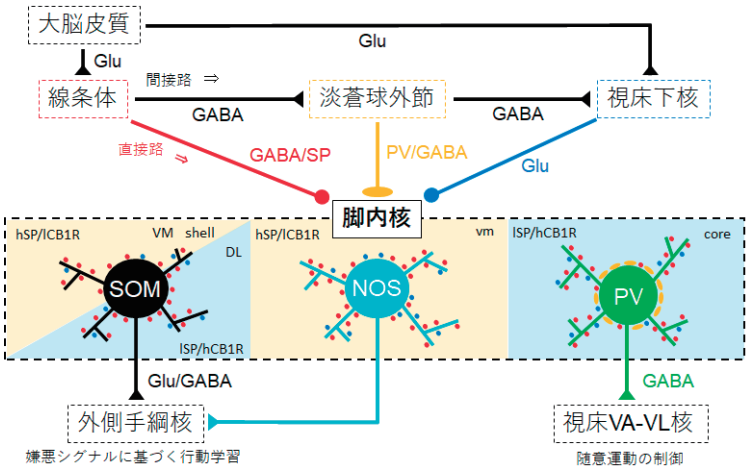
152　マウス脚内核における形態および遺伝学的解析	宮本　雄太

【目的】脚内核は、大脳基底核の出力核の一つであり、線条体や淡蒼球外節、視床下核から主な入力を受ける領域である。大脳基底核の機能は直接路および間接路に集約される神経回路の概念に基づいて理解されるが、実際に大脳基底核を構成する個々の神経核の内部構造を均一な領域として定めることは困難であり、基底核の機能を正確に理解するためには多くの解決すべき形態学的な疑問が残っている。本研究では、基底核の出力部として他の基底核の構成核から多くの入力を受ける脚内核に焦点を当て、その詳細な内部構造を明らかにする。具体的には、脚内核が線条体、淡蒼球外節、視床下核からどのような入力を受けているのかをトレーサー注入や免疫組織化学を用いて形態学的に解析する。

【方法】C57BL/6J マウスの脳を用いて多重免疫染色を適応して作製した標本を共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、画像の取得後に画像解析ソフトを用いて脚内核内部における軸索終末やニューロンの局在について解析した。さらに、線条体の亜区域に順行性トレーサーを注入し、脚内核で標識されたトレーサー陽性軸索終末の局在を解析した。また、脚内核における Cannabinoid type-1 receptor（CB1R）の細胞内局在について電子顕微鏡を用いて調査した。ここで得られた形態学的所見と既知の遺伝学的データを比較し、脚内核の詳細な内部構造の解明を行った。

【結果】脚内核は、線条体に由来する二種類の軸索終末（substance P を強発現するタイプと CB1R を強発現するタイプ）の局在に基づいて、吻側部の腹内側部（VM）／背外側部（DL）および尾側部の core と shell の 4 つの亜区域に区分できた。しかも脚内核を構成する 3 種類のニューロンはこの 4 つの亜区域に限局的に分布していた。すなわち、Somatostatin （SOM）陽性ニューロンは脚内核の VM や DL、shell に分布しており、Nitric oxide synthase（NOS）陽性ニューロンは VM に限局したのに対し、Parvalbumin（PV）陽性ニューロンは core に密集していた。また、線条体亜区域への順行性トレーサー注入により、線条体において一次の運動野／感覚野からの入力を受ける領域に存在するニューロンは脚内核吻側部の DL／尾側部の core へ投射していた一方、前辺縁皮質や眼窩前頭皮質から入力を受ける領域に位置する線条体ニューロンは、VM および shell に投射していることを見出した。脚内核における CB1R の細胞内局在については、電子顕微鏡を用いた観察により軸索終末だけでなく preterminal axons と呼ばれる部位に特に多く存在することを明らかにした。脚内核に収束する軸索終末の解析については、SOM および NOS 陽性ニューロンが線条体からの入力を強く受けているのに対し、PV 陽性ニューロンだけが淡蒼球外節からの入力を選択的に受けていることがわかった。本研究で見出した形態学的所見と遺伝学的データは、おおよそ良い一致を示したが、PV 陽性ニューロンに関する所見のみ正反対の結果が認められた。

