

学位番号乙第 2660 号

学位申請者 : 村 上 邦 夫

主 論 文 : Localization of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity on GABAergic interneurons in layers I–III of the rat retrosplenial granular cortex

(ラット膨大部後顆粒皮質 I–III 層の GABA 作動性介在ニューロンにおける $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の局在)

著 者 : Kunio Murakami, Youichi Ishikawa, Fumi Sato

公 表 誌 : Neuroscience 252 : 443–459, 2013

論文内容の要旨 :

【背景と目的】

ラット膨大部後顆粒性皮質 (RSG) は、海馬、視覚野や辺縁視床核から入力を受け、それら情報の統合において、重要な役割を演じる。さらに、RSG I～III 層は、内側中隔-対角帯 (MS-DB) という コリン作動性前脳基底部 (CBF) から投射線維を受けることが知られている。しかしながら、CBF から RSG への投射に関する詳細な報告はない。一方、アセチルコリン (ACh) は、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7nAChR$) を介して GABA 作動性介在ニューロンの作用を修飾することが示唆されているものの、CBF 入力を受ける RSG I～III 層において、 $\alpha 7nAChR$ が局在する GABA 作動性介在ニューロンのサブタイプの詳細や細胞内分布については明らかにされていない。このため、本研究は、CBF 投射領域の RSG における GABA 作動性介在ニューロン上での $\alpha 7nAChR$ の局在の有無と分布を明らかにし、皮質内抑制調節機構の一端を解明する形態学的証左を得る目的で行った。

【材料・方法】

生後 10 週齢の雄ラットを用いて、3 種類の実験を行った。

実験 1 では、順行性トレーサーPHA-L による神経追跡と、いくつかのコリン作動性標識抗体（コリンアセチルトランスフェラーゼ、小胞性アセチルコリン輸送体、高親和性コリン輸送体、p75 ニューロトロフィン受容体）による免疫組織化学的標識法を用いて、MS-DB から RSG への CBF 投射様式の特徴を明視野および蛍光顕微鏡を用いて解析した。

実験 2 では、 $\alpha 7nAChR$ の局在の確認を得るため 2 種類の方法（ $\alpha 7nAChR$ 抗体と Alexa-488 を結合した $\alpha 7nAChR$ の特異的拮抗薬 = α -ブングロトキシン-蛍光試薬: Alexa- α BTX）で標識し、さらに、同一切片から RSG I ~ III 層に分布する GABA 作動性介在ニューロンのサブセットを各種の抗体（グルタミン酸脱炭酸酵素: GAD、パルプアルブミン: PV、リーリン=イオンチャネル型セロトニン受容体をもつ GABA 作動性ニューロンの発現タンパク: R1n）で二重標識することにより、それら介在ニューロンにおける $\alpha 7nAChR$ 発現部位を共焦点蛍光顕微鏡を用いて検索した。

実験 3 では、 $\alpha 7nAChR$ 抗体を用いた包埋前金標識法で電顕試料を作成し、GAD 陽性と PV 陽性神経細胞における $\alpha 7nAChR$ の局在について電顕を用いて解析した。

【結果】

実験 1 では、RSG の I a 層と II/III 層に分布する PHA-L 標識 BF 終末とコリン作動性標識線維のパターンが酷似しており、これらの層が MS-DB から特異的に CBF 入力を受けることが明らかになった。

実験 2 では、2 種類の $\alpha 7nAChR$ 標識方法（ $\alpha 7nAChR$ 抗体と Alexa- α BTX）を用いたが、そのどちらにおいても RSG I ~ III 層の GAD 陽性、PV 陽性、R1n 陽性、PV 陰性介在ニューロン群の細胞体や樹状突起に受容体が局在していることを確認した。中でも、Alexa- α BTX を用いた所見では、II/III 層の PV 陽性介在ニューロンの細胞体と I 層へ伸びる樹状突起に $\alpha 7nAChR$ の発現が顕著に観察された。また、同一切片の海馬 CA1 多形細胞層の PV 陽性介在ニューロンにおいても同様の所見が観察された。

実験 3 では、 $\alpha 7nAChR$ は、RSG I ~ III 層内の GAD 陽性と PV 陽性ニューロンの細胞体および樹状突起や軸索終末に、さらに、これら介在ニューロンとシナプス結合する GAD もしくは PV 陽性終末にも $\alpha 7nAChR$ が発現していることが明らかになった。これは、GABA 陽性介在ニューロンの GABA 作動性調整に $\alpha 7nAChR$ の関与を示唆している。

【考察】

本研究によって、RSG の I ~ III 層が CBF 線維終末の分布領域であり、同領域における特定のサブタイプの GABA 作動性介在ニューロン（GAD 陽性、R1n 陽性介在ニューロン、特に、PV 陽性介在ニューロン）が $\alpha 7nAChR$ を発現するという直接的証拠を得た。これにより、CBF 終末から放出される ACh は $\alpha 7nAChR$ を介して、RSG I ~ III 層内の特定の GABA 作動性介在ニューロンの活動（抑制もしくは脱抑制など）の修飾とそれに伴う錐体細胞の活動の調節に関与する可能性が示唆された。

