

論文の内容の要旨

論文題目 **Analysis of Perisomatic-targeting Granule Cells in the Mouse**

Olfactory Bulb

和訳 マウス嗅球において投射ニューロンの細胞体特異的に抑制性
 シナプスを形成する顆粒細胞の解析

指導教員 森 憲作 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月 進学

医学博士課程

機能生物学専攻

成塚 裕美

近年、大脳皮質や海馬の抑制性介在ニューロンには、異なる形態や電気生理学的性質を持つサブタイプが存在することが明らかになっており、これらのサブタイプが統合的に働くことで、回路内での情報処理が行われていると考えられている。特に抑制性介在ニューロンを、投射ニューロンの樹状突起に抑制をかけるサブタイプ（以下、**dendritic-targeting** タイプと表記）と、細胞体や **axon hillock** に特異的に抑制をかけるサブタイプ（以下 **perisomatic-targeting** タイプと表記）に分類し、その機能を電気生理学的手法によって解析した研究から重要な知見が得られている。例えば、海馬の **perisomatic-targeting** タイプの抑制性介在ニューロンは、投射ニューロンの発火を直接的に制御することで、投射ニューロン群の同期的あるいは周期的な発火パターンへの寄与が示唆されている。一方、**dendritic-targeting** タイプの抑制性介在ニューロンは、投

射ニューロンへの興奮性の入力を局所的に修飾していると考えられている。以上のように、異なるサブタイプの抑制性介在ニューロンを同定し、その形態や電気生理学的性質、機能を明らかにすることは、回路内での情報処理を解明する上で重要である。一方、嗅覚系の一次中枢である嗅球の抑制性介在ニューロンについては、**dendritic-targeting** タイプと **perisomatic-targeting** タイプといったサブタイプの分類や、その機能分化に関する知見はこれまで乏しかった。

嗅球神経回路は、僧帽細胞や房飾細胞という投射ニューロンと、傍糸球細胞や顆粒細胞に代表される抑制性介在ニューロンから成る。嗅球は浅層から順に、嗅細胞の軸索が投射ニューロンの主樹状突起とシナプスを形成する糸球層、僧帽/房飾細胞の樹状突起や房飾細胞の細胞体のある外叢状層、僧帽細胞の細胞体のある僧帽細胞層、房飾細胞の軸索側枝が走る内叢状層、顆粒細胞の細胞体が位置する顆粒細胞層という層構造を示す(図 1)。顆粒細胞は、嗅球の主要な抑制性介在ニューロンであり、軸索を持たない無軸索細胞である。これまで知られている顆粒細胞は、樹状突起を外叢状層まで伸ばしてスパインを形成し、顆粒細胞から投射ニューロンへの抑制性シナプスと、投射ニューロンから顆粒細胞への興奮性シナプスから構成される双方向性のシナプスを形成している(図 1)。従って、既知の顆粒細胞は**dendritic-targeting**タイプの細胞であると言える。**dendritic-targeting**顆粒細胞は、投射ニューロンの側方抑制や同期的・周期的発火に重要な役割を持つと考えられている。一方、**perisomatic-targeting**タイプの抑制性介在ニューロンは嗅球では報告されておらず、抑制性介在ニューロンの**dendritic-targeting**タイプと **perisomatic-targeting** タイプへの機能分化については不明であった。

