

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830034

研究課題名(和文) 梨状葉皮質の興奮性ニューロンからパルブアルブミン陽性ニューロンへの出力の形態計測

研究課題名(英文) Local connections of excitatory neurons to parvalbumin-containing interneurons in cerebral cortex of mice.

研究代表者

倉本 恵梨子 (Kuramoto, Eriko)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60467470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質を構成するニューロンは興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの2種類からなる。抑制性ニューロンはさらに3つのグループに分類され、中でも最も大きな割合を占めるのが、パルブアルブミン陽性インターニューロンである。本研究ではパルブアルブミン陽性ニューロンの作動原理解明を目指し、パルブアルブミン陽性ニューロンがGFPを発現するトランスジェニックマウスと細胞内記録染色法を組み合わせ、どの興奮性ニューロンがパルブアルブミン陽性ニューロンに対して強く入力しているのかを明らかにした。第2～5層の興奮性ニューロンに比べ、第6層の興奮性ニューロンは有意に強くパルブアルブミン陽性ニューロンに情報を送っていた。

研究成果の概要(英文)：Parvalbumin (PV)-positive neurons are the largest subpopulation of cortical GABAergic interneurons. For understanding the role of PV neurons, it is important to reveal the driver input of the interneurons.

In the present study, we morphologically investigated local excitatory inputs to PV neurons in the cerebral cortex, using the transgenic mice in which the dendrites and cell bodies of PV neurons were specifically labeled with GFP. In cortical slices from the transgenic mice, single pyramidal neurons were intracellularly labeled with biocytin. We reconstructed the axon fibers of pyramidal neurons and counted the number of appositions formed between the axon fibers of each pyramidal neuron and the input sites of PV neurons. The relative frequencies of appositions formed by layer (L) 2-5 and L6 pyramidal neurons were 14% and 23%, respectively, of the entire axon varicosities, suggesting a difference in the local excitatory control of PV neurons between L2-5 and L6 pyramidal neurons.

研究分野：神経解剖

キーワード：パルブアルブミン陽性ニューロン 大脳皮質 インターニューロン 興奮性ニューロン 細胞内記録染色法 Layer 6 皮質-視床投射ニューロン ラット

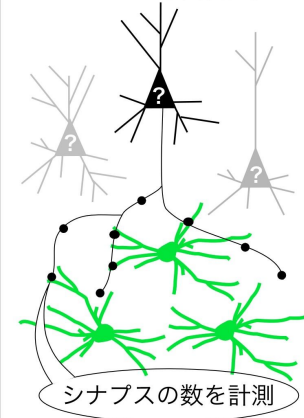
1. 研究開始当初の背景

大脳皮質を構成するニューロンは、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの2種類に分類される。抑制性ニューロンは大脳皮質内の局所神経回路において、周囲のニューロンを抑制することにより、皮質の活動を適切に調節している。抑制性ニューロンは形態学的、分子生物学的、電気生理学的な特徴から大きく3つのグループに分けられ、そのうち最も大きな割合を占めるのが、パルプアルブミン陽性インターニューロンである。近年、認知や情報の統合、といった高次脳機能発現のメカニズムとして注目を集めている、ガンマ振動の生成に、パルプアルブミン陽性インターニューロンが必須であること、また、統合失調症や、てんかんなどの精神神経疾患においてパルプアルブミン陽性ニューロンの異常がみられることなどが報告されている。ガンマ振動生成のメカニズムを理解し、パルプアルブミンニューロンの異常が原因となっている疾患の病態解明、治療法を開発するためには、パルプアルブミン陽性インターニューロンが大脳皮質内で形成している局所神経回路の詳細を明らかにすることが必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、パルプアルブミン陽性インターニューロンの機能の解明を目指し、パルプアルブミン陽性インターニューロンが形成する局所神経回路の詳細を明らかにすることを目的に行った。すなわち、パルプアルブミン陽性インターニューロンがどの種類の興奮性ニューロンから強く入力を受けて、発火するのかを、網羅的かつ定量的に形態解析した。大脳皮質は、皮質-皮質間の興奮性入力と、視床-皮質投射軸索由来の興奮性入力の2種類が存在することが知られている。先行研究により、パルプアルブミン陽性インターニューロンは皮質の興奮性ニューロンからの入力も、視床から皮質への興奮性投射入力の、どちらの入力も受けていることが、報告されているが、数多く入力していたのは、皮質の興奮性ニューロン由来のものであった (Kameda et al., 2008)。大脳皮質は、Layer 1 から Layer 6 までの6層構造からなり、それぞれが

図1: どの興奮性ニューロンがPVニューロンに強く入力する?