1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2660 号	氏 名	村 上 邦 夫
論文審査担当者	主 査	黒 田 優
	副 査	高 松 研
	副 査	周 郷 延 雄
	副 査	赤 羽 悟 美
	副 査	三 上 哲 夫
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>膨大後皮質（顆粒性皮質：RSG）は、視床前核群、海馬、さらには視覚野等との相互性線維連絡を有するとともに、前脳基底部からコリン作動性入力を受けている。RSG を中心とするこれらの神経領域は、生理学的研究、破壊・行動実験、疾患に基づく研究等から、学習・記憶、空間認知、空間行動といった高次神経機能の少なくとも一部と関与していることは確実である。また、アルツハイマー病では、$\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体（$\alpha 7nAChR$）の発現量や機能が低下していることもわかっている。しかし、これら認知機能や病態の詳細な解明には、多方面からのさらなる研究成果の集積と進展が必須である。</p> <p>このような背景の下、申請者は前脳基底部に由来するコリン作動性神経終末から放出されるアセチルコリンを受容する皮質細胞の実像、即ち、RSG における $\alpha 7nAChR$ を有する神経細胞およびその細胞内分布について、共焦点レーザー顕微鏡と免疫電顕を駆使して検索した。特に、これまで報告のない、抑制性インターニューロンのどのサブタイプに $\alpha 7nAChR$ が発現しているのかという点に注目して研究を進めた。</p> <p>始めに、前脳基底部から RSG に至るコリン作動性線維の投射様式を検証するために、生後 10 週齢の雄性ウィスターラットを使用し、順行性トレーサーの PHA-L による神経標識法と複数のコリン作動性標識抗体を用いた免疫組織化学的標識法による検索を行った。この結果、PHA-L 標識線維とコリン作動性標識線維はともに RSG の I a 層と II/III 層内で全く同様な走行・分布パターンを示したことから、RSG I ~ III 層が前脳基底部コリン作動性線維の皮質ターゲットであることを確認した。</p> <p>次に、前脳基底部コリン作動性線維の投射領域である RSG の上顆粒細胞層（I ~ III 層）内に存在する抑制性介在ニューロンのどのサブタイプに $\alpha 7nAChR$ が局在するのか、さらに、存在するならばどのような分布を取るのかを究明するために、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた蛍光二重免疫染色法によって検索した。その結果、GABA 作動性抑制性インターニューロンのうち、パルブアルブミン (PV) やリーリン陽性の細胞体および近位樹状突起に $\alpha 7nAChR$ が局在していることを観察した。さらに、この抑制性インターニューロンにおける $\alpha 7nAChR$ の微細構造的局在および分布を検索するために、$\alpha 7nAChR$ 抗体を用いた包埋前コロイド金標識法と抗グルタミン酸脱炭</p>		

酸酵素 (GAD) 抗体または抗 PV 抗体を用いた包埋前ペルオキシダーゼ標識法による二重免疫電顕法を駆使して実験を進めた。その結果、GAD または PV 陽性を示す DAB 反応産物が細胞体、樹状突起、神経終末に観察され、 $\alpha 7nAChR$ 陽性を示す銀増感金粒子は DAB 標識抑制性インターニューロンの細胞体や樹状突起のみならず、神経終末にも確認された。従って、RSG における上顆粒細胞層内の GABA 作動性インターニューロンのうち、PV 陽性細胞が $\alpha 7nAChR$ を有していることを明らかにするとともに、この共発現を示す細胞体に共発現している神経終末が対称性シナプスを形成する像を確認した。さらに、 $\alpha 7nAChR$ の細胞内分布としては、抑制性介在ニューロン全体への分布を示し、しかも密に局在していることを明らかにした。

本論文において、RSG 内の GABA 作動性インターニューロンのうち、少なくとも PV およびリーリン陽性細胞は $\alpha 7nAChR$ を有しており、前脳基底部コリン作動性線維を直接受けていることを初めて明らかにした。さらに、電顕によるシナプス接続様式の詳細な検索から、前脳基底部コリン作動性投射線維を受ける特定の GABA 作動性インターニューロンの抑制もしくは脱抑制を介して、興奮性錐体細胞の活動を調節していることが示唆された。

次に、12 月 24 日に書面審査 1 名を含む 5 名の審査員により公開審査会が開催され、申請者による論文内容の説明の後、質疑応答がなされた。主だった質問は、 $\alpha 7nAChR$ に着目した理由、検索した抑制性インターニューロンのサブタイプの選定理由、偽陰性を示す可能性の大きい包埋前金コロイド法を用いた理由、 $\alpha 7nAChR$ 陽性と判定した銀増感金粒子の数や密度の判断基準について、神経伝達物質のシナプス間隙からの漏出 (spill over) 現象およびグリア細胞が関わる異所性放出について、また、RSG の機能はラット等の実験動物に基づく研究結果によるものでヒトにも合致するのか、この形態学的研究成果が RSG の関わる高次脳機能にどのように寄与するのか等々、手法から機能にわたる種々の質問がなされた。これに対して、アルツハイマー病で $\alpha 7nAChR$ の発現量や機能の低下が証明され、 $\alpha 7nAChR$ は大変注目されている受容体ゆえに着眼したものであり、抑制性インターニューロンのサブタイプの絞り込みは、既報の上顆粒細胞層内のサブタイプに焦点を絞ったものであると回答された。包埋前金コロイド法を用いたのは予備実験で安定した方法と確認したからであり、 $\alpha 7nAChR$ 陽性の判定は一定面積における一定粒子数をもって陽性と判定したとの回答があった。さらに、RSG の空間記憶やナビゲーション等の機能については、ヒトにおいても同じ機能の座となっており、研究手法の限界のため推測の域を出ない回答もあったものの、申請者は自らのこれまでの研究結果や文献的知識に基づいて概ね合理的かつ妥当な回答をした。

以上の結果を踏まえ、審査員の総意として、この研究成果は RSG の関わる高次脳機能のメカニズムの解明にも重要な貢献が期待されるものであり、学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。

