

博士学位論文審査要旨

2017年1月18日

論文題目：Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations

PV-Cre ラットモデルを用いた淡蒼球外節細胞の黒質ドーパミン細胞への抑制性入力 of 解明

学位申請者： 呉 胤美

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

副査： 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 研究開発推進機構 特定任用研究員（准教授） 廣川 純也

要 旨：

大脳基底核は大脳の深部に位置する神経核群の総称で、小脳とともに錐体路の運動系を修飾し、運動をスムーズに遂行するために重要である。その入力部である線条体からの抑制性投射ニューロンは、直接路ニューロンと間接路ニューロンに分けられるが、黒質緻密部からのドーパミン入力によって直接路ニューロンは活性化される一方、間接路ニューロンは活動が抑制される。このように黒質緻密部のドーパミン細胞は、大脳基底核の神経回路の働きを制御する重要な役割を果たしているが、ドーパミン細胞自体の活動がどのように調整されているかは不明である。そこで本研究は、そのような調整機能を担う神経回路を同定するため、prototypic neuron 群の一つであるパルブアルブミン (PV) ニューロンに焦点を絞り、淡蒼球外節 (GP) のPV ニューロンによる黒質緻密部への抑制性入力の存在を検証し、またその詳細を明らかにすることを目的とした。

まずGPの細胞タイプを蛍光免疫染色法により検証した後、GPから黒質への投射分布について、解析領域を黒質緻密部と黒質網様部の境界領域に絞り、軸策終末の数を定量的に比較した。その結果、境界領域では黒質緻密部へ投射するGP-PVニューロンの神経終末がはるかに多かった。また、ドーパミンニューロンに共発現するカルビンディン(CB)、コレシストキニン(CCK)、カルレチニン(CR)、一酸化窒素合成酵素(NOS)を免疫染色し、CB陽性ドーパミンニューロンへの投射はほぼ見られないことも確認した。つまり、GPのPVニューロンは黒質緻密部の網様部との境界領域の内、緻密部を好んで投射し、標的ニューロンにも選択性があることを見出した。また、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)の免疫染色によって黒質緻密部のドーパミンニューロンを標識したところ、多数のGP-PVニューロンの神経終末が、細胞体を取り囲むように密接していた。

THとGephyrinを免疫染色し、GP-PVニューロンの終末との重なりを共焦点顕微鏡を用い三次元的に撮影した結果、GP-PVニューロンが黒質緻密部のドーパミン細胞に抑制性シナプスを形成していることが形態学的に明らかになった。さらに黒質緻密部の細胞から電気応答を記録し、発火パターンと免疫組織化学によりドーパミン細胞であることを同定した。また、GPのPVニューロンが黒質緻密部のドーパミン細胞にGABAAレセプターを介して単シナプス性に抑制性入力をしていることを確かめた。

これらの結果から、GPのPVニューロンの黒質緻密部への投射は、①黒質緻密部背側層の中でも網様部との境界に近い部位を好んで投射し、②一つの細胞体に対してバスケット状に多数のシナプスを形成している、③GABAAレセプターを介してドーパミン細胞に抑制性入力をしている

ことが明らかになった。また電気生理学的検証により、GPの自発発火が線条体の間接路ニューロンによって抑制された後、その抑制から解放された際に投射先のドーパミン細胞を効率的に抑制することがわかった。本家級の成果を今後進展させ、ドーパミンニューロンのタイプごとに投射様式や生理的特性が明らかにすることにより、運動や学習における大脳基底核の役割や、パーキンソン病の病型分類や病態の理解が大きく進むことが期待できる。

よって本論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2017年1月18日

論文題目：Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations

PV-Cre ラットモデルを用いた淡蒼球外節細胞の黒質ドーパミン細胞への抑制性入力 の 解明

学位申請者： 吳 胤美

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

副査： 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 研究開発推進機構 特定任用研究員（准教授） 廣川 純也

