

論文の内容の要旨

論文題目 **Column-Related Axonal Patterns of Layer 2/3 Neurons in the Rodent Barrel Cortex**
(げっ歯類大脳皮質カラム様回路構造に対応した
2/3層神経細胞由来の局所回路構築)
氏名 瀬原 慧祐

(1) 研究の背景と目的

高次脳機能の基盤である哺乳類の大脳皮質の神経回路構築の理解は、神経科学における重要な問題である。カラム様局所回路は大脳皮質情報処理の基盤構造の一つであり、過去の電気生理学的研究からカラム様局所回路における細胞間の情報伝達の様式について多くのことが明らかにされてきた。その一方で、カラム様局所回路に関連した解剖学的な軸索投射パターンについては不明な点が多い。

げっ歯類の大脳皮質一次体性感覚野（バレル野）は、大脳皮質カラム様回路構築の理解のための重要なモデルである。バレル野4層にはマウスのひげ1本1本に対応する特徴的な解剖学的構造であるバレルが存在し(図1A)、バレルを中心として、個々のひげからの感覚入力を処理するカラム様回路構築が存在している。過去の研究から、バレル野には2種類の独立した情報入力があることが知られている(図1B)。バレル中心部では視床VPM核由来の軸索がクラスターを形成し、受動的なひげ感覚情報を伝達する。これに対して、バレルとバレルの間の領域(セプタと呼ばれる)には視床POM核由来の軸索が投射し、能動的なひげ運動感覚情報を伝達する。このように、バレル野4層には、独立した「バレル回路」と「セプタ回路」の2種類の入力がある、と考えられている。このように、末梢から大脳皮質4層へ至るまでの神経回路が詳細に明らかになってきた一方で、実際に情報処理が行われる4層以降の大脳皮質内局所回路における軸索投射パターンについては不明な点が多い。

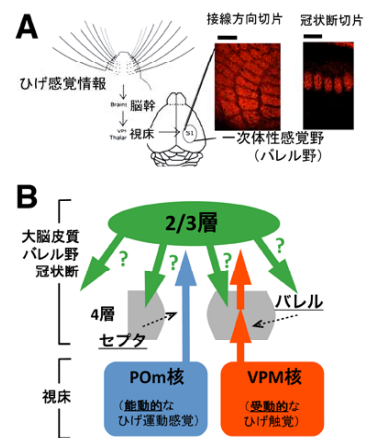


図1 げっ歯類一次体性感覚野(バレル野)の局所回路構築
A, げっ歯類一次体性感覚野には、ひげ一本一本に対応した「バレル」が存在する。スケール、200 μ m。B, バレルと、その間にあるセプタには、2種類の独立した情報入力がある。

(2) 本研究のアプローチ

不明な点が多い理由として、従来、軸索投射パターンの可視化方法として頻用されてきた軸索トレーサー局所注入法に問題があった。即ち、軸索トレーサーには「注入部位に細胞体を持つニューロンだけでなく、注入部位に樹状突起や軸索を伸ばしているニューロンの形態も可視化されてしまう」ために、様々な神経細胞の軸索がまとめて可視化されるという大きな問題点がある。このため、多くの軸索や樹状突起が複雑に混在した大脳皮質局所回路では、軸索トレーサーを用いた神経細胞特異的な軸索投射パターンを定量的・定性的に解析することは、しばしば困難であった。

そこで、本研究ではバレル野における大脳皮質内局所神経回路を正確かつ厳密に検討するために、子宮内電気穿孔法を利用した軸索投射パターンの可視化を行なった。子宮内電気穿孔法は、近年開発された大脳皮質における層選択的な遺伝子発現を可能にする遺伝子導入方法である。そこで本研究では、子宮内電気穿孔法の利点を活用して2/3層神経細胞にGFPを選択的に発現させることにより、バレル野2/3層細胞の軸索投射パターンを解析し、新たな局所軸索構築を見出した。