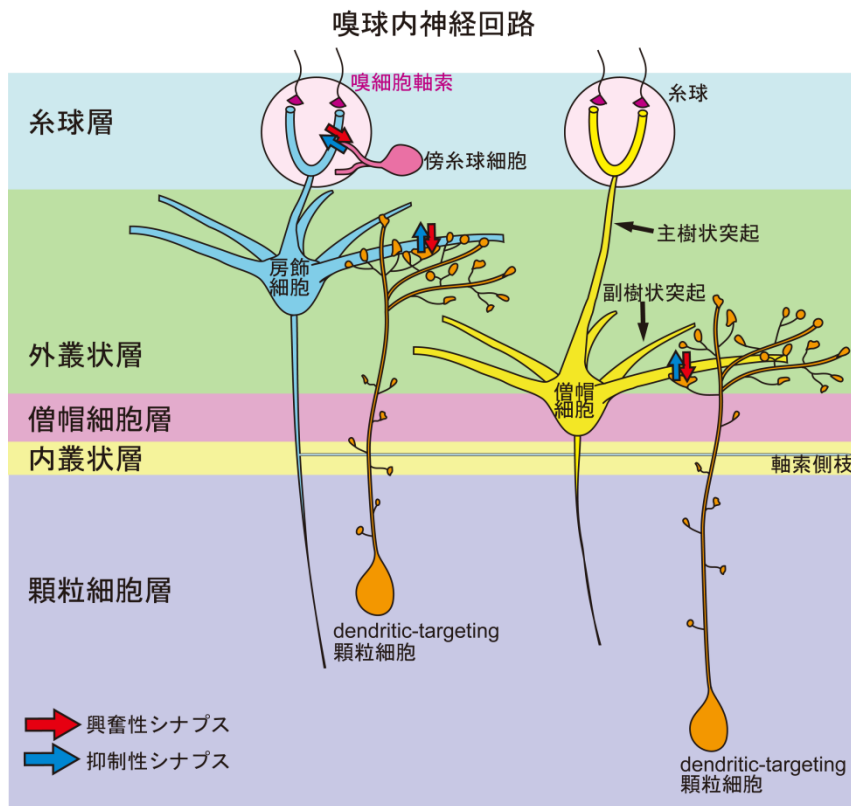


図 1. 嗅球神経回路の模式図. 嗅球神経回路は、僧帽細胞や房飾細胞といった投射ニューロンと抑制性介在ニューロンから成る. 顆粒細胞は嗅球における主要な抑制性介在ニューロンで、既知の顆粒細胞は投射ニューロンの樹状突起と双方向性のシナプスを形成する dendritic-targeting タイプの細胞である.

我々の研究室では以前、成体の嗅覚系における神経新生を観察する為に、未分化な神経細胞に発現する nestin 遺伝子のプロモーターの制御下に GFP を発現する遺伝子改変マウスを作製した。このマウスの成体嗅球における顆粒細胞層を観察したところ、弱く GFP を発現する新生細胞に加え、より強く GFP を発現する細胞が観察された（便宜上この細胞を”type S cell”と読んでいる；Sは strong GFP の略）（図 2A, B）。type S cell は、nestin を弱く発現しているものの、NeuN や GAD67 を発現し、スパインを有する長い樹状突起を持っていた。また、既知の顆粒細胞と同様に、軸索は観察されなかった。これらの形態的特徴から、type S cell は nestin を発現するものの、例外的に成熟した顆粒細胞であると考えられた。興味深いことに、type S cell の樹状突起の先端は、投射ニューロンの樹状突起が走行する外叢状層まで伸びておらず、僧帽細胞層でとどまっていた（図 2C）。

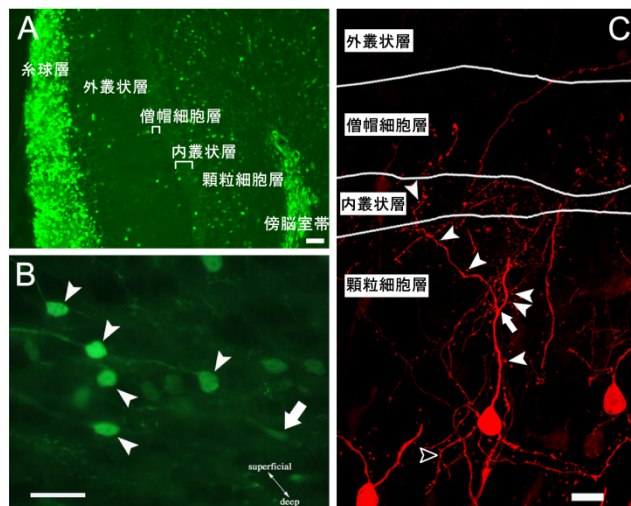


図 2. nestin-promoter GFP マウスの嗅球で観察された type S cell. (A) nestin-promoter GFP マウスの嗅球における GFP 陽性細胞の分布(冠状切片) (B) 2 種の GFP 陽性細胞: GFP を弱く発現する幼弱な移動細胞(矢印)と GFP を強く発現する type S cell (矢頭). (C) GFP 抗体によって標識された type S cell. 樹状突起は顆粒細胞層で分岐し(矢印)、顆粒細胞層、内叢状層、僧帽細胞層でスパイン(矢頭)を形成するが、外叢状層には入っていない. 開矢印は基底樹状突起を示す. スケールバー: 50μm (A), 20μm (B), 10μm (C).

