

# 博士学位論文審査要旨

2018年1月24日

論文題目：Parvalbumin-producing Striatal Interneurons Received Excitatory Inputs onto Proximal Dendrites from Motor Thalamus in Male Mice  
線条体パルブアルブミン発現介在ニューロンは運動視床の入力を近位樹状突起に受ける

学位申請者： 中野 泰岳

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： 脳科学研究科 教授 坂場 武史

要 旨：

大脳皮質—大脳基底核—視床のループは行為選択や随意運動実行に関与しており、特に大脳基底核を成す線条体背外側部は運動機能と関わりが深い部位とされている。線条体は GABA 作動性の投射ニューロン (medium spiny neuron; MSN) が 77%–95%を占め、それ以外を GABA 作動性およびアセチルコリン作動性のインターニューロンが占めているが、このうち GABA 作動性のインターニューロンでは、パルブアルブミン発現ニューロン (PV ニューロン) が最も数が多い。PV ニューロンは線条体 MSN の出力のコントロールに強く影響を与えられていることから、PV ニューロンがどのような興奮性入力を受けて活動しているかを理解することは大脳基底核回路の理解に重要である。そこで本研究は、大脳皮質二次運動野からの興奮性入力と、VA/VL (ventral anterior / ventral lateral)核からの興奮性入力とが線条体内のどの領域に投射し、また、PV ニューロンの樹状突起のどの位置に入力されるかを形態学的に解明することを目的とした。

この目的のためにパルブアルブミンのプロモーター配下に myrGFP-LDLRct 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (PV-FGL マウス) を用いた。また運動皮質及び運動視床核から投射する軸索は順行性ウィルストレーサーの AAVdj-CAG-hChR2-H134R-tdTomato を用いて標識した。そして共焦点顕微鏡を使用し PV ニューロンの細胞体から樹状突起の終端までを辿りながら、PV ニューロンと標識軸索の近接構造を調べた。その結果、①運動視床は線条体 PV ニューロンの近位樹状突起に対し好んで投射し、運動皮質は樹状突起の全体に一樣に投射すること、②VGluT2 (視床由来の軸索終末) 陽性の軸索終末は線条体 PV ニューロンの近位樹状突起に対し好んで投射し、VGluT1 (大脳皮質由来の軸索終末) 陽性の軸索は樹状突起の全体に均一な投射すること、③VGluT2 と VGluT1 はいずれも PV ニューロンの細胞体に投射し、VGluT2 の VGluT1 に対する密度比は樹状突起の 60  $\mu\text{m}$  以降の密度比と比べ細胞体で有意に高いことがわかった。これらの結果は、線条体の背外側部においては PV ニューロンは入力元の領域に拘らず視床からは樹状突起の近位に、大脳皮質からは樹状突起の全体に投射を受けることを示しており、線条体 PV ニューロンへの興奮性入力は視床と大脳皮質で形態学的に異なることが明らかとなった。

本研究が示した樹状突起上の均一な投射分布から、大脳皮質は PV ニューロン樹状突起の局所的な興奮/抑制のバランスを調整する modulator の役割を有する可能性が高い。今後 PV ニューロンをサブグループに分類し、それらへ対する視床や大脳皮質からの興奮性入力を明らかにする

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

2018年1月24日

論文題目：Parvalbumin-producing Striatal Interneurons Received Excitatory Inputs onto Proximal Dendrites from Motor Thalamus in Male Mice  
線条体パルブアルブミン発現介在ニューロンは運動視床の入力を近位樹状突起に受ける

学位申請者： 中野 泰岳

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： 脳科学研究科 教授 坂場 武史

要 旨：

博士論文提出者は、2013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、*Journal of Neuroscience Research* (2018年) に筆頭著者として既に掲載された (DOI: 10.1002/jnr.24214)。

2018年1月17日午後1時30分より約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1月23日午後5時より、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：Parvalbumin-producing Striatal Interneurons Received Excitatory Inputs onto Proximal Dendrites from Motor Thalamus in Male Mice  
線条体パルブアルブミン発現介在ニューロンは運動視床の入力を近位樹状突起に受ける