(3) 同側/対側バレルネットの同定

GFPで可視化された皮質2/3層錐体細胞では、細胞体および樹状突起は、皮質表層である1-3層に局限して存在する。そこで軸索のみが存在する皮質4層以下のGFPの分布を詳しく観察したところ、細胞体直下の皮質4層において、2/3層細胞由来のGFP陽性軸索分布に特徴的なパターンがあることを見出した(図2)。視床皮質軸索のマーカであるVGLUT2の抗体染色像を共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、GFP陽性軸索はバレル野4層においてバレルとバレルの間のセプタ領域に密集して分布していた。セプタにおけるGFP陽性軸索がバレルを取り囲む「網」のように見えたことから、この新たに見出した構造を「バレルネット」と名付けた。また、子宮内電気穿孔法を改良し、バレル野内のごく一部のみに局限して2/3層細胞

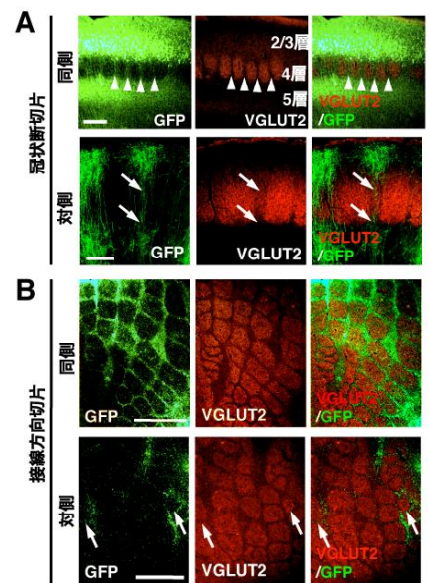


図2 同側バレルネットと対側バレルネット
2/3層神経細胞由来の軸索は、細胞体に対して同側でも対側でも、バレル野4層でセプタ選択的に分布した(A)が、対側でのみ、セプタ間の軸索密度の違いが顕著であった(B)。

を可視化したところ、少なくともバレル野内の 2/3 層細胞由来の軸索がバレルネットに寄与していることが示唆された。さらに本研究では、GFP 陽性軸索が細胞体側のバレル野だけでなく、対側のバレル野においてもセプタ領域に選択的に分布していることを見出し、「対側バレルネット」と名付けた(図 2)。対側バレルネットでは、バレル野内の位置に応じて GFP 陽性軸索の密度が大きく異なっており、セプタ間での GFP 陽性軸索密度に差が見られない同側バレルネットとは明らかに異なる空間パターンを示していた。

続いてバレルネットにおけるシナプスの有無を検討した。プレシナプスに局在する蛍光タンパク融合型シナプトフィジンを発現させた結果、同側バレルネットおよび対側バレルネットの軸索上に、シナプスが存在する可能性が支持された。

(4) バレルネット形成過程の検討

バレルネットの形成時期を検討するために、時系列を追ってバレル野切片を観察した結果、2/3 層神経細胞の軸索形成過程に 2 つの段階が存在することを見出した(図 3)。最初の軸索形成段階は生後 1 週目以前に起こり、この段階で形成された軸索はバレル/セプタとは無関係に分布することが示唆された。2 つめの軸索形成段階は生後 2 週目以後(バレル形成後)で、この段階で初めてバレルネットの軸索形成が起こることが示唆された。さらに、バレル形成と同側バレルネット形成との因果

関係を調べる目的で、ひげ毛根を傷害してバレルの空間的模式を変えると、同側バレルネットが、それに対応したパターンで形成された(図 4)。これらの結果から、同側バレルネットの空間的模式形成が、バレルの空間的模式により規定されている可能性が示唆された。

また、同側バレルネットと対側バレルネットの形成過程の比較を行なったところ、対側バレルネットでは、1 つめの軸索形成段階は観察されず、2 つめの軸索形成段階のみが存在する可能性が示唆された(図 3)。