脚内核に収束する神経回路の概念図



152. マウス脚内核における形態および遺伝学的解析

宮本　雄太

熊本大学 大学院先導機構／生命科学研究部 形態構築学講座

Key words：脚内核，亜区域，免疫組織化学，CB1R，電子顕微鏡

緒　言

大脳基底核は、大脳皮質下に存在する複数の神経核から構成され、適切な運動や認知、行動学習など様々な機能に関与する領域である。基底核の神経回路では、ほとんど全ての大脳皮質からの情報が基底核の入力部である線条体に伝達され、そこから直接路／間接路と呼ばれる二つの神経経路を経て最終的に脚内核（霊長類の淡蒼球内節）に収束したのち、視床や外側手綱核といった基底核外部へと送られる。直接路は線条体から脚内核への直接的な神経投射経路であるのに対し、間接路は線条体から淡蒼球外節と視床下核を経由して脚内核へ向かう経路である。これらの回路を構成する線条体の投射ニューロンはそれぞれ直接路および間接路ニューロンと呼ばれるGABA 作動性のニューロンであり、さらに前者は神経伝達物質として軸索終末に Substance P（SP）を有し、後者は enkephalin を含有している。また、両投射ニューロンの軸索終末には内因性カンナビノイド（eCB）の受容体である Cannabinoid type-1 receptor（CB1R）が存在すると考えられており、post 側のニューロンから逆行性に放出された eCB が作用することで presynapse からの GABA 放出を制御している。この特殊な制御様式は、eCB システムと呼ばれ、近年の基底核研究のみならず、基底核疾患への治療アプローチの場としても注目されている。基底核の出力部である脚内核は、線条体直接路ニューロンから入力を受けるため SP および CB1R により強標識される領域として同定され、外側手綱核（LHb）へ投射する Somatostatin（SOM）陽性ニューロンと Nitric oxide synthase（NOS）陽性ニューロン、視床の運動核（VA-VL）へ投射する Parvalbumin（PV）陽性ニューロンから構成される［1］。また、基本的な基底核の機能として、直接路が運動促進に、間接路が抑制に働いており、両回路における活動の協調性が保たれることで適節な運動制御を可能にしていると考えられている。しかしながら、実際には二つの神経回路だけで説明できるほど基底核の形態は単純ではなく、解決すべき多くの疑問が残っている。そこで本研究では、基底核の中でも多くの入力が収束する脚内核に焦点を当て、その詳細な内部構造について免疫組織化学を用いて明らかにすることを主な目的とした。さらに脚内核を構成するニューロンについて Single cell RNA-Seq 解析に基づいた遺伝子発現データと形態学的所見の比較を行うことで新たな基底核における神経基盤の確立を目指した。成果として、脚内核の内部構造が線条体ニューロンから受ける入力と脚内核内部に存在するニューロンの偏った分布に従って 4 つの亜区域（吻側部の背外側部／腹内側部、尾側部のコア／シェル）に区分できることを見出した。しかも脚内核ニューロンが他の基底核の神経核から受ける入力の種類もサブタイプに応じて異なっていた。また、電子顕微鏡を用いた観察によって脚内核における CB1R の局在が軸索終末だけでなく、preterminal axon に多く局在することを始めて明らかにした。脚内核において私が見出したニューロンとその投射先に関する所見を公表されている遺伝子発現のプロファイリングデータと比較したところ、PV ニューロに関する所見の不一致が認められたが SOM および NOS ニューロンについてはおおよそ一致した所見が確認できた。

方　法

1. 固定

C57BL/6J マウス（オス、体重 20～26 g、7～8 週齢）を用いてイソフルレン吸入麻酔下にて 4% Paraformaldehyde（PFA）in 0.1 M PB 固定液を用いて上行大動脈から灌流固定を行った。2 時間後に脳を取り出して同じ固定液に一晩浸潤させたのち（4℃）、固定液を 0.1%の sodium azide を含む PBS に置き換えた。電子顕微鏡用試料の灌流固定では 4% PFA in 0.1 M PB を 0.1% Glutaraldehyde を含む固定液に置き換えた。

2. 順行性トレーサーの注入

順行性トレーサーphal を線条体の 3 つの亜領域（背外側部、背内側部、腹内側部）および淡蒼球外節に注入した。 トレーサーの注入は、0.5～2.0%イソフルラン吸入による深麻酔下状態で実施した。ドリルを用いて頭蓋骨に穴を開け、phal 溶液を含むガラス電極（外径 40 μm）を標的座標に挿入し、電気的に 5～7 μA の定期的サイクル（2s on／2s off）で 5 分間注入した。処置後のマウスは適切な環境下で 1 週間飼育し、上述した方法で灌流固定を実施した。