要 旨：

博士論文提出者は、2012年4月に本学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻一貫制博士課程に入学し、現在在籍中である。主に脳組織標本を用いた神経回路の形態解析と電気生理学的測定に習熟しており、特に大脳基底核の神経回路に関する神経解剖学および神経生理学の知識を習得し、それら全てを活かした研究に従事した。本博士論文の内容は、*Brain Structure and Function* (2016年)に筆頭著者として既に掲載された (DOI: 10.1007/s00429-016-1346-2)。

2017年1月18日午後1時より約1時間半にわたり提出論文に関する審査会を行ない、提出者による英語でのプレゼンテーションと質疑応答を行なった。プレゼンテーションでは、研究の目的、方法、結果、結論、考察が適切に述べられ、質疑応答に関しても提出者の説明により十分な理解が得られたと考える。

更に審査会終了後、審査委員により論文内容ならびにこれらに関連する脳科学分野の諸問題について非公開の口頭試問を実施した結果、本論文提出者は研究者として十分な学力と、国際的に活躍するための語学力(英語)を有していることが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目： **Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations**

氏名： 吳胤美

要旨：

大脳基底核は大脳の深部に位置する神経核群の総称で、線条体、淡蒼球外節、淡蒼球内節、視床下核、黒質から構成されている。大脳基底核は小脳とともに錐体路の運動系を修飾し、運動をスムーズに遂行するための重要な働きを持つ。大脳基底核は入力部である線条体が大脳皮質と視床からの興奮性入力を受け、出力核である淡蒼球内節及び黒質網様部から視床に抑制性出力をすることで、運動を制御するネットワークを形成している。大脳基底核ネットワークには二つの経路があり、一つは運動を促進する働きを持つ直接路で、もう一つは運動を抑制する働きを持つ間接路である。入力部である線条体からの投射ニューロンは、神経伝達物質と投射先の違いにより2つに分類される。一つはGABAとサブスタンスPを含む直接路ニューロンであり、もう一つはGABAとエンケファリンを含む間接路ニューロンである。

直接路ニューロンは出力核に直接投射し、出力核を抑制する。出力核は常に視床を抑制しているため直接路ニューロンの抑制性入力により視床への抑制が解かれるため、運動を促進する働きを持つ。一方、間接路ニューロンは出力核への投射は淡蒼球外節及び視床下核を経由する。抑制性ニューロン群である淡蒼球外節による出力核への抑制は、線条体からの間接路ニューロン抑制性入力によって抑えられるため、出力核が視床を抑制し、運動を抑制する働きを持つ。黒質緻密部のドーパミンニューロンは線条体に広く投射している。ドーパミン入力によって直接路ニューロンはD1受容体を通して活性化される一方で、間接路ニューロンはD2受容体を介して発火が抑制される。このように黒質緻密部のドーパミン細胞は大脳基底核の神経回路の働きを制御する重要な役割を果たしている。

黒質緻密部には、線条体のストリオソーム領域の直接路ニューロンが投射していることがわかっている。また、間接路の中継核である淡蒼球外節から黒質緻密部への投射についてもいくつかの報告がある。マウスを用いた先行研究により、パルブアルブミン(PV)とLim-Homeobox 6(Lhx6)を有するニューロンが投射し、投射量はLhx6ニューロンが優位であると報告された。しかし、蛍光輝度による解析であったため、ドーパミンニューロンにシナプスしているかどうか、また投射による作用は明らかではない。一方、前述の報告ではPVとLhx6はそれぞれ独立したニューロン群として報告されたが、ラットを用いた研究では、PV陽性ニューロンは全てLhx6を共発現していると報告された。

近年、淡蒼球外節にはスキームに従い下降性の投射を持つPrototypic neuron群に加え、線条体にのみ投射するArky pallidal neuron群の存在が明らかになった。前者はPV及びLhx6を発現し、後者はFoxP2を発現する。そこで、まずは兼ねてより研究報告が多く、淡蒼球外節から下流に投射するprototypic neuron群の一つであるPVをクローズアップし、淡蒼球外節のPVニューロンが黒質緻密部に投射し、抑制性入力をしているという仮説をもとに検証を行った。

