



Title	口腔顔面領域を支配する一次運動野と一次体性感覚野を結ぶ視床後核について
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95174
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	にわ いたる 丹羽 達	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4 年
ふりがな 共同 研究者氏名	さとう あやか 佐藤 綺香	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4 年
	いけだ ふうか 池田 芙夏		歯学部 歯学科		4 年
					年
アドバイザー教員 氏名	孫 在隣	所属	歯学研究科 系統・神経解剖学講座		
研究課題名	口腔顔面領域を支配する一次運動野と一次体性感覚野を結ぶ視床後核について				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【研究目的】

動物が対象物の形状を触覚を通じて確かめるとき、触覚情報のみならず自らの体部位の動きを認知できていることが、正確な物体の触知覚において重要である。そのためには感覚情報・運動情報それぞれを処理する領域の神経回路連絡が必要である。第一次体性感覚野（primary somatosensory cortex, S1）は触覚情報が脳皮質に到達する領域、第一次運動野（primary motor cortex, M1）は脳皮質からの運動出力を担う領域であり、S1 と M1 の直接的な相互連絡については過去の研究で明らかになっている（Veinante & Deschênes, *J Comp Neurol*, 2003; Ferezou et al., *Neuron*, 2007; Matyas et al., *Science*, 2010; Mao et al., *Neuron*, 2011）。この S1・M1 間相互投射は感覚と運動情報を統合する主要な神経回路であると考えられるが、一方で、互いの情報に関与する第三者的領域もまた、感覚入力から運動出力までの情報の統合的処理に間接的に貢献しているものと考えられる。この第三者領域として、視床や他の大脳皮質領域について、逆行性標識を可能にする神経トレーサーやウイルストレーサーを用いた組織学的解析を行った。

【研究計画】

用いた逆行性トレーサー

- ・神経トレーサー：コレラ毒素 B サブユニット（cholera toxin B subunit, CTb）
- ・ウイルストレーサー：アデノ随伴ウイルス（Adeno-associated virus, AAV）

AAVrg-SynTetOff-GFP, AAVrg-SynTetOff-mRFP1

* AAVrg：逆行性（retrograde, rg）感染を可能にするキャプシドに改変された AAV

* SynTetOff システム：Tet-off システムを用いた神経特異的強発現プラットフォーム
(Sohn et al., *Plos One*, 2017)

* GFP/mRFP1：緑色/赤色蛍光蛋白質（green/red fluorescent protein）

トレーサー注入手術と脳標本作成

野生型 C57BL/6J マウス（雄、6～8 週齢）に対し、イソフルラン吸入による深麻酔下で S1 や M1 の

直上にある頭蓋骨を一部削り、各種トレーサーを充填したガラス電極を S1・M1 に圧注入した。注入後、頭部の皮膚切開部を閉創し、CTb では1週間、AAV では1～4週間後にマウスを還流固定して脳を取り出し、さらに 50 μ m 厚の冠状断薄切標本を作成した。

組織学的染色と観察

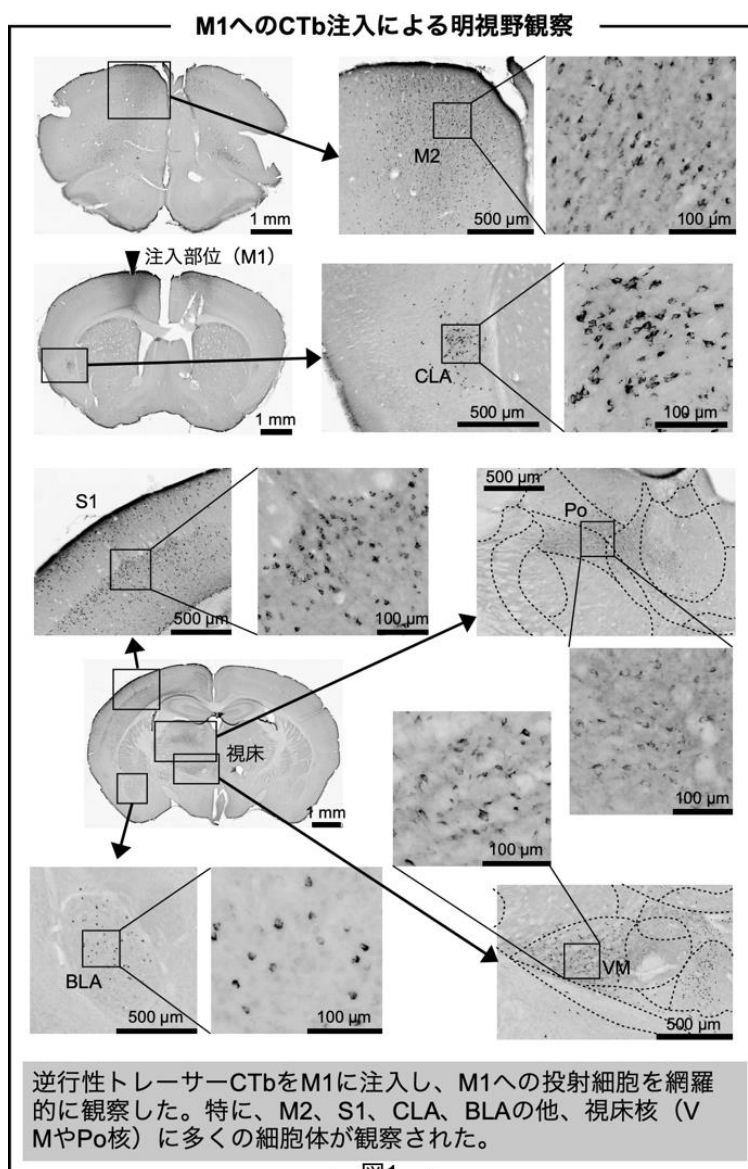
CTb を注入した標本については、酵素抗体法による免疫組織化学を行い染色を施した後、SLIDEVIEW VS200 システム (Olympus) にて画像取得を行なった。

