方法で海馬伸展標本の完全連続切片を作成し、神経結合関係を解析することは十分可能と考えた。

## 2. 研究の目的

近年の電気生理学的研究で、ラットの前海馬台を含む海馬周辺皮質領域の深層（特にV層）や内側嗅内野、脳梁膨大後部皮質などにおいて、空間認知/記憶に関与する多種の細胞活動記録が盛んに報告されている（例：Head-Direction cell, Grid cell, 両者の機能を持ったConjunctive cellなど）。これらの細胞は特定の方位に対する頭部の特定の角度に反応したり、未知の二次元環境において身体が一定間隔の正三角形グリッド交点に達する毎に発火するといった興味深い特性を有する。これら様々なタイプのニューロンから得られた情報が統合処理されることで、動物は自分の置かれた位置の情報を認知・記憶することができるのではないかと考えられている。

本研究では機能や神経結合関係の未解明な部分が多い前海馬台領域に注目し、特にV層の単一皮質投射細胞がどの皮質領域に何本の軸索側枝を送るといった詳細を解析することにより、記憶形成機構における前海馬

台の役割を形態学的観点から明らかにすることを旨とした。更に、結果として得られた情報を生理学研究分野にもフィードバックすることで、記憶機構解明の促進に貢献できると考えた。

## 3. 研究の方法

(1) 膜移行シグナルおよびGFP発現遺伝子を組み込んだSindbisウイルスベクターをラット脳内に注入し、感染してGFPを発現したニューロンの突起形態全体をゴルジ法的に可視化する方法（京都大学・古田らにより開発された：Furuta et al, J Histochem Cytochem. 49, 1497-1507, 2001）を使用することにより、ラット前海馬台V層における複数の単一ニューロンの軸索形態を効率よく、高感度に可視化する手法を確立した。

(2) 更に、可視化した前海馬台単一ニューロンのすべての軸索分岐を含む突起形態の全長を海馬長軸直交連続切片内で追跡し、これをカメラルシダ下でのトレースおよび顕微鏡電動ステージを用いたコンピュータ画面上でのトレースにより立体的に再構築することを試みた。

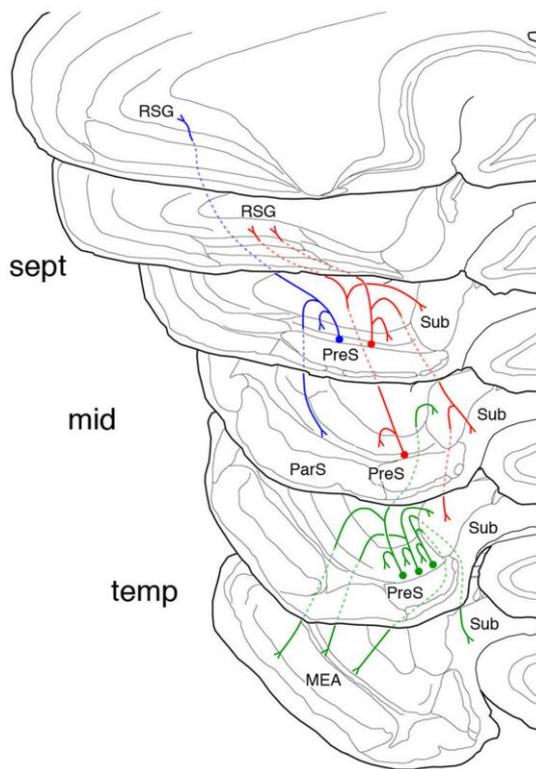
## 4. 研究成果

本研究により得られた成果は、ラット大脳辺縁系における皮質投射単一神経細胞の軸索分岐形態を長距離に渡って追跡し再構築することのできた初めての報告となった。今回単一前海馬台V層細胞の一本の軸索突起からは、多い例で数十本の軸索側枝が分岐し、それぞれ長いものでは5ミリ以上の距離を軸索終末まで追跡することができた。ウイルスベクター注入法を用いた神経細胞可視化手法によって、このような観察が初めて可能となった。