詳細な形態な形態解析の為に、色素を細胞内に注入して単一 type S cell や既知の顆粒細胞を標識した (図 3A-D)。その結果、type S cell の樹状突起の先端には巨大な球状構造があり、僧帽細胞の細胞体や axon hillock 付近に特異的に接触させていることが明らかになった (図 3B-D)。この球状構造は axonal bouton に似ていることから”dendritic bouton”と呼ぶことにした。

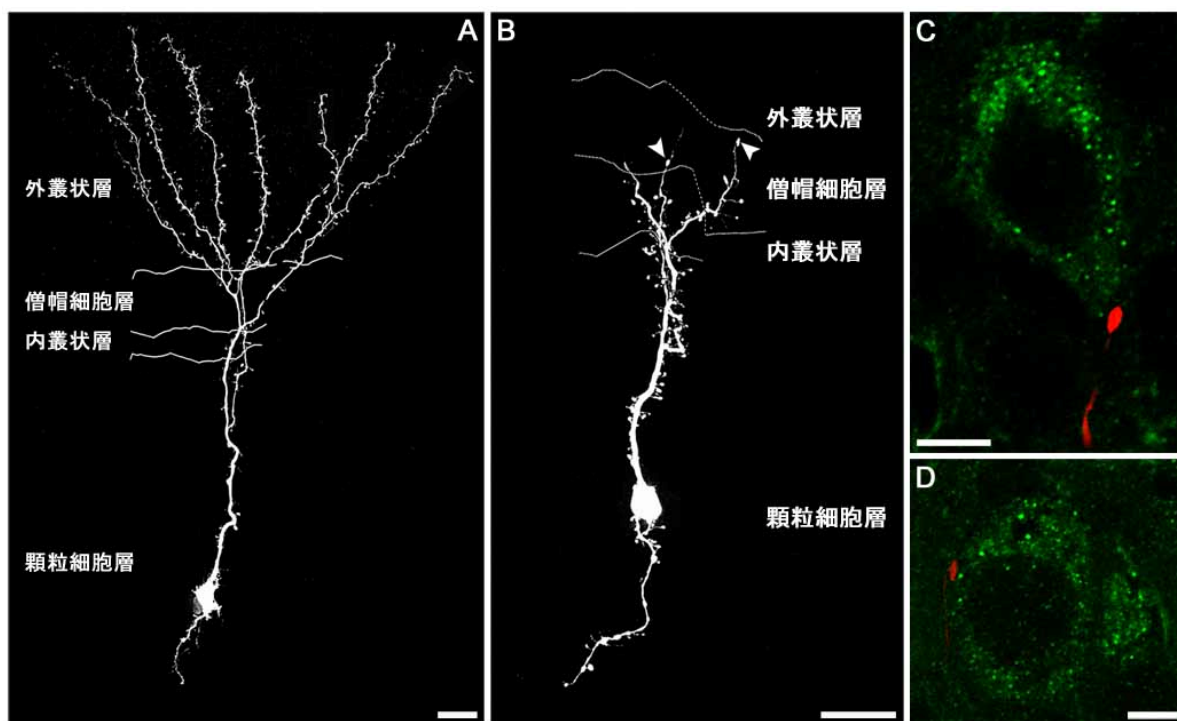


図 3. ルンファーイエローによって標識された dendritic-targeting 顆粒細胞と type S cell. (A) 標識された dendritic-targeting 顆粒細胞. (B) 標識された type S cell. 僧帽細胞層に位置する樹状突起先端には巨大な球状構造が観察される(dendritic bouton; 矢頭). 一番左側の樹状突起はスライス作成時に切断された. (C, D) B の中央と右側のそれぞれの dendritic bouton の単一面コンフォーカル画像. type S cell の樹状突起は赤で、僧帽細胞の細胞体は緑で示されている. スケールバー: 20μm (A, B), 5μm (C, D).

