

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700413

研究課題名（和文） 視床運動核から皮質パルブアルブミン陽性ニューロンへの出力を形態学的に解析する

研究課題名（英文） Synaptic connections between thalamocortical projection neurons and parvalbumin-positive interneurons of the rat cerebral cortex

研究代表者

倉本 恵梨子（KURAMOTO ERIKO）

京都大学・大学院医学研究科・特定助教

研究者番号：60467470

研究成果の概要（和文）：ラット大脳皮質運動関連領野への視床入力には、視床前腹側核-外側腹側核（VA-VL）と内側腹側核（VM）からのものが存在する。我々は以前に、VA-VL核はさらに inhibitory input-dominant zone（IZ）と excitatory subcortical input-dominant zone（EZ）に分けられ、小脳からの情報はEZを経由し、基底核情報はIZを介して皮質に伝達されることを示し、さらにIZとEZで皮質投射様式が異なることを明らかにした。本研究では、IZと同様に基底核情報を担うVMについて検討し、1) VMには運動関連領野に主として投射するニューロンと、前頭前野に強く投射するニューロンの2群が存在する、2) VMニューロンの軸索の78%が皮質1層に分布したが、これはIZニューロンの54%よりも高率である、などの所見を得た。次に、高次運動関連領野と考えられる前頭前野と関連が深い、背内側核（MD）について調べた結果、57-97%の軸索が前頭前野の中間層に分布した。さらに、運動性視床核のニューロンから皮質パルブアルブミン陽性インターニューロンに対するシナプス入力の解析を行ったところ、一部の終末様構造が実際にシナプス結合の形成が可能なほど近接している部位が見つかった。

研究成果の概要（英文）：The rat motor thalamic nuclei are composed of ventral medial (VM), ventral anterior (VA) and ventral lateral nuclei (VL). Previously we reported that axonal arborization was different between the rostroventral and caudodorsal VA-VL neurons. In the present study, the axonal arborization of single VM neurons was examined and compared with the previous results of VA-VL neurons. In the cerebral cortex, the VM neurons sent axon fibers to more widespread cortical areas than VA-VL neurons. Of cortical layers, the axon fibers of VM neurons were most abundantly distributed in layer 1 (78%). In comparison with the previously reported data of rostroventral (54%) and caudodorsal VA-VL neurons (5.6%), VM neurons highly preferred layer 1 to other cortical layers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学

キーワード：神経回路網、視床-大脳皮質投射

1. 研究開始当初の背景

視床運動核 (VA 核、VL 核、VM 核) は大脳基底核と小脳から情報を受け大脳皮質へと伝達する。ラットやマウスでは細胞構築学的に VA 核と VL 核を区別できず、VA-VL 複合核として一塊に扱われていることもあり、神経回路の解析があまり進んでいない (Jones, 2007, *The thalamus*, 2nd ed.)。そこで以前、当研究室では、ラット視床運動核について調べ、

(1) 大脳基底核と小脳からの入力は、ほとんど収斂せず、VA-VL 複合核の別々の領域に分布し、化学的マーカーの GAD67 に対する免疫反応の違いから、これらの領域を区別することが可能であることを発見し、前者を inhibitory input-dominant zone (IZ) とし、後者を excitatory subcortical input-dominant zone (EZ) と区別した (Kuramoto et al., 2010,)。

(2) 当研究室で開発された新しい順行性トレーサーである Sindbis ウイルスベクターを用いて視床 VA-VL 核のニューロンから大脳皮質への投射軸索の形態を単一ニューロンレベルで解析し、皮質への投射軸索が、従来考えられていたカラム構造様の分布を示さず、一次運動野を中心として広範に領野を超えて分布していたこと、大脳基底核から入力を受けるニューロン (IZ ニューロン) は主に皮質 1 層へ投射するのに対し、小脳から入力を受けるニューロン (EZ ニューロン) は皮質中間層を中心に投射することなどを発見した (Kuramoto et al., 2009)。この発見は従来から考えられてきた視床-皮質投射の組み立てを大きく見直すべきであることを示唆している。

このように、VA-VL 核から皮質への投射において二種類の軸索投射様式が存在が明らかになった。それぞれ、機能が異なることは容易に想像できるが、では具体的にどんな機能かという点で難しい。なぜなら軸索投射先の大脳皮質のニューロンが可視化されておらず、どの種類のニューロンに情報伝達しているのか不明なためである。興奮性の錐体ニューロンと抑制性のインターニューロンのどちらに情報伝達するのかにより機能は大き