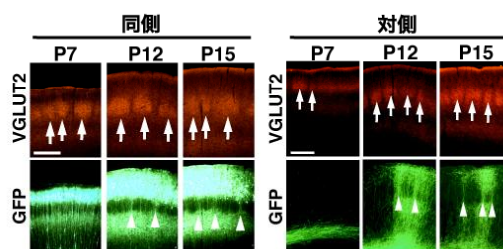


図3 バレルネットの形成過程
同側バレルネットの形成過程には、2段階の軸索形成過程が存在した(左)。これに対して対側バレルネットの形成過程には、2つめの軸索形成段階のみが存在した(右)。

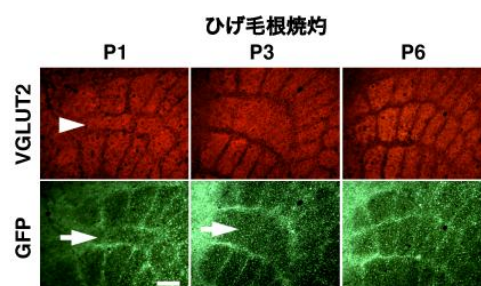


図4 バレルネットパターンの可塑性
同側バレルネットの空間的模式は、バレルの空間的模式に依存して形成された。

以上のように、本研究ではげっ歯類バレル野に存在する新たな軸索パターンと、その形成過程を明らかにした(図 5, 6)。大脳皮質回路における同側および対側バレルネットの機能的意義については現時点では不明であるが、私は、「バレル回路」と「セプタ回路」の情報を、皮質 4 層のセプタ部分で統合する回路である可能性がある、と考えている。

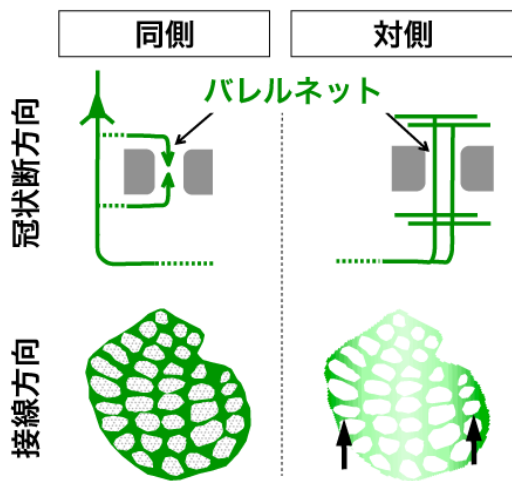


図5 本研究のまとめ1:バレル野2/3層細胞の軸索構築
 (上)バレル野2/3層細胞由来の軸索は、同側でも対側でも4層でセプタ領域選択的に分布する(バレルネット)。
 (下)同側バレルネットと対側バレルネットは、バレル野内で異なる空間分布を持つ。

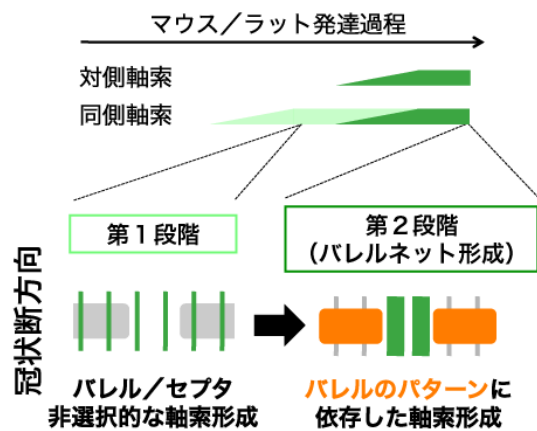


図6 本研究のまとめ2:バレル野2/3層細胞の軸索形成
 同側では、2/3層細胞の軸索形成は2段階の形成過程を経る。対側では、2段階目の形成過程のみが存在する。