氏名：中野 泰岳

要旨：

大脳皮質・大脳基底核・視床ループは行為選択や随意運動実行に関与している。げっ歯類の線条体背外側部はこのうち運動機能と関わりが深い部位とされ、大脳皮質の一次運動野・二次運動野 (Kunishio and Haber, 1994; Parent and Hazrati, 1995; Voorn et al., 2004) や、運動視床である VA/VL (ventral anterior / ventral lateral) 核、および、視床髄板内核群・正中線核群 (Bentivoglio et al., 1991; Groenewegan and Berendse, 1994; Mengual et al., 1999; Van Der Werf et al., 2002; Unzai et al., 2015) から興奮性シナプス入力を受ける。VA/VL 核は大脳基底核の出力核である黒質網様部から抑制性投射を受け、線条体に投射する (Kuramoto et al., 2009)。線条体は GABA 作動性の投射ニューロン (medium spiny neuron; MSN) が 77 - 95% を占め、それ以外を GABA 作動性のインターニューロンおよびアセチルコリン作動性のインターニューロンが占める (Shepherd, 1990)。このうち GABA 作動性のインターニューロンは、パルブアルブミン発現ニューロン (PV ニューロン)・nitric oxide synthase/ソマトスタチン/neuropeptide Y (NPY) 発現ニューロン・カルレチニン発現ニューロンなどに分類される (Tepper and Bolam, 2004)。インターニューロンのうち、PV ニューロンは最も数が多く、線条体内の MSN を主な標的として抑制し線条体の出力を制御している (Koos and Tepper, 1999; Kubota and Kawaguchi, 2000; Koos et al., 2004; Gittis et al., 2010; Planert et al., 2010)。PV ニューロンは線条体 MSN の出力のコントロールに強く影響を与えていることから、PV ニューロンがどのような興奮性入力を受けて活動しているかを理解することは大脳基底核回路の理解に重要である。

これまでの研究から、これら線条体 PV ニューロンは大脳皮質と視床双方から興奮性の入力を受けることが知られている (Rudkin and Sadikot, 1999; Sciamana et al., 2013)。本研究では大脳皮質二次運動野からの興奮性入力と、VA/VL 核からの興奮性入力とが線条体内のどの領域に投射し、また、PV ニューロンの樹状突起のどの位置に入力されるかを形態学的に解明することを目的とした。

本研究ではこの目的のためにパルブアルブミンのプロモーター配下に myrGFP-LDLRct 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (PV-FGL マウス) を用いた (Kameda et al., 2008; Kameda et al., 2012)。myrGFP-LDLRct は細胞体及び樹状突起の細胞膜に GFP を局在させることができるため、軸索・樹状突起間の微小構造の観察において有用である。PV-FGL マウスの線条体を免疫組織化学により観察した結果、PV 陽性ニューロンのうち 95.5% が GFP を発現し、且つ GFP 発現ニューロンの 93.3% が PV を発現していた。この結果は、PV-FGL マウスの GFP は PV ニューロンに特異的に発現することを示しており、本研究に非常に有用であると判断した。

運動皮質及び運動視床核から投射する軸索は順行性ウィルストレーサーの AAVdj-CAG-hChR2-H134R-tdTomato を用いて標識した。運動視床 (VA/VL 核) へ注入した順行性ウィルストレーサーは注入部位に存在する細胞体を標識し、一次/二次運動野の I・III・V 層

および線条体背外側部に分布する軸索を標識した。一方、二次運動野へ注入した順行性ウィルストレーサーは線条体背外側部・中央部および運動視床を含む視床の広範囲に投射する軸索を標識した。線条体背外側領域では、これら視床および皮質から投射される軸索分布が重なっており、運動視床および二次運動皮質からの入力収束することが確認された。この運動視床と二次運動野の入力が重なる領域で、PVニューロンへの軸索投射を調べた。視床・大脳皮質からの軸索終末にはVGLuT2・VGLuT1がそれぞれ存在し、いずれもシナプス後部には興奮性のシナプス後肥厚のマーカであるPSD95を有する。本研究ではこのVGLuTを有する軸索終末と、PSD95を有する樹状突起の接触を、推定上のシナプスとして“近接構造”と定義した。その上で、共焦点顕微鏡を使用しPVニューロンの細胞体から樹状突起の終端までを辿りながら、PVニューロンと標識軸索の近接構造を調べた。

線条体PVニューロンに近接する求心性軸索投射について、軸索終末のサイズおよび終末ボタンが近接する樹状突起の直径を調べた。これらはシナプス効率に影響を与えるために重要である。結果として、軸索終末のサイズについては視床終末が $0.73 \pm 0.22 \mu\text{m}$  (N = 189)、皮質終末が $0.69 \pm 0.22 \mu\text{m}$  (N = 218)で両者に有意な差は見られなかった。また、近接構造が観察された位置のPVニューロンの樹状突起直径は視床入力部位が $0.91 \pm 34 \mu\text{m}$  (N = 189)、皮質入力部位が $0.87 \pm 0.29 \mu\text{m}$  (N = 218)で両者に有意な差は見られなかった。

次に、運動視床・運動皮質投射の線条体PVニューロンへの入力位置を確かめるため、樹状突起を細胞体からの距離に基づいて $10 \mu\text{m}$ ごとの区間に分割し、それぞれの区間における近接構造の密度を算出した。この結果、視床入力の密度は、細胞体から約 $20 \mu\text{m}$ までの近位樹状突起で有意に高かった (N = 189)。一方、皮質入力の密度は細胞体からの距離によらず一様だった (N = 218)。