く変わるだろう。そこで本研究では「単一視床ニューロンの軸索を可視化するだけでなく、これを発展させて投射先の皮質ニューロンの樹状突起も、機能グループごとに可視化すれば、どの種類の、何個の皮質ニューロンに対して出力しているのか解析可能となり、より正確な機能の理解につながる」と考え、「from one to group」という研究戦略に思い至った。

本研究課題では、ある機能グループとして、皮質の抑制性ニューロンの中でも最も大きな割合を占めるパルブアルブミン陽性インターニューロン (PV ニューロン) を設定した。これは以下の二つの理由による。理由 1) 感覚野においては、4 層に分布する多くの PV ニューロンが視床から強い入力を受け、feedforward inhibition により情報処理の時間解像度および空間解像度を向上させていることが電気生理学的に示唆されている (Gabernet et al., 2005; Inoue and Imoto, 2006)。これに対して運動野の PV ニューロンは、ほとんど研究されていない。運動野でも感覚野と同様の重要な機能を果たしているのか、あるいは異なるのか、比較するという観点からも非常に興味深い。理由 2) 幸いにも当研究室において、PV ニューロンの樹状突起が特異的にゴルジ染色様に標識されたトランスジェニックマウス (PV マウス) の作製に成功しており、この PV マウスを用いることで、すぐに実験をスタートできる。

ラットの運動性視床核は VA-VL 核だけでなく、VM 核も含まれる。運動性視床ニューロンから PV ニューロンへの軸索投射について調べる前に、まずは VM 核のニューロンについて、単一細胞レベルで軸索投射の形態解析を行った。また、高次運動関連領野と考えられる MD 核についても、単一ニューロンレベルにおいて投射様式を解析した。その後、運動性視床ニューロンから PV ニューロンの細胞体や樹状突起へのシナプス入力の解析を行うことにした。

2. 研究の目的

複雑な随意運動の実現には大脳基底核と小脳による調節が重要であり、この調節は視床

運動核を介して行われている。このため、大脳基底核と小脳が実際に、どのような作動原理で大脳皮質運動野のニューロン活動を調節しているのかを理解するためには、視床運動核のニューロンが大脳皮質において、どんな種類の、何個のニューロンに情報を出力しているのか、すなわち視床-大脳皮質投射の神経回路の解明が欠かせないと考えられる。そこで、これを明らかにするため「from one to group」という研究戦略をたてた。つまり、1個の視床ニューロンの軸索から、大脳皮質の“ある機能グループ”に属するニューロン群の樹状突起へのシナプス結合特性を、網羅的、形態学的に解析し、その構造的特徴を読み解くことで、機能を推測する。本研究課題では、まず“ある機能グループ”を皮質パルブアルブミン陽性インターニューロンと設定し、このニューロン群に視床運動核ニューロンがどのように出力するのかを詳細に解析し、回路を明らかにすることを具体的な目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題では、「from one to group」という研究戦略で神経回路の詳細を明らかにする(図1)。



すなわち、単一の視床運動核ニューロンの投射軸索を Sindbis ウイルスベクターにより可視化し、さらに大脳皮質のパルブアルブミン陽性インターニューロン(PVニューロン)群の樹状突起を PV/myrGFP-LDLRct トランスジェニックマウス(PVマウス)を用いることで可視化し、運動性視床核ニューロンの投

射軸索がPVニューロンに対して、どのようにシナプス結合するのか、網羅的かつ定量的に形態の解析を行い、その構造的な特徴から機能を推測する。

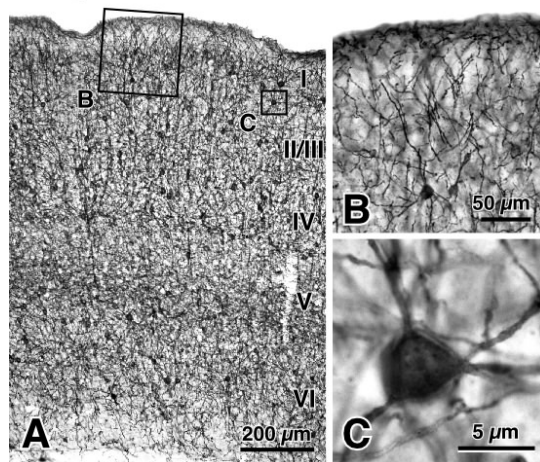
具体的な方法は以下の通りである。

1) パルブアルブミン陽性インターニューロン(PVニューロン)の樹状突起の可視化のため、PV/myrGFP-LDLRct トランスジェニックマウス(PVマウス)を用いる

