

氏名	とみ おか りょう へい 富 岡 良 平
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2861 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Demonstration of long - range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex (大脳新皮質の領域を越えて投射する GABA 作動性神経細胞の分布、形態に 関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 河 野 憲 二 教 授 大 森 治 紀 教 授 高 橋 良 輔

### 論 文 内 容 の 要 旨

大脳皮質ニューロンの20%はGABA作動性であり、様々なサブグループに分類されるが、主として局所に軸索を投射する抑制性介在ニューロンであると考えられてきた。しかし最近、他の皮質領域に長距離の投射をするGABA作動性ニューロンの存在が報告された。本研究では、これらの長距離投射型GABA作動性ニューロンが形成している神経回路を解明するために、遺伝子改変マウスを用いて実験を行った。

逆行性トレーサーであるFast Blue (FB)をGAD67-GFPノックインマウスの体性感覚野、運動野、視覚野に注入し、逆行性に標識されたGFP陽性ニューロン(即ちGABA作動性ニューロン)の分布を観察した。多くのFB/GFP二重陽性ニューロンが注入部位近傍で観察されたが、注入部から1.5mm以上離れた皮質領域でも二重陽性ニューロンが見出された。この結果はマウスの大脳皮質に長距離投射型GABA作動性ニューロンが存在していることを示していた。次に、どのGABA作動性ニューロンのサブグループが長距離投射型であるのかを検討するために、parvalbumin (PV), somatostatin (SS), calretinin (CR)等のサブグループマーカーを用いてFB/GFP二重陽性ニューロンとの共存関係を免疫蛍光法により調べた。注入部位から1.5mm以上遠位の皮質領域では90%以上のFB/GFP二重陽性ニューロンがSS陽性であったのに対し、1.5mm以内では二重陽性ニューロンの32%, 39%, 29%がそれぞれPV, SS, CRを発現していた。さらに遠位皮質領域で観察されたFB/GFP/SS三重陽性ニューロンの層分布を調べたところ、その分布はSS陽性ニューロンの層分布と異なっていたため、SS陽性ニューロンにはサブグループが存在し、あるサブグループが長距離投射型GABA作動性ニューロンに一致するのではないかと考えた。そこでSS陽性ニューロンのサブグループマーカーであるNeuropeptide Y (NPY), neuronal NOS (nNOS), calbindin (CB)に注目し、長距離投射型GABA作動性ニューロンを調べると、これらのうち80%以上がNPYを、70%以上がnNOSを発現していたが、ほとんどのニューロンはCBを発現していなかった。

次に、長距離投射型GABA作動性ニューロンが形成している神経回路を観察するために、2つの実験観察を行った。

- 1) 大脳皮質由来細胞にのみCre recombinaseを発現しているEmx1-Creノックインマウスの胎仔にアデノウイルス(Ad CAG loxP GAP43-GFP loxP)を感染させてGABA作動性ニューロン(ganglionic eminence由来で、皮質由来ではない)のみを特異的に標識する方法を確立した。多くの感染ニューロンはGABA作動性ニューロンに特徴的な無棘性の樹状突起を有し、近傍にのみ軸索を投射するタイプの介在ニューロンであったが、いくつかの無棘性ニューロンにおいては局所の皮質野を越えて投射する軸索が観察され、それらの軸索は数本に分岐して広く皮質領域に投射していることがわかった。
- 2) 小胞性グルタミン酸トランスポーター(VGluT)に対する抗体は興奮性軸索終末を標識でき、大脳皮質ではVGluT1は皮質由来の、VGluT2は視床由来の興奮性軸索終末マーカーとして使用できる。これらの抗体を用いて、どの種類のVGluT陽性軸索終末が長距離投射型GABA作動性ニューロンに入力するのかを共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡によって調べたところ、長距離投射型GABA作動性ニューロンにはVGluT1陽性軸索終末が主に入力し、これらのニューロンが興奮性皮質ニューロンにより駆動されていたことが推測された。

今回の実験から、長距離投射型 GABA 作動性ニューロンが大腦新皮質に存在し、それらの多くは SS, NPY, nNOS を発現しているサブグループに属することが明らかになった。さらに、これらのニューロンが皮質の興奮性ニューロンに駆動されて、広汎な皮質領域に抑制性的影響を与える神経回路を形成していることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

大腦皮質ニューロンの約20%は GABA 作動性であり、いくつかのサブグループに分類されるが、主に局所に軸索を投射する介在ニューロンであると考えられてきた。本研究では、最近報告された長距離投射 GABA ニューロンについて、それらが 1) どのサブグループに属するか、2) どのような神経回路を形成しているか、ということについて遺伝子改変マウス等を用いて検討している。

1) GABA ニューロンが蛍光蛋白質で標識された GAD67-GFP ノックインマウスを用いて、逆行性蛍光トレーサーを皮質に注入し、注入部位から 1.5mm 以上離れた皮質領域で標識された GABA ニューロンを免疫蛍光法で調べたところ、その多くが somatostatin, neuropeptide Y, neuronal NO synthase を産生する GABA ニューロンであり、皮質 II 層と VI 層に分布していた。さらに、Emx1-Cre ノックインマウスの胎児にアデノウイルスベクター感染させ、皮質 GABA ニューロンをゴルジ染色様に標識したところ、長い軸索突起を有する GABA ニューロンが II 層と VI 層に見出された。2) 長距離投射 GABA ニューロンに対する入力を小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGluT) に対する抗体を用いて調べると、皮質由来の VGluT1 陽性軸索終末は長距離投射 GABA ニューロンに入力していたが、視床由来の VGluT2 陽性終末は入力しなかった。

以上の研究は、皮質 GABA ニューロンの特定のサブグループが、興奮性皮質ニューロンに駆動されて、離れた皮質部位に抑制性的影響を与えることを明らかにし、大腦皮質機能の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成17年2月14日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。