次に、PVニューロンへの運動関連領域以外を含む皮質及び視床入力の全量を定量的に解析するために、免疫組織化学を用いて大脳皮質・視床の軸索終末をそれぞれVGLuT1・VGLuT2で染色した。GFP (PVニューロン)・VGLuT1 (大脳皮質由来の軸索終末)・VGLuT2 (視床由来の軸索終末)・PSD95 (興奮性シナプスのポストシナプスマーカー) の4重免疫染色を行い樹状突起への入力を観察した。その結果、運動関連領域由来の入力と同じく、視床入力がPVニューロンの近位樹状突起に有意に多く存在したのに対し (N = 512)、皮質入力は樹状突起の全体に一様な分布を示した (N = 1160)。さらに、PVニューロンの細胞体へのVGLuT1 (N = 199) およびVGLuT2 (N = 124) 陽性の近接構造の密度を調べた。同一の箇所でもVGLuT2陽性の近接構造の密度とVGLuT1陽性の近接構造の密度の比率 (VGLuT2密度 / VGLuT1密度) を算出したところ、細胞体と近位樹状突起において、遠位樹状突起と比べ有意に高い値を示した。

以上の結果から、①運動視床は線条体PVニューロンの近位樹状突起に対し好んで投射し、運動皮質は樹状突起の全体に一様に投射すること、②VGLuT2陽性の軸索終末は線条体PVニューロンの近位樹状突起に対し好んで投射し、VGLuT1陽性の軸索は樹状突起の全体に均一に投射すること、③VGLuT2とVGLuT1はいずれもPVニューロンの細胞体に投射し、VGLuT2のVGLuT1に対する密度比は樹状突起の $60 \mu\text{m}$ 以降の密度比と比べ、細胞体で有意に高いことが示された。

順行性トレーサーの実験は視床の特定の領域のみからの入力を見ることができるのに対し、免疫染色の実験は投射元の領域の違いによる差異が混在してしまう代わりに入力の全量を見ることができる。これらの結果が類似の傾向を示したことは、線条体の少なくとも背外側部においてはPVニューロンは入力元の領域に拘らず視床からは樹状突起の近位に、大脳皮質からは樹状突起の全体に投射を受けるといった傾向をもつことを示しており、線条体PVニューロンへの興奮性入力は視床と大脳皮質で形態学的に異なることが明らかとなった。

PVニューロンの樹状突起における膜電位伝導が少なくとも閾値下では受動的であると仮定すれば、視床の近位樹状突起への投射は、後シナプス電位が細胞体に到達するまでの減衰を起り難しく、結果としてより大きな駆動力に寄与することが推察される。したがって、視床入力は

PV ニューロンに対して **driver** としての働きを持つ可能性が考えられる (Shermann and Guillery, 1998; Lee and Sherman, 2010)。これと対照的に、大脳皮質が線条体 PV ニューロンに影響を与えるためには多数のニューロンの同期的・連続的な活動が必要であることと (Kincaid et al., 1998; Stern et al., 1998; Wilson and Groves, 1981; Wilson, 1992)、本研究で明らかにされた、樹状突起上の均一な投射分布から考えると、大脳皮質は PV ニューロン樹状突起の局所的な興奮/抑制のバランスを調整する **modulator** の役割を有する可能性がある。

今後、大脳皮質及び視床の線条体入力について以下の解明が求められる。①線条体への投射が密である大脳皮質 5 層の錐体細胞は **pyramidal tract type (PT)** ニューロンと **intratelencephalic type (IT)** ニューロンという異なる種類に分類されることが知られているが (Reiner et al., 2003, 2010; Lei et al., 2004; Chen et al., 2005; Morishima and Kawaguchi, 2006; Molyneaux et al., 2007; Shepherd, 2013)、本研究のデータにはそれらの入力が混在しており、これを検討した場合、大脳皮質から線条体 PV ニューロンへの入力はサイズや入力位置が異なる分布を示す可能性がある。②MSN は大脳基底核の出力核である脚内核・黒質網様部へ直接投射を行う直接路ニューロン (**direct MSN; dMSN**)、淡蒼球外節を介して間接的に出力核に投射する間接路ニューロン (**indirect MSN; iMSN**) に分かれ、それぞれ異なる機能を有する (Alexander and Crutcher, 1990; Hikosaka et al., 2002; Graybiel, 2005; Doyon et al., 2009)。近年の研究で、ラットでは、PV ニューロンのサブグループは iMSN に好んで投射を行うことが報告された (Garas et al., 2016)。本研究においては線条体の PV ニューロンを単一の集団とみなしたが、PV ニューロンは今後異なる機能をもつサブグループに分類される可能性があり、これらへ対する視床や大脳皮質からの興奮性入力が異なるかどうかは基底核の機能の理解にとって重要であり、将来的な課題である。