また、野生型マウスの嗅球の顆粒細胞をランダムに標識した結果、樹状突起の先端に dendritic bouton を持ち、僧帽細胞の細胞体に接触させている type S cell 様の細胞が観察された。これにより、トランスジェニックマウスで同定された type S cell が野生型マウスにも存在することが確認された。

次に、type S cell のシナプス入出力の場として dendritic bouton に注目し、GFP 抗体を用いた免疫電顕による解析を行った。その結果、type S cell の dendritic bouton から僧帽細胞の細胞体近傍への対称性シナプスと、僧帽細胞の細胞体から type S cell 側への非対称性シナプスが近接して観察された (図 4A-E)。従って、type S cell は僧帽細胞の細胞体近傍とシナプスを形成する perisomatic-targeting タイプの顆粒細胞であると言える。電顕解析の結果から、type S cell の dendritic bouton は僧帽細胞の細胞体近傍から興奮性入力を受け取り、同一の細胞体へ抑制性出力を出していると考えられる。

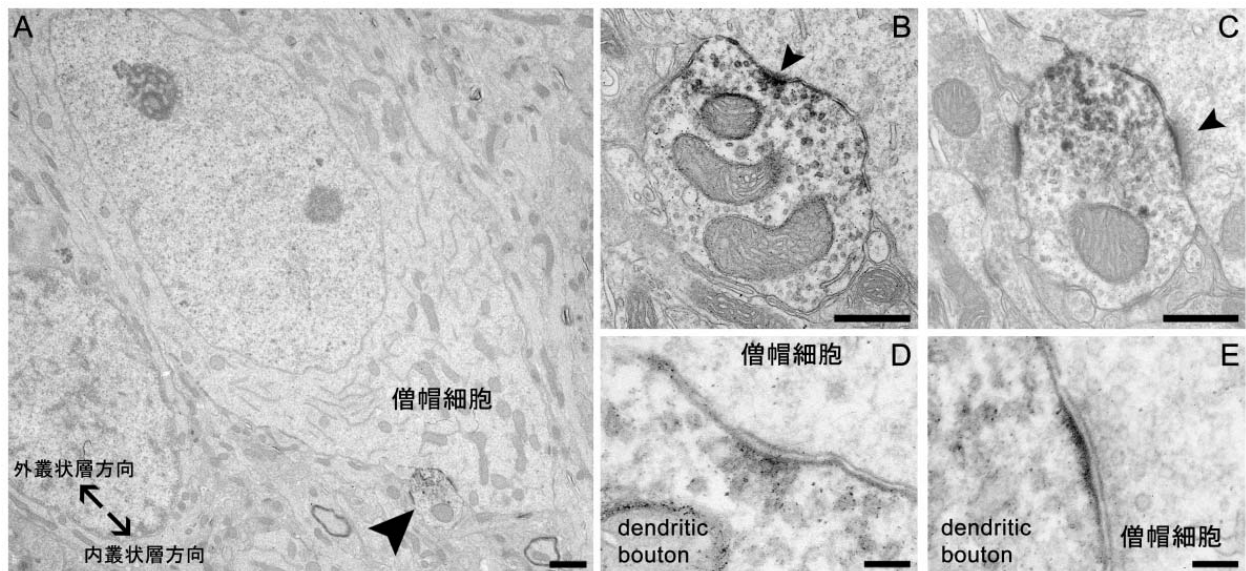


図 4. 電子顕微鏡による type S cell の dendritic bouton の解析. (A) GFP 陽性の dendritic bouton (矢頭) が僧帽細胞の細胞体深部に接している. (B, C) A の dendritic bouton の高倍写真. B, C のそれぞれは、同一構造の異なる断面を示している. dendritic bouton 側から僧帽細胞の細胞体側への対称性シナプス (B の矢頭, D に高倍の図) と、僧帽細胞の細胞体側から dendritic bouton 側への非対称性シナプス (C の矢頭, E に高倍の図) が観察される. スケールバー: 1 μ m (A), 500nm (B, C), 100nm (D, E).