AAV を注入したものについては、NeuroTrace™ 435/455 Blue による蛍光ニッスル対比染色を施し、THUNDER イメージングシステム (Leica Microsystems) により網羅的画像取得を行なった。

【研究経過】

まずは CTb の M1 への注入を行なった。その結果、S1 の第 2/3 層や第 5 層のほか、運動性視床核と呼ばれる視床内側腹側 (ventromedial, VM) 核や外側腹側 (ventrolateral, VL) 核、さらに視床後 (posterior, Po) 核に多数の逆行性標識細胞が観察された。特に視床 Po 核は S1 への相互投射が知られており (Wimmer et al., *Cereb Cortex*, 2010; Ohno et al., *Cereb Cortex*, 2012)、Po 核は S1 と M1 を結ぶ第三者領域として解剖学的に重要であることが示唆された。

さらに、視床以外にも網羅的に観察すると、第二次運動野 (secondary motor area, M2) や前障 (claustrum, CLA)、扁桃体基底外側部 (basolateral amygdala, BLA) などにも多くの細胞体が逆行性標識されていた。これら M1 への投射細胞が S1 にも軸索を展開しているのかについて、AAV を用いた 2 色での標識を行うこととした。M1 に AAVrg-SynTetOff-GFP、S1 に AAVrg-SynTetOff-mRFP1 を注入することで、M1 への投射細胞と S1 への投射細胞を同一個体内で観察することができる。そのとき、共感染 (GFP と mRFP1 を共に発現する細胞) がみられればそれは一つの細胞が M1 と S1 双方に情報を送る、すなわち運動情報と感覚情報の統合に寄与しているものと考えられる。残念ながらこの AAV ベクターは、実験してみると視床一皮質投射細胞への感染効率・発現量が低いことが判明し、視床細胞の解析には不適であった。そのため、この AAV ベクターによる 2 重標識標本については皮質一皮質間結合に絞ってデータ解析を行なった。



【研究成果】

1) M1 に投射する脳領域：CTb を用いた明視野組織学的解析（図 1）

まずは M1 に CTb を注入した脳標本を明視野で観察した。M1 に投射する細胞は大腦・間脳の広い領域にみられた。特に、上述のように M2 や CLA、BLA といった領域や、視床の特に VM・VL 核や Po 核に多くの細胞体が集積していた。これらの領域のうち、M2 や BLA、CLA、Po 核は S1 にも強い投射が観察されることが知られており、こういった領域が M1 の運動情報と S1 の感覚情報を統合する上で機能している可能性が示唆された。

一方で、その他の領域、例えば聴覚野や視覚野などは M1 への投射細胞は散発的であり、S1 への強い投射が知られる視床の後内側腹側（ventral posteromedial nucleus, VPM）核にはほとんど観察されなかった。

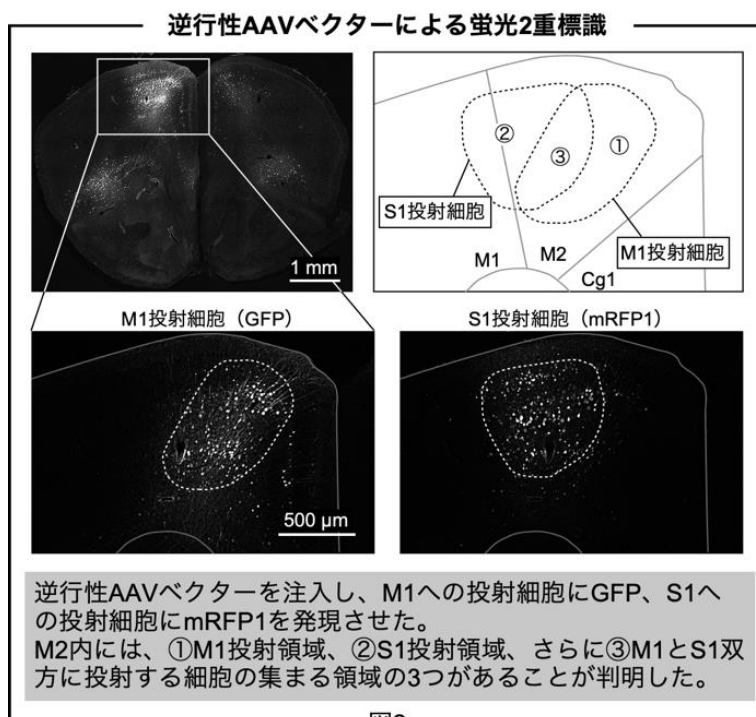
このことから、M2 や BLA、CLA、Po 核は M1 と S1 を間接的につなぐ第三者的領域であると考えられるが、これらの領域の細胞が別々に M1 や S1 に選択的に投射するのか、あるいは一つの細胞が M1 と S1 双方に軸索を伸張するのかによって、その機能的意義は異なるものと考えられる。そこで、以下の実験を行なった。