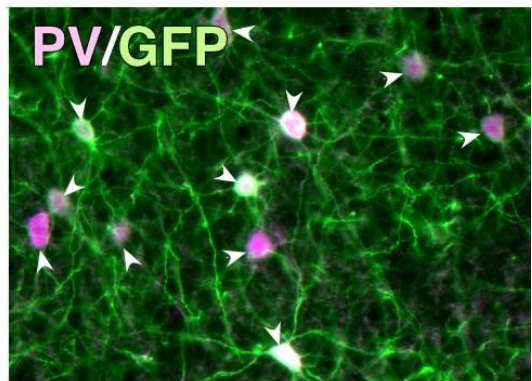
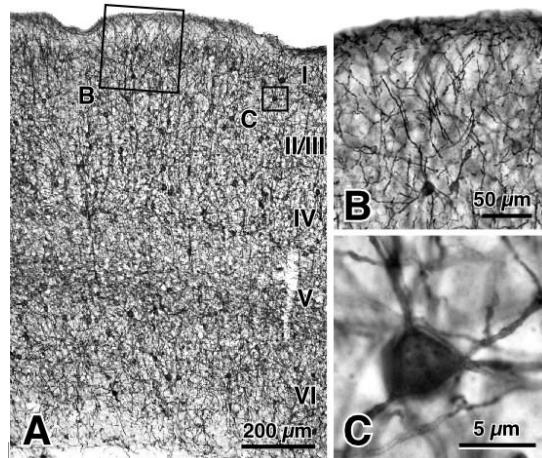
の、どちらの入力も受けていることが、報告されているが、数多く入力していたのは、皮質の興奮性ニューロン由来のものであった (Kameda et al., 2008)。大脳皮質は、Layer 1 から Layer 6 までの6層構造からなり、それぞれが

異なる脳領域と入出力関係を持つことから、層ごとに果たしている機能が異なる。本研究では、先行研究よりも詳細な解析を行い、パルプアルブミン陽性インターニューロンが、大脳皮質の第何層の興奮性ニューロンから一番強く入力を受けて、発火するのか、形態学的な解析を行い、パルプアルブミン陽性インターニューロンが大脳皮質の局所神経回路で果たしている機能の解明を目指した(図1)。

3. 研究の方法

本研究では、パルプアルブミン陽性インターニューロンの細胞膜と樹状突起膜が特異的に、GFPにより標識されたトランスジェニックマウス(PV/myrGFP-LDLRct トランスジェニックマウス: PVマウス)を用いた(図2)。