type S cell の割合は全顆粒細胞の約 3.4%と少数だが、顆粒細胞の数は僧帽細胞の数百倍と見積もられており、個々の僧帽細胞へ dendritic bouton を接触させるのに十分な type S cell が存在すると予想された。実際、約 87%の僧帽細胞において、細胞体近傍に少なくとも 1 つ以上の GFP 陽性の dendritic bouton が観察された。また、細胞内注入で標識した type S cell のうち約 70%のものが、少なくとも 1 つ以上の dendritic bouton を僧帽細胞の細胞体近傍に接触させていた。多数の僧帽細胞において、type S cell の dendritic bouton との接触が観察されたことから、type S cell は嗅球神経回路における情報処理において重要な役割を担っていると予想される。

細胞内注入によって標識された単一の type S cell は、互いに近傍に位置する少数の僧帽細胞に dendritic bouton を接触させていた。これは、広範囲に位置する多数の僧帽細胞とシナプスを形成する dendritic-targeting 顆粒細胞とは対照的であり、それぞれのサブタイプによる抑制が、異なる情報処理を行っている可能性を示している（図 5C）。

dendritic-targeting 顆粒細胞には、外叢状層におけるスパイン形成の場所が異なるサブタイプが存在し、これらのサブタイプ間では、顆粒細胞層内での細胞体の位置も異なることが報告されている。外叢状層の上層で樹状突起を分岐させてスパインを形成するサブタイプは、その細胞体が顆粒細胞層の上層に位置する傾向がある。一方、外叢状層の下層でスパインを形成するサブタイプは、その細胞体が顆粒細胞層の下層に位置する傾向がある。新規に同定された type S cell は、僧帽細胞層に選択的に樹状突起を投射するが、その細胞体が顆粒細胞層の特定の部位に位置するかを調べたところ、顆粒細胞層の中でも上層と下層の間の中間層に選択的に位置していた。

さらに申請者は、type S cell と dendritic-targeting 顆粒細胞では、樹状突起の性質も異なることを明らかにした。フィロポディアは細長く運動性の高い構造で、シナプスや神経回路の

形成に重要であると考えられている構造であるが、成体マウスにおいても **dendritic-targeting** 顆粒細胞では、全てのスパインとフィロポディアのうち、フィロポディアの占める割合は約 28%と高かった。一方、**type S cell** では、フィロポディアの割合が約 9%と低かった。また、**headed spine** の形状に注目すると、**dendritic-targeting** 顆粒細胞のものはサイズや大きさにばらつきがあるが、**type S cell** ではその多くが球状であり、サイズも比較的一様であった。このことから、**dendritic-targeting** 顆粒細胞の樹状突起は可塑的な性質を持つのに対し、**type S cell** の樹状突起は比較的安定した構造を持つと予想される。

申請者は、本研究において、嗅球の顆粒細胞が形態的に **dendritic-targeting** と **perisomatic-targeting** のサブタイプに分化していることを明らかにした（図 5A）。**dendritic-targeting** 顆粒細胞はそのシナプス部位から、投射ニューロンの活動を局所的に調節し、多数の投射ニューロン間の同期・周期的活動の生成に関わっていると考えられる（図 5B, C）。一方、**type S cell** は、僧帽細胞の細胞体近傍に抑制をかけることで、僧帽細胞の発火そのものを制御している可能性がある（図 5B, C）。このように、本研究により、嗅球顆粒細胞は **dendritic-targeting** や **perisomatic-targeting** タイプに機能分化しており、両サブタイプの統合的な働きが嗅球神経回路内の情報処理において、重要な役割を果たしている可能性が示された。