これは当研究室において最近開発されたマウスで、PVニューロンの細胞体と樹状突起が特異的にレポータータンパク(各種シグナルが付加されたGFP; Kameda et al., 2008)により標識されており、抗GFP抗体を用いて免疫染色するとPVニューロンの樹状突起と細胞体を特異的に完全に可視化できる(図2)。

抗PV抗体を用いた免疫染色では、PVニューロンの樹状突起のみならず軸索も可視化されるので本研究の解析には適さず、また、樹状突起が完全に可視化できているかどうか不安もある。

図2; PVマウスの大脳皮質の染色像

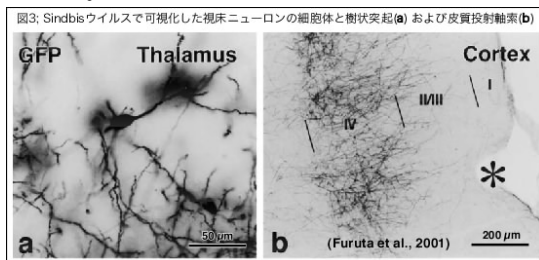


2) 単一の視床運動核のニューロンを標識するため、順行性トレーサーとして palRFP Sindbis ウイルスベクターを用いる。

従来から用いられてきた BDA などの順行性トレーサーは、注入量に比例して標識の強さが決まるため、少数のニューロンだけを標識するべく注入量を減らすと軸索末端までトレーサーが行き渡らないという問題を生じる。これに対し当研究室で開発された palRFP Sindbis ウイルスベクター

(Furuta et al., 2001; Nishino et al., 2008)

は、感染した細胞自身に大量の標識タンパク（膜移行シグナル付き赤色蛍光タンパク；palRFP）を強制発現させるため、感染しさえすれば1個のニューロンでも軸索末端まで強く標識できる、画期的な順行性トレーサである（図3）。この新しいツールにより、単一の長距離投射ニューロンを完全に可視化することが可能になり、ラット運動性視床核ニューロンの単一細胞レベルでの解析などに使用し、これまでの定説を覆す所見が得られてきている（Kuramoto et al., 2009; Matsuda et al., 2009）。また、単一ニューロン標識の手法として *in vivo* 細胞内染色法もあるが、高度なテクニックを要し修得が難しいのに対し、Sindbis ウイルスによる標識法は基本的な脳定位手術の技術を修得するだけで実施できることも重要な利点である。



実際の実験方法は以下の通り

- (1) 上述の palRFP Sindbis ウイルス液を適切な濃度に希釈し、PV マウスの運動性視床核に圧注入することで、単一の視床ニューロンが完全に RFP 標識され、さらに PV ニューロンの樹状突起が GFP 標識された脳サンプルを作製する。
 - (2) この脳を連続切片にし、ウイルス注入部位を含む切片を蛍光顕微鏡下で観察し、RFP 標識された細胞体を含む切片を見つけ出す。この切片を蛍光ニッスル染色、および抗 GAD67 抗体で対照染色し、視床運動核 (VA 核, VL 核, VM 核) のニューロンかどうか同定する。
 - (3) 抗 RFP 抗体を用いた免疫組織化学染色法により単一視床ニューロンの樹状突起および軸索を DAB-Ni で黒く染色し、抗 GFP 抗体を用いて PV ニューロンの樹状突起を TAPM で赤く染色する。
- 上述のようにして得られたサンプルを観察し、単一視床ニューロン由来の軸索終末のう

ち、何%が大脳皮質の PV ニューロンに入力するのか、また、何個の PV ニューロンに入力するのか、網羅的かつ定量的に形態を解析し、その構造的特徴から機能を推測する

