

## 論 文 要 旨

# *A Morphological Analysis of Thalamocortical Axon Fibers of Rat Posterior Thalamic Nuclei: A Single Neuron Tracing Study with Viral Vectors*

〔 視床後核群ニューロンの皮質投射：  
ウイルスベクターを用いた単一ニューロンの形態学的解析 〕

大 野 幸

### 【序論】

齧歯類において視床後核群(POm)は、後腹側核群(VP)と共に体性感覚情報の伝達に関わっている。POmは脊髄と三叉神経核から入力を受け、大脳皮質の第一次体性感覚野(S1)やその他の領野に投射している。S1においてVPニューロンの軸索は第4層に明瞭なカラム構造を持ち密な投射をするのに対し、POmは1層と5層上部(5a)に投射することが知られている。また、VPニューロンは単一ニューロンレベルでの研究においても4層に密な投射をするという特徴が示されてきたが、単一POmニューロンの軸索投射様式はこれまで明らかにされていない。そこで、本研究ではラットの単一POmニューロンを、近年開発されたシンドビスウイルスベクターを用いて細胞体から軸索末端に至るまで明瞭に可視化した後で再構築し、形態学的解析を行った。また、先行研究により calbindin D28K(CB)という化学マーカーを用いて染色した場合POmは均一の組織ではなく、化学的属性上少なくともさらに2つに分けられることが示唆されていた為、POm前方とPOm後方に分け両ニューロングループ間の形態学的特徴を比較した。その結果両者の間に差異が認められたので、シンドビスウイルスベクターによる単一ニューロンレベルでの結果を確認する目的で従来から用いられてきた順行性トレーサーの1つであるPHA-L(*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin)を用いて確認実験を行った。

### 【材料および方法】

#### <単一のPOmニューロンの解析実験>

膜移行性シグナルを付加した緑色蛍光蛋白(pal-GFP)あるいは赤色蛍光蛋白(pal-mRFP)を発現するよう遺伝子改変した2種類のシンドビスウイルスベクターを適切に希釈して混ぜ、SDラットの両側のPOmに注入し、48-52時間後にそれらのラットを灌流固定した。取り出した脳を40 $\mu$ mの厚さで冠状断に薄切した後、切片を蛍光顕微鏡で観察し、POmニューロンがpal-GFPまたはpal-mRFPシンドビスウイルスに1つだけ感染しているサンプルを解析の対象とした。感染した細胞体を含む切片を、CB抗体を用いて蛍光免疫染色し、そのニューロンのCBに対する免疫反応性を共焦点レーザー顕微鏡下に判断した。その後、蛍光Nissl様染色をして感染ニューロンの位置を再確認した。次いでpal-GFPまたはpal-mRFPに対する抗体と、皮質における層構造とカラム構造を可視化する目的でVGluT2 (vesicular glutamate transporter 2) に対する抗体を用いて、明視野免疫二重染色を行った。全切片を連続的にスライドガラスにマウントし、封入した後、スライドスキャナーで写真をとり、コンピューター上で軸索を再構築した。また、投射軸索の分布について皮質領野・皮質層ごとに長さを測定するなど形態学的な解析を行い統計学的に比較した。

#### <PHA-Lによる確認実験>

PHA-Lを両側POmに注入し、14日後に灌流固定し、取り出した脳を40 $\mu$ mに薄切した。PHA-Lに対する抗体を用いて免疫染色をし、マウント封入後、軸索投射量について半定量的な解析を行った。

## 【結果】

### <POmにおけるCBの免疫反応性>

先行研究にもあるようにCBに対する免疫反応性はPOmの全領域で陽性であったが、POm後方のほうが前方に比べてより強い免疫反応性を示した。従ってPOmはCBに対して弱い免疫反応性を示す前方と中等度の反応性を示す後方の2つの領域に分けられることがわかった。また、今回の研究において全部で10個のニューロンを単一標識したが、そのうち5個は前方の、5個は後方の領域に位置していた。

### <単一POmニューロンの細胞体と樹状突起>

POm前方ニューロンと後方ニューロンを比べて細胞体の大きさに有意差はみられなかったが、樹状突起の広がりには前方ニューロンに比べて後方ニューロンの方が内外側方向に大きかった。さらに、樹状突起の分岐の数は細胞体から20-100 $\mu$ mの位置においてPOm前方ニューロンのほうが後方ニューロンに比べて有意に多かった。