淡蒼球外節ニューロンから黒質への投射についての先行研究の多くは古典的な順行性トレーサーを用いており、通過線維を標識する可能性があった。そのため、可視化された投射が淡蒼球外節ニューロン以外に線条体からの投射線維である可能性を排除できなかった。

本研究では、PVにCreを組み込んだPV-Cre RatとCre特異的にチャンネルロドプシン(ChR2)と赤色蛍光タンパクであるtdTomatoを発現するアデノ随伴ウィルスベクター(AAV)を用いることによって、淡蒼球外節のPVニューロンを特異的に標識し、淡蒼球外節からの投射を解析することで通過線維を標識する可能性を排除した。

本実験に用いられたPV-Cre Ratは福島県立医科大学の小林和人教授よりご提供いただいたもので、PV-Cre Ratを用いた初めての研究報告となった。淡蒼球外節のPVニューロンにおけるCre発現率は86.05%がCre陽性であった。

淡蒼球外節のPVニューロンの可視化に先立ち、まず淡蒼球外節の全ニューロンの内、PVとLhx6の共発現について蛍光免疫染色法を用いて検証した。結果、淡蒼球外節の全ニューロンのうちPV陽性は38.80%、Lhx6陽性は57.31%であり、PV陽性ニューロンのうちLhx6との共発現は57.05%、Lhx6陽性ニューロンのうちPVとの共発現は44.37%であった。つまり、淡蒼球外節にはPV陽性/Lhx6陽性、PV陽性/Lhx6陰性、PV陰性/Lhx6陽性が存在した。これはPVとLhx6はそれぞれ独立しているという、マウスを用いた研究報告とも、PV陽性ニューロンは全てLhx6を共発現するという、ラットを用いた研究報告とも異なる結果であり、動物種によりポピュレーションの差が生じる可能性が示唆された。また、先行研究では淡蒼球外節の腹側領域を含んでいないため、結果に相違が生じたと考えられた。AAVにより可視化されたPVニューロンは、PV陽性/Lhx6陽性、PV陽性/Lhx6陰性であり、Lhx6のみを発現するニューロンは可視化されないことを確認した。よって、本研究により得られた結果は、淡蒼球外節のPV陽性/Lhx6陽性とPV陽性/Lhx6陰性の両ニューロンの投射によるものであると推察される。

黒質への投射分布に関する解析では、黒質緻密部背側層と黒質網様部において神経終末の数を定量的に解析した。先行研究では黒質緻密部と黒質網様部の境界線付近に投射が多いと報告された。しかし、境界線付近は黒質網様部の抑制性ニューロンと黒質緻密部のドーパミンニューロンが複雑に入り組んでおり、その標的が定かではない。本実験では解析領域を、黒質緻密部と黒質網様部との境界線を軸に、背側にある黒質緻密部背側層と、腹側にある黒質網様部の対称領域の、同面積各2層の計4層とした。結果、黒質緻密部背側層の境界線近傍領域にGP-PVニューロンの神経終末が優位な分布を認めた。加えて、ドーパミン細胞の細胞体表面付近に優位に終末することが明らかになった。また、ドーパミンニューロンに共発現するカルビンディン(CB)、コレシストキニン(CCK)、カルレチニン(CR)、一酸化窒素合成酵素(NOS)を免疫染色し、CB陽性のドーパミンニューロンへの投射はほぼ見られないことも確認した。以上から淡蒼球外節のPVニューロンは黒質緻密部の網様部との境界線近傍領域に投射し、投射領域と標的ニューロンに特異性があることを見出した。加えて、PVニューロンは黒質緻密部/網様部問わず、標的細胞の細胞体表面に終末しやすいことがわかった。