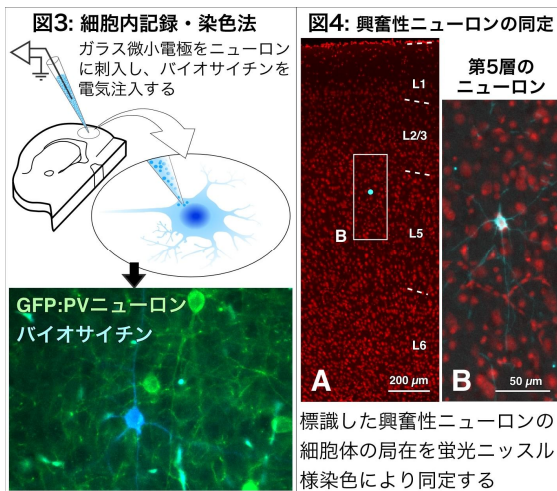
図2; PVマウスの大脳皮質の染色像



PVニューロンの細胞体・樹状突起が特異的にGFPで標識されている

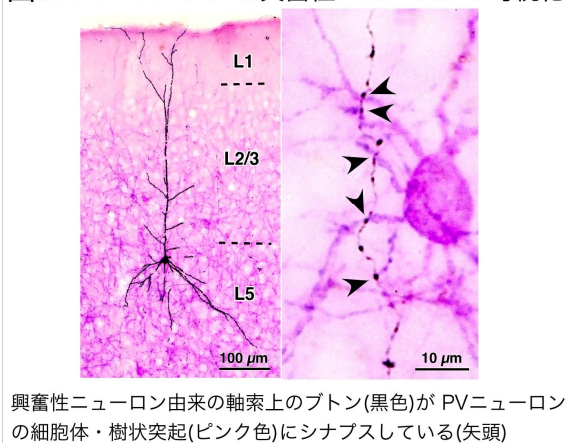
これは京都大学大学院医学研究科 高次脳形態学教室において最近開発されたマウスで、パルプアルブミン陽性ニューロンの細胞体と樹状突起が特異的にレポータータンパクの myrGFP-LDLRct (N末端に myristoylation シグナルが付加されており、翻訳直後に脂質修飾を受け、細胞膜の直下に GFP が局在する。さらに C 末端には low density lipoprotein receptor の C 末配列が付加されており、GFP

を細胞体・樹状突起に局在させる; Kameda et al., 2008)により標識されている。このマウスより、厚さ 500 μm の新鮮脳スライス標本を作製し、細胞内記録染色法により、大脳皮質の単一の興奮性ニューロンの電気生理学的記録をとり、さらにバイオサイチンを注入し、記録したニューロンを標識した。バイオサイチンを注入した興奮性ニューロンが、大脳皮質の何層のニューロンに属するのかを同定するため、ストレプトアビジン-Marina Blue でバイオサイチンの局在を可視化し、さらに Propidium Iodide を用いて蛍光ニッスル様染色を行った (図 3,4)。



興奮性ニューロンの局在を同定後、バイオサイチンに avidin-biotinylated peroxidase complex, DAB-Ni を反応させ、興奮性ニューロンの樹状突起から軸索末端まで、黒く染色した。さらに、GFP に対する抗体を用いた免疫染色法により、パルプアルブミン陽性インターニューロンの細胞体と樹状突起を特異的に、ピンク色に発色した (図 5)。

図5: PVニューロンと興奮性ニューロンの可視化



作製した標本を、以下の要領で形態計測した。

(1) 大脳皮質の単一興奮性ニューロンの軸索についてカメラルシダを用いて二次元平面に再構築し、さらに、その軸索上の終末様構造の分布もプロットした。

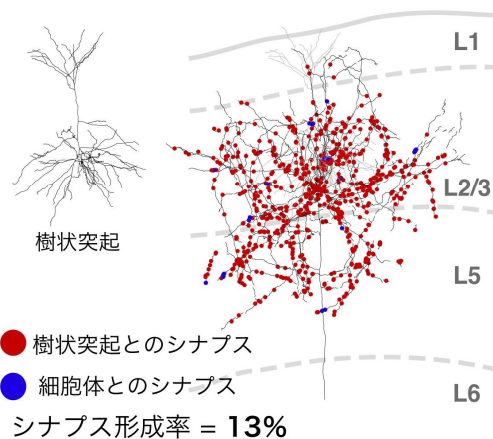
(2) すべての終末様構造のうち、パルプアルブミン陽性インターニューロンの樹状突起とシナプスを形成可能なほど近接 (アポジション) している終末様構造は何%を占めるのか、また、大脳皮質の6層構造のうち、どこに分布しているのか、など詳細な形態解析を行った。

