

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	越 水 義 登
論文題目	A quantitative analysis of axon bouton distribution of subthalamic nucleus neurons in the rat by single neuron visualization with a viral vector（ウイルスベクターによる単一ニューロンレベルの可視化法を用いた、ラット視床下核ニューロンの軸索終末分布の定量的解析）		
（論文内容の要旨） 本研究では視床下核ニューロンを単一細胞レベルで可視化して軸索終末様構造の数を定量的に調べることにより、視床下核ニューロンが大腦基底核において果たす役割を解剖学的な視点から明らかにしようとした。視床下核は大腦基底核に属し、主に、黒質、淡蒼球外節や脚内核（淡蒼球内節）に軸索を送っている。しかし、大腦基底核で唯一の興奮性細胞である視床下核ニューロンが投射先でどのような特徴を持って軸索終末を分布させているかは分かっていない。そこで、視床下核ニューロンを軸索の末端まで可視化するために順行性トレーサーとして膜移行性緑色蛍光蛋白質（palGFP）を発現するシンドビスウイルスを用いた。単一の視床下核ニューロンを標識するために、palGFPを発現するシンドビスウイルスを含む溶液を適切に希釈してラット視床下核の両側にそれぞれ注入した。注入後2日経った後にラットを灌流固定し、全脳を取り出し、矢状断に40 μmの切片にした。蛍光顕微鏡下でpalGFPの蛍光を利用して視床下核ニューロンの単一感染を確認した後、palGFPを抗GFP抗体で免疫染色し、diaminobenzidineで茶色に可視化した。さらに、線条体、淡蒼球外節、脚内核、黒質はカルビンディンの免疫活性の強弱で2つのコンパートメントに分けることができるので、抗カルビンディン抗体と alkaline phosphatase 法を用いて青色に免疫染色した。 86匹のラット（172半球）から10個の視床下核ニューロンの単離に成功した。10個のニューロンの内、8ニューロンが黒質+脚内核、淡蒼球外節、線条体に同時に投射しており、視床下核ニューロン1個当たりの軸索終末数は淡蒼球外節で平均457、黒質で400、背側線条体で126、脚内核で106であった。また、これらの終末のほとんどが興奮性シナプスを形成していることも電顕的に確認した。従来、視床下核の主な投射先は黒質、脚内核および淡蒼球外節だと考えられていたが、本研究の結果は視床下核ニューロンの線条体投射が黒質、脚内核や淡蒼球外節への投射と同程度の頻度で見いだされること、その軸索終末投射量は脚内核と同程度以上であることを示し、線条体は視床下核の主な標的核の一つであると結論された。 次に、視床下核ニューロンの軸索終末分布の特徴を明らかにするために、視床下核ニューロンの主要な投射先である線条体、淡蒼球外節と黒質+脚内核を一辺40 μmの立方体に分け、視床下核ニューロンが形成した終末様構造の分布密度を調べると、視床下核ニューロンの軸索終末の分布密度は淡蒼球外節で最も高く、黒質+脚内核、線条体の順番であった。淡蒼球外節と黒質+脚内核は同程度の細胞密度を持つことを考え合わせると、上記の結果は、受け手の1ニューロンから見た場合に視床下核が間接経路上で下流にある黒質+脚内核よりも上流にある淡蒼球外節ニューロンを強く神経支配していることを意味する。パーキンソン病などで見られる同期振動現象が視床下核-淡蒼球外節間の相互結合回路において生成されることを考慮すると、視床下核から淡蒼球外節への密な投射が病的状態下での同期振動現象の発現に強く関与することが示唆される。 最後に、視床下核ニューロンはカルビンディンの免疫活性の強弱で分けられたサブコンパートメントに対して特定のコンパートメントに限られた投射をしなかった。このような			

投射様式と視床下核ニューロンの多くが基底核内の主要核すべてに分岐して同時投射することを考え合わせると、視床下核は基底核の活動を全体的に制御する神経核であると推測される。
（論文審査の結果の要旨）
本研究では、視床下核ニューロンを単一細胞レベルで可視化して投射先のニューロンとシナプスしていると考えられる軸索終末様構造の数を定量的に調べることににより、視床下核ニューロンが大腦基底核において果たす役割を解剖学的な視点から明らかにすることを試みた。視床下核ニューロンの軸索末端まで単一ニューロンレベルで標識するために、膜移行性緑色蛍光蛋白質を発現するシンドビスウイルスベクターをトレーサーとして用いた。その結果、10 個の標識ニューロンの内、大多数が黒質、脚内核、淡蒼球外節、線条体に同時に投射しており、1 視床下核ニューロン当たりの軸索終末数は淡蒼球外節で最も多く、黒質、線条体、脚内核の順であった。これらの主要な投射先で軸索終末の分布密度は淡蒼球外節で最も高く、黒質＋脚内核、線条体の順番であった。さらに、淡蒼球、黒質、脚内核にはカルビンゲン免疫活性により内部構造が認められるが、この構造と視床下核ニューロンの軸索投射との間には明瞭な相関は認められなかった。まとめると本研究は1）従来認められていた黒質、脚内核、淡蒼球外節以外に、線条体が視床下核ニューロンの主要投射先であることを示し、2）淡蒼球外節への投射が最も強く、パーキンソン病などで報告されている視床下核-淡蒼球外節間の同期振動現象の形態学的基盤を明らかにした。
以上の研究は大腦基底核の機能の解明に貢献し、基底核疾患の病態理解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25年2月28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。