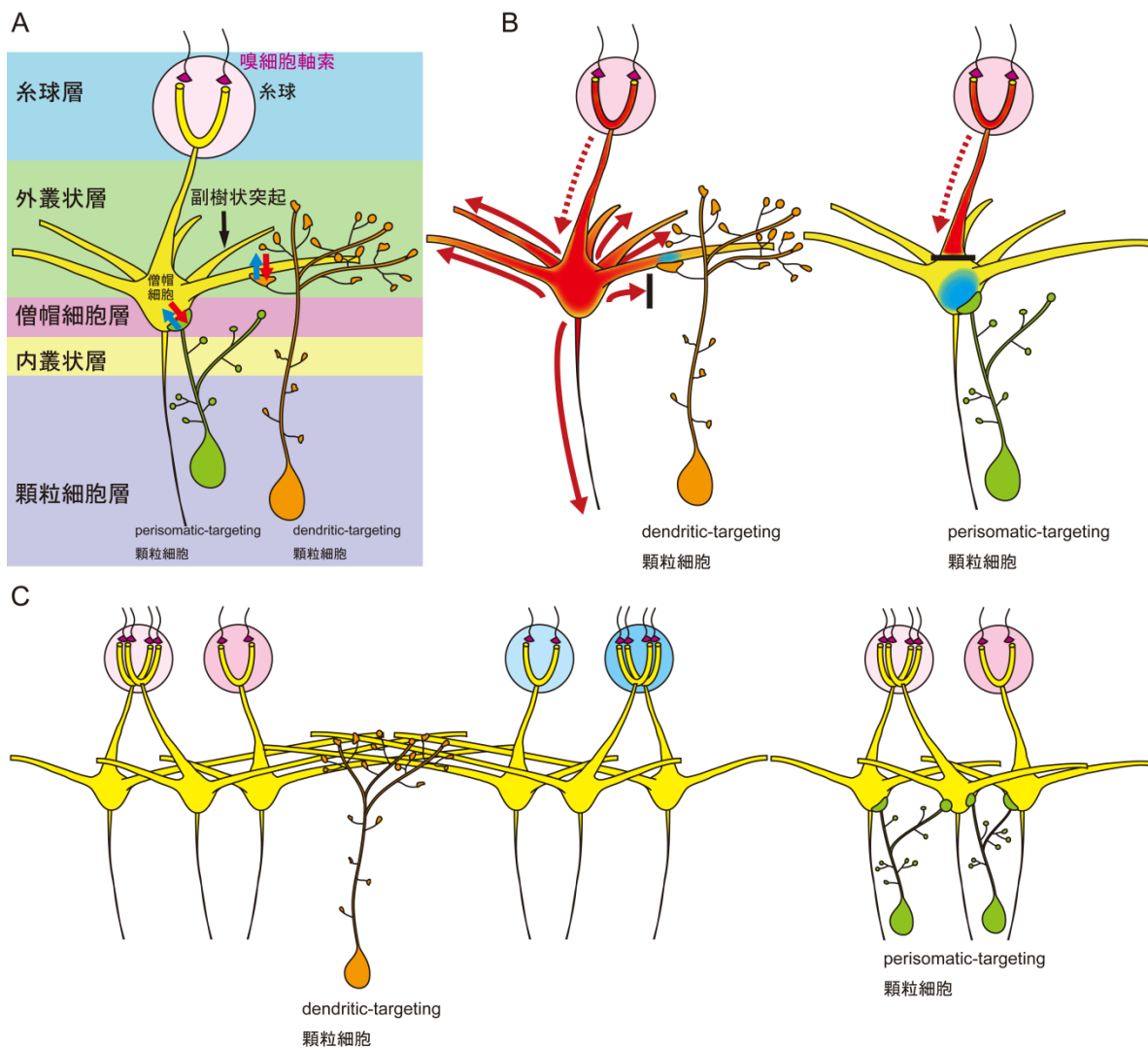


図 5. 嗅球神経回路における type S cell と dendritic-targeting 顆粒細胞の結合様式と予想される機能の模式図. (A) 2 つのサブタイプは形態的な分化. dendritic-targeting 顆粒細胞は僧帽細胞の副樹状突起と双方向性シナプスを形成するのに対し、type S cell は僧帽細胞の細胞体近傍と双方向性シナプスを形成する. (B) 2 つのサブタイプの抑制部位. dendritic-targeting 顆粒細胞は僧帽細胞の樹状突起上で局所的な抑制をかけるのに対し、type S cell は僧帽細胞の細胞体近傍に抑制をかけて発火そのものを制御すると予想される. (C) dendritic-targeting 顆粒細胞は広範囲に位置する多数の僧帽細胞とシナプスを形成するのに対し、type S cell は近傍に位置する少数の僧帽細胞に投射する.