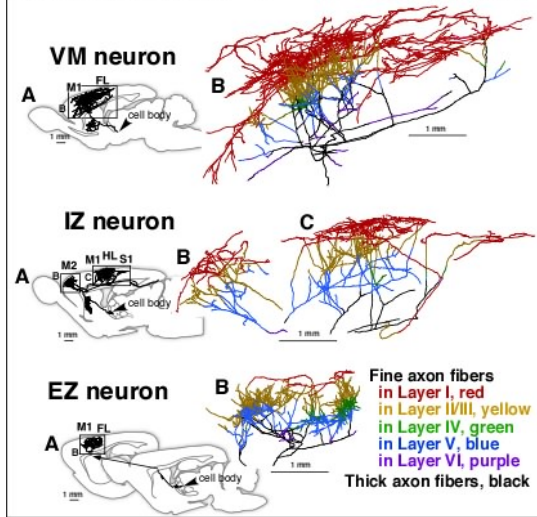
- (1) 明視野顕微鏡に装着したニューロロシダを用いて、単一視床ニューロン由来の軸索を三次元再構築し、さらに、その軸索上の終末様構造の分布もプロットする。
- (2) 全ての終末様構造のうち何%が、PV ニューロンの樹状突起とシナプス形成が可能な距離まで近接（アポジション）しているのか、大脳皮質の6層構造のうち、どこに分布しているのか、PV ニューロンの樹状突起の遠位と近位、どちらにアポジションしているか、など詳細に解析する。
- (3) 入力の手側の PV ニューロンの樹状突起についても三次元再構築を行い、単一視床ニューロンから何個の PV ニューロンに入力するのかを解析する。
- (4) 免疫電子顕微鏡法により、アポジションと判断した終末様構造のうち、何%のものが実際に PV ニューロンとシナプスを形成していたのか、明らかにする

4. 研究成果

ラット大脳皮質運動関連領野への視床入力には、視床前腹側核-外側腹側核 (VA-VL) と内側腹側核 (VM) からのものが存在する。我々は以前に、VA-VL 核が inhibitory input-dominant zone (IZ) と excitatory subcortical input-dominant zone (EZ) に分けられ、小脳からの情報は EZ を経由し、基底核情報は IZ を介して皮質に伝達されることを示した。そして Sindbis ウイルスを用いて視床皮質投射を単一細胞レベルで調べたところ、IZ ニューロンは主に皮質1層へ matrix type の入力を送るのに対して、EZ ニューロンは core type として皮質中間層に強く入力するという特徴を有し、さらに IZ, EZ ともに単一細胞レベルで運動関連領野に広く入力して皮質カラム構造を反映しないことを指摘した。本研究では、IZ と同様に基底核情報を担う VM について検討し、1) VM には運動関連領野に主として投射するニューロンと、前頭前野、特に眼窩野/前帯状野に強く投射するニューロンの2群が存在する、2)

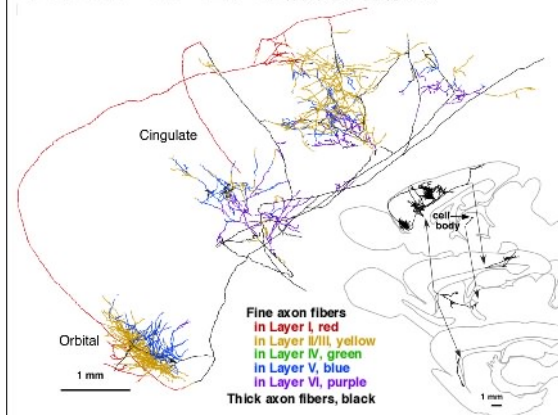
VM ニューロンの軸索の 78%が皮質 1 層に分布し、matrix type の入力を示したが、これは IZ ニューロンの 54%よりも高率である、などの所見を得た。この結果は、国際雑誌に論文として発表する予定で、現在、再投稿中である(図 3)。

図 3; 運動性視床核ニューロンの軸索投射様式



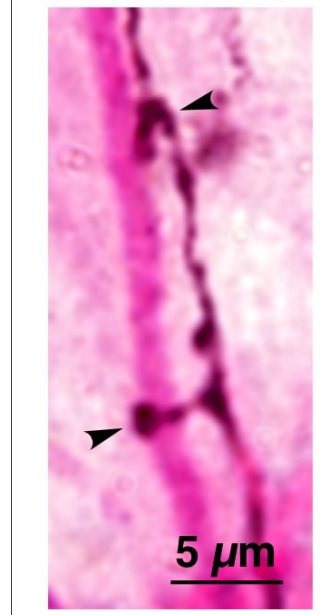
次に、高次運動関連領域と考えられる前頭前野と関連が深い、背内側核 (MD) についても同様の手法で調べた結果、57-97%の軸索が前頭前野の中間層に分布した(図 4)。このことから、前頭前野は VM から matrix type の入力を、MD から core type の入力を受けることが判明した。この結果は学会発表し、また、もう少しサンプル数増やし論文としてまとめる予定である。