3. 免疫組織化学と共焦点レーザー顕微鏡

ビブラトームを用いて線条体と淡蒼球外節、脚内核を含む厚さ 40 μm の冠状断連続切片を作製した。切片を 0.3%TritonX-100、5% normal donkey serum in PBS に一晩インキュベートした後、複数の一次抗体に反応させ（20℃）、蛍光色素標識抗体を含む二次抗体に反応させた後に封入して標本を作製した。共焦点レーザー顕微鏡（Nikon C2）を用いて optical slice 像をデジタルデータとして取得し、画像解析ソフト Neurolucida を用いて解析を行った。

4. CB1R の電子顕微鏡観察

0.1% Glutaraldehyde を含む 4% PFA in 0.1 M PB 固定液を用いて灌流固定したマウスの脳切片を用いた。抗体の浸透性を向上させるために切片を液体窒素を用いた急速凍結・急速融解法で処理し、CB1R に対する抗体に 1 週間反応させた後、続いてビオチン化二次抗体に一晩反応させ、ABC－DAB 発色を行い、1% OsO_4 で 1.5 時間後固定した。さらに 1.5%酢酸ウランで染色し、脱水後にアラルダイトに包埋した。再包埋標本の表面部分から厚さ 65 nm の切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡（model HT-7700、Hitachi）を用いて観察を行った。

結果および考察

脚内核は軸索終末にSPおよびCB1Rを含む線条体の直接路ニューロンから入力を受けるためSPおよびCB1Rの免疫染色によって非常に強く標識される。本研究ではこれらの免疫染色性が相補的な染色パターンを示し、さらにそれらが脚内核内部で偏った分布を示すことを見出した。すなわち、脚内核において弱 SP／強 CB1R 免疫反応性は吻側部の背外側部（DL）と尾側部のコア領域（core）でみられ、強 SP／弱 CB1R 免疫反応性は吻側部の腹内側部（VM）と尾側部のシェル領域（shell）において同定された（図 1）。さらに、脚内核の 3 種類のニューロンの分布パターンもこれらの領域に区分に一致して偏った局在を示した。脚内核において全体の 4 割を占める SOM 陽性ニューロンは、吻側部では SP および CB1R の染色性に基づいた区分に関係なく分布していたが、尾側部においては、shell に限定した局在を示した。脚内核全体の 2～3 割を占める NOS 陽性ニューロンは、吻側部の VM に限局していた。一方で、全体の 3 割を占める PV 陽性ニューロンは、尾側部の core に密集した分布パターンを示した。定量解析の結果、尾側部 core における PV 陽性ニューロンの細胞密度は、$5.37 \pm 2.10 \times 10^2/mm^3$であり、他の亜区域（$0.51 \pm 0.29 \times 10^2/mm^3$ in VM、$1.18 \pm 0.59 \times 10^2/mm^3$ in DL、

$1.02 \pm 0.88 \times 10^{2}/mm^{3}$ in shell）に比べて最も高い値を示した（n=3 animals、 Tukey-Kramer test、$p < 1.0 \times 10^{-7}$）。吻側部 VM における NOS 陽性ニューロンの細胞密度（$4.22 \pm 1.54 \times 10^{2}/mm^{3}$）は、他の亜区域よりも有意に高い値を示した（n=3 animals、Tukey-Kramer test、$p = 5.2 \times 10^{-6}$ VM vs Shell、$p < 1.0 \times 10^{-7}$ VM vs shell、$p < 1.0 \times 10^{-7}$ VM vs core）。また、線条体から脚内核への軸索投射部位を調べるために、順行性トレーサーを線条体の亜区域に注入し、脚内核におけるトレーサー陽性軸索終末の分布を調べた。脚内核と同様、線条体においても SP および CB1R 免疫反応性について対照的かつ不均一なパターンが認められることから、線条体において強 SP／弱 CB1R 免疫反応性を示す背外側領域と腹内側領域、さらに弱 SP／強 CB1R 免疫反応性を示す背外側領域の 3 ヵ所に順行性のトレーサーを注入した。興味深いことに、前者の二領域は大脳皮質の前辺縁皮質（PrL）や内側眼窩前頭皮質（MO）から入力を受けており、後者の領域は一次の運動野（M1）および感覚野（S1）からの入力が入る場所に相当する［2］。線条体の強 SP／弱 CB1R 免疫反応性を示す領域へトレーサーを注入した場合、脚内核においてトレーサー陽性の軸索終末が吻側部の VM および尾側部の shell に認められた。対照的に、線条体の弱 SP／強 CB1R 免疫反応性を示す背外側領域にトレーサーを注入した例では脚内核吻側部の DL および尾側部の core に限局したトレーサー陽性終末が観察された。すなわち、線条体から脚内核への入力として SP および CB1R 免疫反応性に一致したトポグラフィックな方法での投射があることが示唆された（図 1）。

