

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 μ 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撮り、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 μ 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 μ 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)