### <単一POmニューロンの軸索分布>

1) 皮質下において、再構築した10個全てのPOmニューロンは視床網様核に側枝を出し、線条体には2/5の前方ニューロンと、全ての後方ニューロンが側枝を出した。2) 皮質における投射領野に関しては、10個全てのニューロンがS1に軸索投射をしており、さらに第一次、二次運動野、第二次体性感覚野、島皮質、聴覚野など他の領野にも同時に投射をしていた。またPOm前方ニューロンでは後方ニューロンに比べて狭い範囲に密な投射をしていた。3) 次にS1における投射層に関しては、先行研究にあるように1層と5層への投射が多かったが、1層へはPOm後方ニューロンがより多く投射し、5層へは前方ニューロンがより多く投射している傾向が見られた。そこで、実際にシナプス結合に重要な部位であると考えられている終末様構造(ブトン)の数を算出したところ、POm前方ニューロンでは1-6層に分布している全ブトン数のうち6.1-38.5% (mean  $\pm$  SD = 20.6  $\pm$  14.6%)が1層に分布していたのに対し、後方ニューロンでは40.0-91.7% (64.1  $\pm$  19.4%)が1層に分布していた。この差はt検定をしたところ $p=0.008$ でPOm後方ニューロンのほうが有意に多く1層に投射することが示された。一方、5層に対するブトンの割合はPOm前方ニューロンでは40.8-54.4% (48.2  $\pm$  6.4%)、後方ニューロンでは3.9-38.9% (24.7  $\pm$  13.6%)であり、こちらに関しても $p=0.016$ で有意差が認められた。

### <PHA-Lによる確認実験>

PHA-Lを、CB免疫反応性の弱いPOm前方に注入した場合、S1の2-5層、中でも特に5層に密な投射が見られたが、CB免疫反応性が中等度なPOm後方に注入した場合は1層に密な投射が見られた。さらに、前方と後方の境界領域に注入した場合、投射軸索は1層5層の両方に見られた。これらは、今回シンドビスウイルスベクターを用いて得られた単一ニューロンレベルでの結果を支持する結果であった。

## 【結論及び考察】

今回の研究で、POmはCB免疫反応性が弱陽性か中等度陽性であるかによってPOm前方と後方の2つに分けられたが、この分類は両グループ間の樹状突起および軸索分布という他の指標にも違いが存在したことにより支持された。また両グループとも大脳皮質における重要なターゲット領野はS1であるにもかかわらず、前方ニューロンではS1の5層へ、後方ニューロンでは1層へより多くの軸索が投射していた。この違いはPOm前方ニューロンとPOm後方ニューロンの体性感覚情報伝達過程における機能的な違いを反映していると考えられる。POm前方ニューロンはS1の比較的狭い領域の5a層に密な投射をしており、これら軸索のターゲットは5a層錐体細胞の基底樹状突起であると考えられ、5a層錐体細胞の主な投射先として線条体が良く知られていることから、POm前方は運動制御に関わっていることが示唆された。一方、POm後方ニューロンは皮質1層に多く軸索投射しており、1層には2/3層及び5層錐体細胞の先端樹状突起が存在していることから、これらの軸索のターゲットは2/3層及び5層の錐体細胞と考えられる。さらに、POm後方ニューロンは1層の広範囲にわたって軸索投射していたため、これら視床から皮質への情報入力にはS1において精緻な情報処理に関わるというよりは、S1全体を広範囲にわたって活動させる必要が生じたときなどにその役割を果たすのではないかと、例えば、POm後方の少なくともある部分では侵害刺激情報を受けているという報告があることから、侵害刺激受容時に触覚入力に対する注意を促す働きなどが考えられる。

(Cerebral Cortex, in press)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 178 号	学位申請者	大野 幸
審査委員	主査	中村 典史	学位
	副査	中河 志朗	副査
	副査	原田 秀逸	副査
			博士 (歯学)
			佐藤 友昭
			向井 洋

### A Morphological Analysis of Thalamocortical Axon Fibers of Rat Posterior Thalamic Nuclei: A Single Neuron Tracing Study with Viral Vectors

(視床後核群ニューロンの皮質投射：ウイルスベクターを用いた単一ニューロンの形態学的解析)