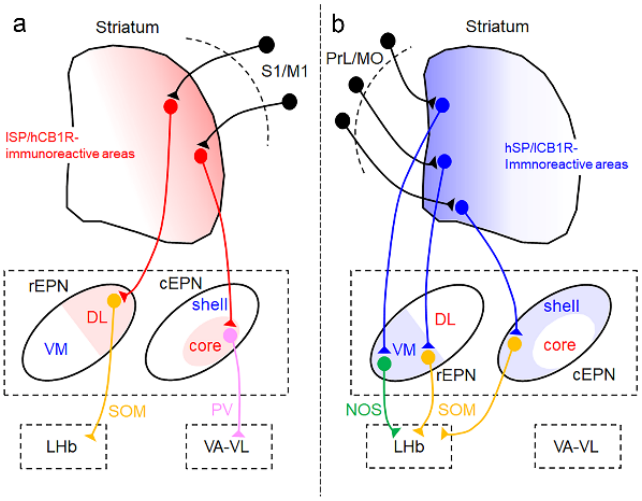


図 1. 基底核における大脳皮質－線条体－脚内核経路の概略図

a） 弱 SP／強 CB1R（lSP/hCB1R）免疫反応性によって定義された亜区域を通る基底核の神経回路。

b） 強 SP／弱 CB1R（hSP/lCB1R）免疫反応性によって定義された亜区域を通る基底核の神経回路。

rEPN：脚内核の吻側部、cEPN：脚内核の尾側部。

次に、脚内核における CB1R の詳細な局在について調査した。一般に脳内における CB1R の存在は、大脳基底核だけでなく海馬、小脳など様々な領域で確認され、その細胞内局在として多くは軸索終末であることが知られている。本研究では、電子顕微鏡を用いた観察によって脚内核における CB1R の局在が軸索終末だけでなく、preterminal axon と呼ばれる部位に非常に多く存在することを明らかにした（図 2）。CB1R のリガンドである eCB は post 側のニューロンから放出され逆行性に作用するが、それはしばしばシナプス外部へと拡散する。すなわち、本研究で脚内核において見出した CB1R の詳細な局在は、eCB システムが機能するにあたって極めて効率的な部位に CB1R が存在することを形態学的に証明したものであると考えている。