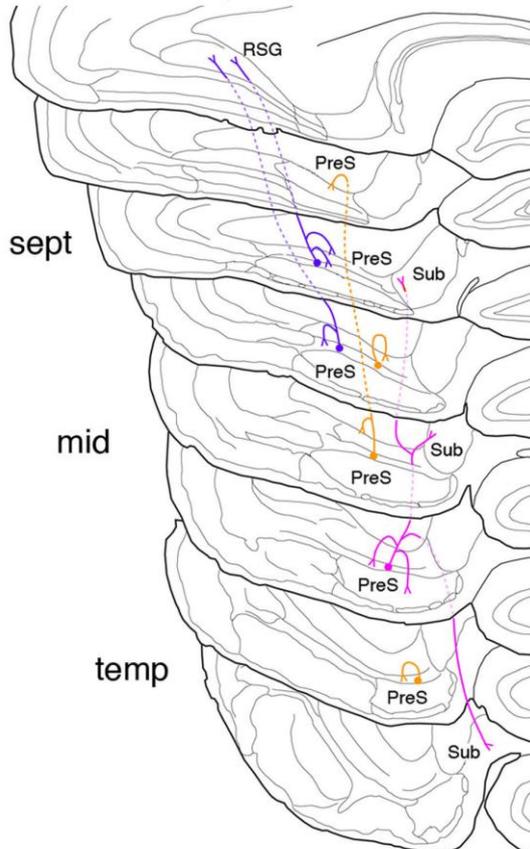
ラット前海馬台領域のV層を構成する皮質投射細胞の中には、複数の反回側枝と共に単一皮質領域（次ページ図A参照）もしくは二種類（脳梁膨大後部皮質と傍海馬台、など）の皮質領域（次ページ図B参照）に軸索側副枝を送る、少なくとも6タイプ以上の投射パターンを持つものが存在することが初めて明らかになった。

この結果により、前海馬台の皮質投射層は均一の神経要素から成る単純な構成ではなく、複数の投射パターンを持った神経細胞集団から成る、不均一かつ複雑な構成であることが判明した。

### A Bycortically projection cells in PreS



### B Monocortically projection cells in PreS



本研究の結果は、前海馬台V層の単一ニューロンが恐らく同一タイプの情報を同期して複数の皮質領域へ送っている可能性を示唆する。これは海馬周辺皮質領域の情報処理機構を解明する上で、非常に有用な形態学的基本情報と成りうる。

今後は、今回のウイルスベクター注入法を用いて、前海馬台の更に多くの皮質投射ニューロン軸索形態を解析するとともに、皮質下への投射軸索や反対側皮質領域への交連線維についても完全に再構築して同様に形態解析し、前海馬台を構成する各ニューロンの形態学的特徴をより詳細に明らかにしたい。

また、本研究の遂行期間中に、連携研究者（東京農工大・農・獣医解剖 柴田秀史准教授）と共同で、大脳辺縁系が良く発達しているウサギを実験動物モデルとして、前海馬台への標識物質注入実験を数例行った。その結果、ウサギでもラットと同様の強力な嗅内野-海馬体投射系が存在することが初めて観察できた。さらに、ウサギでは海馬CA1領域から前海馬台へ強い直接入力があるなど、ラットと大きく異なる新しい知見も複数得ることができた。広大なフィールドで正確な帰巢行動を示すウサギは、場所記憶研究の行動実験モデルとして非常に有用と考えられるが、ウサギ海馬・海馬周辺領域の神経結合関係は未だ殆ど調べられておらず、今後は更に例数を増やしてその詳細を明らかにしていきたい。

#### 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1件）

Honda Y, Furuta T, Kaneko T, Shibata H, Sasaki H. Patterns of axonal collateralization of single layer V cortical projection neurons in the rat presubiculum. J Comp Neurol 519: 1395-1412, 2011, 査読有

〔学会発表〕（計2件）

① 本多祥子、柴田秀史、佐々木宏、ウサギ前海馬台における、海馬台・傍海馬領域・脳梁膨大後部皮質からの入力、第88回に本生理学会・第116回に本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、2011. 3. 30, 誌上開催

② 本多祥子、古田貴寛、金子武嗣、柴田秀史、佐々木宏、ラット前海馬台における単一V層

錐体ニューロンの軸索分岐様式, 第33回日本  
神経科学大会・第53回日本神経化学会大会  
および第20回日本神経回路学会大会合同大  
会, 2010.9.2, 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本多 祥子 (HONDA YOSHIKO)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40287313