(3) 光学顕微鏡でアポジションと判断した部位のうち、何%のものが実際にシナプスを形成しているか、免疫電子顕微鏡法により確認した。

4. 研究成果

細胞内染色法により標識した興奮性ニューロンの軸索上のすべての軸索終末様構造のうち、パルプアルブミン陽性インターニューロンの細胞体・樹状突起とアポジションを形成していた軸索終末様構造の割合は、第2/3層、4層、5層の興奮性ニューロン由来のものが約14%であったのに対し、第6層の興奮性ニューロン由来のブトンは約23%と、高い割合でパルプアルブミン陽性インターニューロンにシナプスを形成していた(図6,7)。つまり、第6層の興奮性ニューロンは、他の興奮性ニューロンに比べ、1.6倍強くパルプアルブミン陽性インターニューロンに情報入力し、強く興奮させることがわかった。

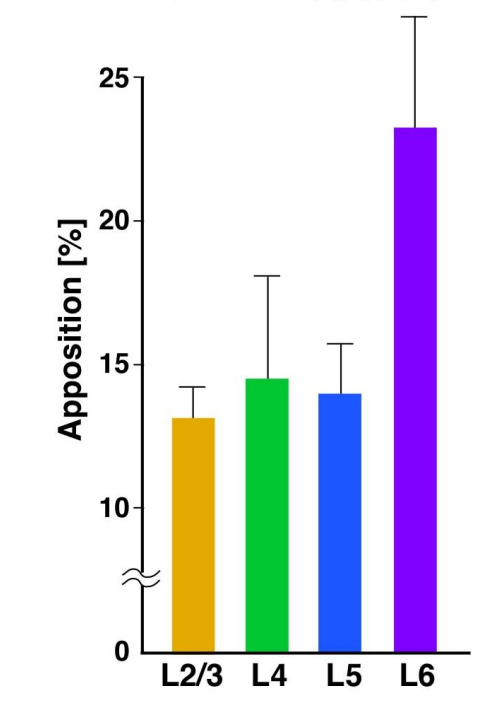
図6: 軸索再構築とシナプス解析



第6層の興奮性ニューロンは、皮質深層に分布するパルプアルブミン陽性インターニューロンに強い興奮性の情報入力を送ることがわかった。先行研究で、深層のパルプアルブミン陽性インターニューロンは皮質の全層にわたって豊富に軸索分岐することが知られており、周囲の多数のニューロンを同時に抑制し、皮質活動の同期に働くことが報告されている。今回、明らかになった、第6層の興奮性ニューロンから深層のパルプ

ルブミン陽性インターニューロンを介して
広範囲の皮質活動を同期させる神経回路は、
複雑な運動を行う際に、多数の筋を協調して
動員するために重要な役割を果たしている
ことが示唆された。

図7: 各層の平均の
シナプス形成率



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2件)

Kuramoto E, Ohno S, Furuta T, Unzai T,
Tanaka YR, Hioki H, Kaneko T.
Ventral medial nucleus neurons send
thalamocortical afferents more widely and more
preferentially to layer 1 than neurons of the
ventral anterior-ventral lateral nuclear complex in
the rat. *Cerebral Cortex* 2015 **25**(1):221-235.
doi: 10.1093/cercor/bht216.
査読あり.

Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A,
Sonomura T, Uemura M, Goto T.
Ascending parabrachio-thalamo-striatal
pathways: Potential circuits for integration of
gustatory and oral motor functions. 2015,
Neuroscience **294**: 1-13.
doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.045.
査読あり.

〔学会発表〕(計3件)

国内学会 シンポジウム

倉本恵梨子

視床-皮質投射の単一細胞レベルでの形態解
析から見えてきた、視床ニューロンの分類と
その機能

第120回日本解剖学会全国学術集会
2015年3月23日 神戸国際会議場(兵庫県
神戸市)

国内学会 一般発表

倉本恵梨子、日置寛之、田中康裕、山中
淳之、岩井治樹、大野幸、金子武嗣、後藤哲
哉

マウス大脳新皮質の運動野における興奮性
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 の定量解析
第70回日本解剖学会 九州支部学術集会
2014年10月25日 産業医科大学(福岡県
北九州市)

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域における錐体
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20-21日、京都国際会議場(京
都府 京都市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ana1.hal.kagoshima-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉本 恵梨子 (KURAMOTO, Eriko)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科
助教

研究者番号: 60467470