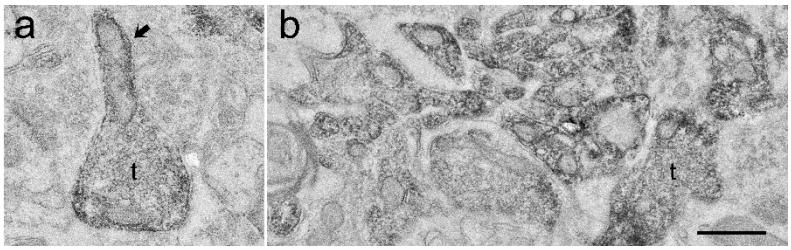


図 2. 脚内核における CB1R の免疫組織化学的局在を示した電子顕微鏡画像

a）DAB によって標識された CB1R 免疫反応性は、軸索（t）および preterminal axon （矢印）で認められた。

b）脚内核における CB1R 免疫反応性は、軸索（t）よりも preterminal axons でより強く、多くの標識が観察された。

スケールバー：0.5 μ m。

さらに、本研究では淡蒼球外節、視床下核、淡蒼球外節から脚内核に収束する軸索終末（ブトン）の局在について調査した。ブトンの同定法としては、線条体に由来するものを GABA 作動性ブトンのマーカーである GAD または vGAT のみ陽性のものとして同定し、視床下核に由来するものをグルタミン酸作動性ブトンのマーカーである vGluT2 で識別した。淡蒼球外節から脚内核への入力は主に淡蒼球外節の PV 陽性ニューロンが担っているため、淡蒼球外節由来のものは PV／GAD 二重陽性ブトンとして区別した。すべての脚内核ニューロンの樹状突起上には線条体に由来すると考えられる GAD のみ陽性ブトンおよび視床下核に由来すると考えられる vGluT2 陽性ブトンが主に分布していた。細胞体上に局在するブトンについては、SOM および NOS 陽性の細胞体上には GAD または vGAT のみ陽性のブトンが多く分布していたのに対し、PV 陽性ニューロンの細胞体上に局在するブトンは PV／GAD 二重陽性のものが大半を占めていた。この結果についてまとめたデータを図 3 に示した。一般的にニューロン上に局在するブトンの位置は、細胞体に近いほどそのニューロンの活動に与える影響が大きく、遠位になるほど小さい。すなわち、樹状突起上に局在するブトンよりも細胞体上に局在するブトンがそのニューロンにおける活動電位の発生に大きく寄与していることが想定される。ここで見出した所見は、脚内核を構成する 3 種類のニューロンが均一に外部のニューロンから入力を受けているわけではなく、脚内核ニューロンのサブタイプに応じて異なった主入力を受けることを形態学的に証明したものである。外側手綱核へ投射することで行動学習への関与が予想される SOM および NOS 陽性ニューロンは線条体の直接路ニューロンからの入力を豊富に受けることから、脚内核を経由する直接路が行動学習に重要な機能を果たす可能性を示唆している。一方で、淡蒼球外節から脚内核への入力は、NOS および SOM ニューロンを標的とせず、視床の運動核へ投射する PV ニューロンに選択的な入力を与えていることから、従来から基底核の機能として知られる運動の制御に大きな貢献をしていることが考えられる。

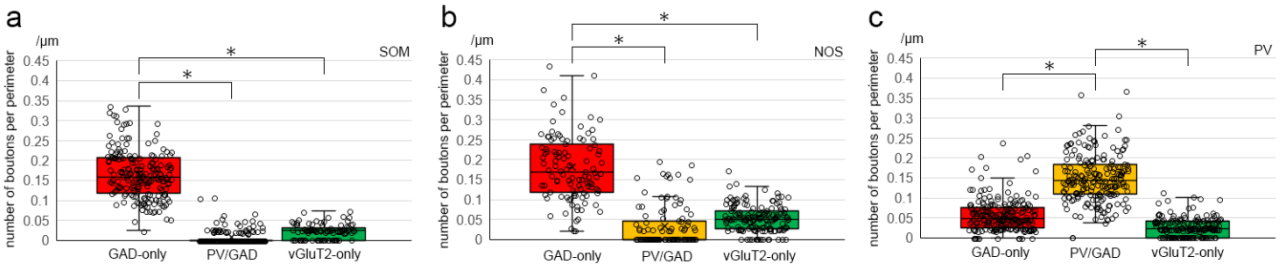


図 3. 脚内核ニューロンの細胞体上に局在する 3 種類のブトンの分布
SOM 陽性ニューロン（a）、NOS 陽性ニューロン（b）、PV 陽性ニューロン（c）の細胞体上に局在する GAD のみ陽性（線条体由来）、PV／GAD 二重陽性ブトン（淡蒼球外節由来）、vGluT2 陽性（視床下核由来）ブトンの単位周径当たりの数を示す。各ドットは一つの細胞体を表す。*p＜0.05（Tukey-Kramer test）。

最後に、脚内核の 3 種類のニューロンの形態学的所見を既知の遺伝学的所見と比較した。多くのデータにおいて一致していたが、一部の PV 陽性ニューロンが興奮性であり、しかも外側手綱核に投射するという遺伝子解析データについては、私がトレーサー注入と免疫組織化学により確認した PV 陽性ニューロンはすべて抑制性であり、視床の運動核に投射しているという形態学的所見とは異なっていた。この所見の不一致については、様々な要因が考えられるが今後の課題として解決していく必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行において、熊本大学大学院生命科学研究部形態構築学講座の福田孝一教授ならびに ICALS の高橋雪枝技術補佐には、電子顕微鏡に係る技術の習得に関してご指導を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

文　献

1） Miyamoto Y, Fukuda T. The habenula-targeting neurons in the mouse entopeduncular nucleus contain not only somatostatin-positive neurons but also nitric oxide synthase-positive neurons. Brain Struct Funct. 2021 Jun;226(5):1497-1510. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33787995 DOI:10.1007/s00429-021-02264-1

2） Miyamoto Y, Katayama S, Shigematsu N, Nishi A, Fukuda T. Striosome-based map of the mouse striatum that is conformable to both cortical afferent topography and uneven distributions of dopamine D1 and D2 receptor-expressing cells. Brain Struct Funct. 2018 Dec;223(9):4275-4291. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30203304 DOI:10.1007/s00429-018-1749-3