図4: MDニューロンの軸索投射様式



さらに、VA-VL 核から皮質パルブアルブミン陽性インターニューロンに対するシナプス入力解析を行ったところ、一部の軸索終末様構造が実際にシナプス結合の形成が可能ほど近接している部位が見つかった(図 5; 黒色が DAB-Ni で染色した視床由来の軸索、ピンク色が TAPM で染色した PV マウスの樹状突起)。このように、単一の視床ニューロンの軸索を完全に可視化し、加えて情報伝達をする相手のニューロンの樹状突起、細胞体を完全に可視化する手法を確立することができたので、今後はさらに実験を重ねてデータ解析を進めていく予定である。

図 5; PVニューロンの樹状突起にアポジションするVA-VLニューロン由来の軸索終末様構造



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 3 件)

(1) Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H, Shon J, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T. Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. The Journal of Neuroscience, 査読あり vol. 33 (no. 2) 2013, 544-555 DOI:10.1523/JNEUROSCI.1255-12.2013.

(2) Ohno s, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. Morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: A single neuron tracing study with viral vectors. Cerebral Cortex, 査読あり vol. 22 2012, 2840-2857 DOI:10.1093/cercor/bhr356.

(3) 倉本恵梨子、古田貴寛、日置寛之、藤山文乃、金子武嗣、シンドビスウイルスベクターを用いた新しい単一神経細胞標識法-運動性視床核ニューロンの完全再構築を例として Novel Single-Neuron-Tracing Method Using Sindbis Viral Vectors. 顕微鏡 査読あり vol.46 (no.2) 2011, 125-131

[学会発表] (計 7 件)

(1) 倉本恵梨子、日置寛之、金子武嗣、マウス大脳皮質の運動関連領野における錐体ニューロンからパルブアルブミン陽性インターニューロンへの入力、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20 日 (木)、国立京都国際会館

(2) 倉本恵梨子、藩世秀、大野幸、田中康裕、雲財知、古田貴寛、日置寛之、中村公一、藤山文乃、金子武嗣、運動性視床皮質投射の神経回路、第 45 回神経解剖懇話会シンポジウム「単一ニューロン標識法と神経回路の解析」(第 118 回日本解剖学会・全国学術集会)、2013 年 3 月 28 日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場

(3) 倉本恵梨子、藩世秀、古田貴寛、日置寛之、金子武嗣、ラット視床 MD ニューロンの軸索投射様式を単一細胞レベルで解析する、第 88 回日本解剖学会近畿支部学術集会、2012 年 12 月 1 日 (土)、神戸大学滝川記念学術交流会館

(4) 倉本恵梨子、藩世秀、古田貴寛、日置寛之、金子武嗣、Single-neuron-tracing study of thalamocortical projections arising from the rat mediodorsal nucleus by using a Sindbis viral vector. 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日 ()、名古屋国際会議場

(5) 倉本恵梨子、藩世秀、古田貴寛、日置寛之、金子武嗣、Single-neuron-tracing study of thalamocortical projections arising from the rat mediodorsal nucleus. 第 117 回日本解剖学会・全国学術集会、2012 年 3 月 26 日 (月)、山梨大学

(6) 倉本恵梨子、大野幸、藤山文乃、古田貴寛、雲財知、田中康裕、金子武嗣、ラット運動性視床核の皮質投射：単一ニューロンの形態学的解析、第 87 回日本解剖学会近畿支部学術集会、2011 年 12 月 3 日 (土)、兵庫医科大学

(7) 倉本恵梨子、大野幸、藤山文乃、古田貴寛、雲財知、日置寛之、田中康裕、金子武嗣、ラット視床内側腹側核ニューロンの軸索投射-シンドビスウイルスベクターを用いた単一ニューロンレベルでの解析、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日 (土)、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉本 恵梨子 (KURAMOTO ERIKO)

京都大学・大学院医学研究科・特定助教

研究者番号：60467470