

Axo-axonic 細胞特異的な観察と操作による情動回路の解析

東京大学大学院 薬学系研究科 特任研究員 (助成時)

東京大学大学院 理学系研究科 助教 (現在)

森川 勝太

【研究背景・目的】

細胞は全ての生物を構成する基本単位であり、生物の多様な特性は異なる性質を有した細胞群による相互作用の結果として生み出される。そのため、個々の細胞特性や機能を明らかにすることは、生物を理解する上で不可欠な試みといえる。とりわけ脳は、高い多様性を有した細胞集団によって構成され、記憶や学習といった高次な脳機能を生み出す神経回路の活動は、形態学的・遺伝的に異なる抑制性神経細胞によって制御される。抑制性神経細胞は、神経伝達物質として γ -アミノ酪酸 (GABA) を放出することで、神経活動のバランスを調節する“神経回路におけるブレーキ”として働く。近年では、統合失調症をはじめとした様々な精神疾患における抑制性システム障害が指摘され、臨床的にも重要な研究対象である。

抑制性神経細胞は、主に発現するマーカー遺伝子、軸索および樹状突起の形態学的特徴、電気生理学的特徴に基づいて分類することが可能である。その中でも、構成割合が最も高いパルブアルブミンを発現する細胞集団の中に、神経細胞の軸索 (Axon) に対して選択的にシナプスを形成する特徴を有した細胞群が存在し、その特徴的な形態から Axo-axonic 細胞と呼ばれる。この Axo-axonic 細胞は、軸索起始部と呼ばれる神経活動発生の要となる軸索コンパートメントを選択的に抑制することから、その機能的な重要性が示唆されてきた。しかしながら、この Axo-axonic 細胞は、神経細胞全体の 1%程度と少なく、生体から神経活動を記録することは極めて困難であり、生体からの活動に関する知見は近年においても、世界的にみて数例の報告のみである。そこで本研究では、遺伝子改変マウスと各種ウイルス標識技術を駆使することによって、情動記憶制御の責任領域である扁桃体と呼ばれる脳領域において、Axo-axonic 細胞特異的な標識手法を確立し、活動記録と操作による Axo-axonic 細胞の機能的役割の解明を目指した。

【結果と考察】

Axo-axonic 細胞の特異的標識と Axo-axonic 細胞への接続様式の解析

扁桃体は皮質様構造を示すことから、一次運動野および視覚野における Axo-axonic 細胞の新規マーカー遺伝子として同定された *Vipr2* 遺伝子に着目した (Tasic et al., Nature, 2018)。まずは、*Vipr2-Cre* マウスと、Cre 酵素依存的に赤色蛍光タンパク質 *tdTomato* を発現するレポーターマウスと交配させることで、*Vipr2-tdTomato* マウスを作出した。この個体から固定脳スライスを作成し、多重免疫染色による解剖学的解析の結果、確かに *Vipr2* 陽性細胞は、Axo-axonic 細胞の最大の特徴である軸索起始部にシナプスを形成することが確認できた。しかしながら、この方法論には問題があり、一部の錐体細胞・アストロサイト・オリゴデン

ドロサイト (SOX10 陽性) などのグリア細胞も標識されることがわかった。この原因が、発生の段階での Cre 酵素のリーク発現によるものと考え、この問題を解決するために、成体でのアデノ随伴ウイルス (AAV) 投与による標識手法を試みることにした。その結果、AAV によって蛍光標識された Vipr2 陽性細胞の軸索終末 (シナプス) が軸索起始部に選択的に認められ、グリア細胞は標識されないことを免疫組織染色によって明らかとした (図 1)。そこで、この特異的標識法を応用し、組換え狂犬病ウイルスを用いて、Axo-axonic 細胞を直接神経支配する上流の神経細胞を網羅的に標識することで、Axo-axonic 細胞を制御する神経回路構造を解析した。この実験によって、Axo-axonic 細胞の活動を制御する神経回路をネットワークレベルで可視化できる。その結果、Axo-axonic 細胞は他の抑制性神経細胞のサブタイプの 1 つであるソマトスタチン陽性細胞と比較して、扁桃体亜核内における局所的な入力を優先的に受け取ることが明らかとした。また、Axo-axonic 細胞は、内側膝状体亜核や大脳基底核からの入力を受け取ることがわかった

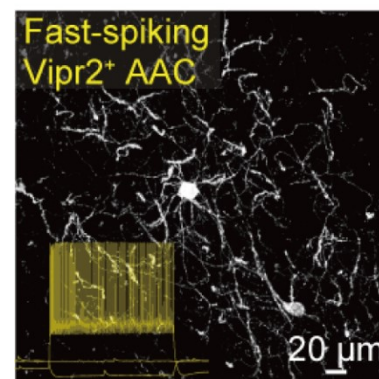


図 1. 高頻度発火特性を示す Vipr2 陽性 Axo-axonic 細胞

行動解析を用いた Axo-axonic 細胞の機能的役割の検証

Axo-axonic 細胞選択的にテタヌス毒素軽鎖 (TetToxLc) を発現させることで、Axo-axonic 細胞の神経伝達を阻害し、恐怖条件づけに与える影響を検証した。恐怖条件づけとは、パブロフ型の連合学習の一つであり、単独では恐怖反応を生じさせない条件付け刺激 (CS) として音を、嫌悪刺激である非条件付け刺激 (US) であるフットショックを同時に呈示することで、音を危険なシグナルとして学習させる。この行動モデルにおいて、Axo-axonic 細胞に TetToxLc を発現させた群は、蛍光タンパク質のみを発現させた対照群と比較して、学習が有意に低下することがわかった。つまり、Axo-axonic 細胞は学習に必要であることがわかった。次に、単一神経細胞レベルでの神経活動を測定するために、屈折率分布型 (GRIN) レンズを扁桃体に埋植し、超小型の蛍光顕微鏡をマウス頭部に固定することで、自由行動下での脳深部カルシウムイメージングを行った。その結果、記録されたすべての Axo-axonic 細胞がフットショックに応答することがわかった。そして、自発活動は高い同期性を示すことがわかった。また、興味深いことに、これらのフットショック応答 Axo-axonic 細胞は、報酬刺激にも活動を増加させることがわかった。以上の結果は、Axo-axonic 細胞は情動を伴う入力に対して、同期的な抑制を周囲の錐体細胞に誘導していることが示唆された。

【参考文献】

Nakashima, M., Ikegaya, Y., Morikawa, S. Genetic labeling of axo-axonic cells in the basolateral amygdala. *Neurosci. Res.*, 178:33-40, 2022.