視床後核群(POm)は、後腹側核群(VP)と共に体性感覚情報の伝達に関わっており、脊髄と三叉神経核から入力を受け、大脳皮質の第一次体性感覚野のほか、第一次運動野や島皮質などへ投射することが知られている。また、齧歯類において POm は第一次体性感覚野の 1 層と 5 層上部に投射することが報告されているが、単一 POm ニューロンの軸索投射様式はこれまで明らかにされていない。そこで、学位申請者らはラットの単一 POm ニューロンを、近年開発されたシンドビスウイルスベクターを用いて明瞭に可視化し形態学的解析を行った。また、calbindin により POm を前方と後方の 2 つのグループに分け、両ニューロングループ間の樹状突起や軸索分布などの形態学的特徴を比較し、定量的な解析を行った。さらに、従来から用いられてきた順行性トレーサーの PHA-L(*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin)を用いて、単一ニューロンの軸索投射の結果が集団レベルでも再現するかどうか、確認実験を行った。

その結果、本研究では以下のことが明らかとなった。

- 1) POm を calbindin に対する免疫活性が弱陽性を示す前方と中等度陽性を示す後方の 2 つの領域に分けることが出来た。
- 2) 樹状突起の広がり方は前方領域に存在していたニューロンに比べて後方のものの方が内外側方向に大きかった。
- 3) 樹状突起の分岐数は後方領域に存在していたニューロンに比べて前方のものの方が多かった。
- 4) 再構築した 10 個全てのニューロンは一次体性感覚野に軸索投射し、それに加えて少なくとも 1 つの別領野にも投射していた。
- 5) 一次体性感覚野において、前方領域に存在していたニューロンはより多く 5 層に分布し ( $p=0.016$ )、後方領域に存在していたニューロンはより多く 1 層に分布していた ( $p=0.008$ )。
- 6) 一次体性感覚野において、前方領域に存在していたニューロンは後方のものに比べて狭い範囲に密な軸索分布をしていた。
- 7) 再構築した 10 個全てのニューロンは視床網様核に側枝を出し、前方領域に存在するニューロンのうち 2/5 個と後方のものうち 5/5 個が線条体の外側部に側枝を出していた。

以上のことから本研究は、POm が前方と後方の 2 つの領域に区分され、その軸索投射の違いから機能的にも異なることを示唆した点で非常に興味深い。さらに以前の研究結果と考え合わせて、後方の領域が侵害刺激に対する神経回路の一端を担う可能性も示唆しており、今後このような基礎的な研究が痛みの研究をはじめとし、体性感覚系に関連する多くの研究の基盤となっていく事が期待できる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 178号	学位申請者	大野 幸
審査委員	主査	中村 典史	学位 博士 (歯学)
	副査	中河 志朗	副査 佐藤 友昭
	副査	原田 秀逸	副査 向井 洋

主査および副査の5名は、平成24年2月3日、学位申請者 大野 幸 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 遺伝子組換えウイルスを使用しているが、これに関して必要な承認を得ているか。

(回答) 京都大学の「組換えDNA実験安全管理委員会」の承認を得て実験を行いました。

質問2) 細胞体の面積を出しているが、どのように算出したのか。

(回答) 細胞体の写真を蛍光顕微鏡下で撮影し、canvas X ソフトウェアを用いてその最大周をトレースし、内側の面積を算出しました。

質問3) 視床網様核への側枝の出し方は、今までの報告を越えるような違いがあったか。

(回答) 今回は大脳皮質投射の解析が主だったため、視床網様核に関しては、以前の研究の通り必ず側枝を出していることを確認するにとどめました。

質問4) POm の機能を考察し、ニューロンの種類を特定するためには、GABA に対する免疫染色を行ってもよかったのではないかと考えられるが。

(回答) 今回は実験の手法上、GABA に対する免疫染色はできませんでした。

質問5) ラットの大脳皮質においては sensory と motor がはっきりわかれておらず、それらを区別するのは難しいが、今回はどのようにして第一次体性感覚野を定義したか。

(回答) HL (hindlimb) と FL (forelimb) 内側部は生理学的にも入出力関係においても第一次運動野としての属性も示すということをも明記した上で、今回は HL と FL を第一次体性感覚野と定義しました。

質問6) Fig4 の C から E において、ブトンとして示されているものの膨らみは軸索の太さに比して小さく、シナプスを形成しているブトンには見えないが。

(回答) シンドビスウイルスベクターを使用した際、染色の過程で軸索が太くなり、軸索とブトンとの区別がつきにくくなります。これに対して PHA-L を用いた場合には、染色方法の違いから軸索の太さに対してブトンは大きくはっきりと観察されるため、実際には PHA-L 標識したサンプルを用いてシナプス形成していると考えられるブトンの判定をしました。