チロシンヒドロキシラーゼ(TH)の免疫染色によって黒質緻密部のドーパミンニューロンを標識したところ、GP-PVニューロンの神経終末様の膨らみが、細胞体を取り囲むようにいくつも観察された。本研究では黒質緻密部のドーパミンニューロンに近接する淡蒼球外節ニューロンの神経終末がシナプスを形成しているかどうかについて形態学的な解明を試みた。淡蒼球外節ニューロンは全てGABA作動性ニューロンであるため、GP-PVニューロンが形成するシナプスは抑制性シナプスである。そのため、ポストシナプスに抑制性ポストシナプティックマーカーであるGephyrinが発現する。以上から、ドーパミンニューロンの細胞膜上でGP-PVニューロンの神経終末とGephyrinの3つが重なれば、ドーパミンニューロンに抑制性シナプスを形成していることが証明される。今回、THとGephyrinを免疫染色し、GP-PVニューロンとの重なりを共焦点顕微鏡を用い三次元的に撮影した。結果、ドーパミン細胞表面で淡蒼球外節のPVニューロンの神

経終末との重なりが確認された。以上から、淡蒼球外節PVニューロンが黒質緻密部のドーパミン細胞に抑制性シナプスを形成していることが形態学的に明らかになった。

淡蒼球外節-黒質緻密部投射の作用については電気生理学にオプトジェネティクスを組み合わせ検証した。パッチクランプ法を用い、黒質緻密部の細胞から電気応答を記録し、発火パターンと免疫組織化学によりドーパミン細胞であることを同定した。PVニューロンに発現したChR2を通し、光刺激を与えることでPVニューロンの神経終末を活性化し、電気変化について検証した。100ミリ秒ごとに10回の刺激を与えた結果、一回目の刺激が強い抑制性シナプス後電流を引き起こした。淡蒼球外節は黒質緻密部にも隣接する黒質網様部に投射しているため、多シナプス性の入力による影響を排除する目的で、4AP (K⁺チャネル阻害剤)、TTX (Na⁺チャネル阻害剤)、CNQX (AMPA型グルタミン酸受容体阻害剤)、AP5 (NMDA型グルタミン酸受容体阻害剤) を投入した条件下で再度記録を取った結果、阻害剤投入前後で結果に変化は見られなかった。さらに、GABA_Aレセプターの阻害剤投入下で光刺激を与えた結果、PVニューロンの活性化に伴う電気応答は得られなかった。一連の結果から、淡蒼球外節のPVニューロンは黒質緻密部のドーパミン細胞にGABA_Aレセプターを介して単シナプス性に抑制性入力をしていることを電気生理学的に初めて記録した。

以上の結果から、淡蒼球外節のPVニューロンの黒質緻密部への投射は、①黒質緻密部背側層の中でも境界線に近い腹側層に優位に投射している、②一つの細胞体に対してバスケット状に多数のシナプスを形成している、③GABA_Aレセプターを介してドーパミン細胞に抑制性入力をしていることが明らかになった。黒質緻密部淡層球外節のPVニューロンは常に自発発火し、投射先を抑制している。本研究における電気生理学的検証においては10回の光刺激において、一定して抑制性後電流を記録するのではなく、1発目に強い抑制性後電流を記録した。つまり、自発発火が線条体の間接路ニューロンによって抑制された後、抑制から解放された際に、投射先のドーパミン細胞を抑制することが推測される。ドーパミン細胞による線条体への入力は直接路ニューロンに興奮性に、間接路ニューロンに抑制性に働くことで運動をより促進する作用を持つと考えられているが、一方で、直接路ニューロンからの黒質緻密部への抑制や、間接路ニューロンの抑制からの解放を受け、運動を制御する機構が存在する可能性を示唆する。

ドーパミンが運動のみならず、学習や認知機能にも深く関与している。しかし、ドーパミンニューロンの働きを制御する機構はまだ解明には至っていない。近年、淡蒼球外節から入力を受けるドーパミンニューロンは、線条体の尾側部に領域特異的に投射するという報告があり、本実験結果をもとに淡蒼球外節が優位に投射する領域のドーパミン細胞から入力を受ける領域とニューロンの特性を形態学的に同定し、ドーパミン入力による作用を電気生理学的に明らかにするなど、更なる展開が求められる。ドーパミンニューロンのタイプごとに投射様式や生理的特性が明らかになれば、運動や学習における大脳基底核の理解、パーキンソン病の病型分類や病態の理解が大きく進むことが考えられる。