質問7) PHA-L を用いて、前方と後方のちょうど中間部に注入した場合、1層と5層の両層に投射が見られたが、これはどのように解釈したらよいか。

(回答) 中間領域では5層中心投射ニューロンと、1層中心投射ニューロンが混在しているため、集団レベルでは、1層と5層の両層へ投射するパターンとして観察されたと考えました。

質問8) VPM/VPL と POm は全く別々の核と捉えるのか、それともどちらかがもう片方を含有していると捉えるのか、VPM/VPL と POm との関係性はどうなっているのか。

(回答) VPM/VPL と POm は別々の核であり、また両者は異なる情報を伝える並列の関係にあると考えています。

## 最終試験の結果の要旨

質問 9) calbindin が持つ機能的意味は何であるか。

(回答) calbindin はカルシウム結合タンパク質の一種であり、細胞内のシグナル伝達に関わっていると考えられますが、それがどのような機能的意味を持つのか現在はわかりません。

質問 10) 1層に軸索投射をしているものと、5層に軸索投射をしているものとは、電気的な意味を考えた場合どのような違いがあるのか。

(回答) 1層には2/3層および5層錐体ニューロンの先端樹状突起が存在していますが、ここへの入力細胞体から遠いため、アクションポテンシャルを起こすとは考えにくく、静止膜電位を引き上げてニューロンを発火しやすい状態に調節するなど、モジュレータ的な役割を果たしていると考えられます。一方、5層への入力は5層錐体ニューロンの基底樹状突起に情報を伝えると考えられ、これは細胞体への距離が近いためアクションポテンシャルを引き起こす事が出来ると思われ、このような電気的な違いが、異なる層に軸索投射することの意義であると考えております。

質問 11) 皮質カラムとの関係はどうであったか。

(回答) 今回得られた全ての単一 P<sub>Om</sub> ニューロンは、約 400 $\mu$ m の皮質カラム幅を超えて軸索投射しており、一番狭かったニューロンでも2カラム以上に渡って軸索投射していました。

質問 12) 方法論的なことで、軸索を再構築するまでの大きな流れはどのようなものか。

(回答) 連続切片を作成し、染色をした後、その軸索および樹状突起を1枚1枚トレースし、切片約 200 枚分を重ねてつなぎあわせ、1つの図に再構築しました。

質問 13) 今回の研究より、P<sub>Om</sub> 後方領域の機能として考えられることは何か。

(回答) P<sub>Om</sub> の後方領域に存在していたニューロンは第一次体性感覚野の1層に広範囲にわたって軸索投射していたため、VPM/VPL のような精密な情報処理に関わっているとは考えにくく、第一次体性感覚野全体を活性化させ、その閾値をコントロールすることに関与していると考えています。

質問 14) 大脳皮質の層分けは、どのようにして判定したのか。

(回答) Nissl 染色を用いて層分けをしました。

質問 15) 注入した量が 0.3 $\mu$ l であり、とても多いようだが、障害は出なかったか。

(回答) 0.3 $\mu$ l の注入量を約 5 分間かけて少量ずつ注入したため、障害は見られませんでした。

質問 16) シンドビスウイルスベクターを注入し、単一ニューロンが得られる頻度はどのくらいか。

(回答) ラット 59 匹の両側 118 半球に注入し、このうち 30 半球で単一ニューロンが得られましたが、P<sub>Om</sub> 外に感染があったものや、染色が不完全だったものを除くと、最終的には 10 個のニューロンが残りました。従って、サンプルとなる単一ニューロンが得られた頻度は 10/118 でした。

質問 17) 単一のニューロンだけを染めていると断言できるのか。また、複数のニューロンを断片的に染めていて、それをつなぎ合わせている可能性はないのか。

(回答) 原則単一ニューロンに感染が認められたものだけをサンプルとしましたが、もし複数ニューロンが標識されていたとしても、再構築は連続切片を順番にトレースし、つなぎ合わせていく方法のため、つながらない軸索が存在していた場合、それは別のニューロンの軸索である事が容易に判定できます。

質問 18) 今回の研究で一番の新しい発見は何であったか。

(回答) 形態学的解析を用いて、P<sub>Om</sub> を前方と後方の2つの領域に区分することができ、軸索投射の違いから両者が異なる機能を持つ可能性を示唆したことです。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。