2) 逆行性 AAV ベクターを用いた M1 投射細胞と S1 投射細胞の蛍光 2 重観察（図 2、図 3）

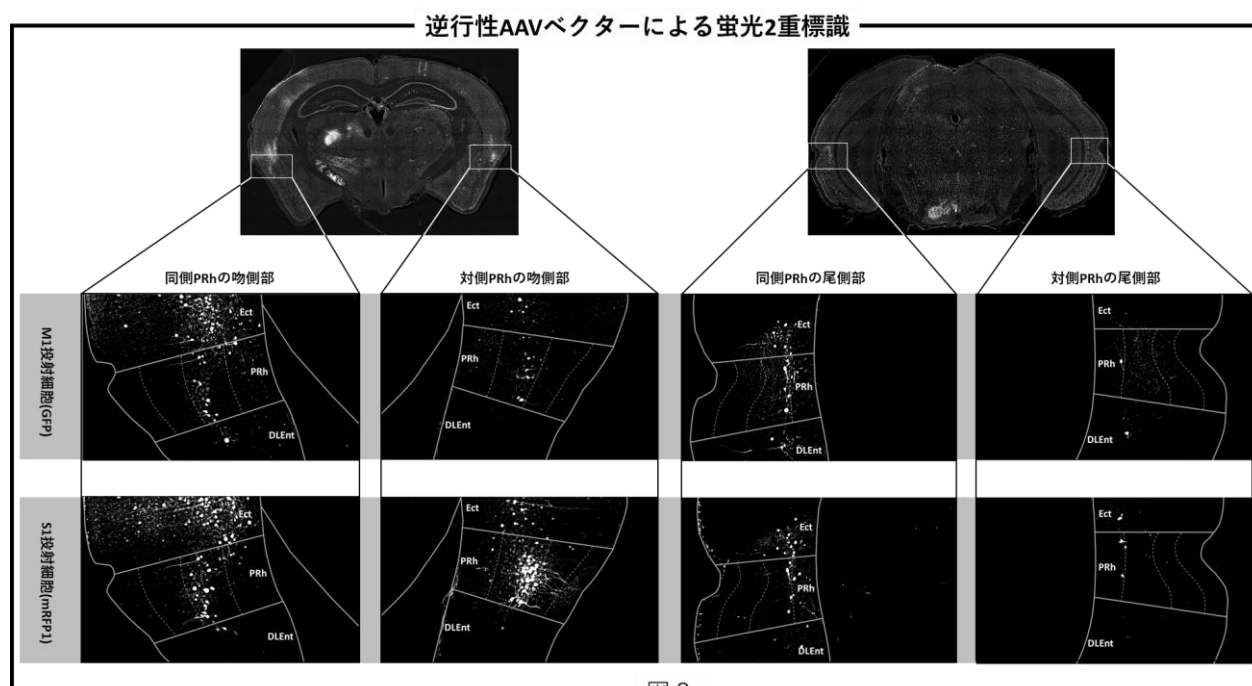
上述の AAV ベクターを注入することにより、M1 と S1 に投射する細胞がそれぞれ GFP と mRFP1 を発現する。それにより、同一個体で M1 に投射する細胞と S1 に投射する細胞を観察することが可能である。残念ながら、視床一皮質投射細胞に対する本 AAV の感染効率の低さから、視床 Po 核における解析は困難であったが、その他の領域について解析を行なった。

BLA や CLA には、M1 にも S1 にも同時に投射する細胞が多く存在し、さらにこれらは左右両側にみられた。BLA は情動・恐怖等との関連が強く、これらの情報を運動野・感覚野にも広く共有しているものと考えられる。CLA の役割については現時点で明らかでない点も多いが、CLA は注意や意識・記憶といった、広く脳活動に寄与しているものと考えられ、本結果はそれと矛盾しない結果であった。

一方で興味深かったのは、M2 における M1 投射細胞・S1 投射細胞の分布である。蛍光観察により、M1 投射細胞と S1 投射細胞は M2 の中でそれぞれ内側・外側にやや棲み分けられており、その中間的な領域（図 2 の③）には M1 と S1 双方に投射する細胞が散見された。このことは、M2 の扱う高次な情報は、基本的には運動と感覚それぞれ別の情報処理に携わる役割分担がなされているものと考えられた。一方で、中間的な領域（図 2 の③）に存在するごく少数の細胞群は、その橋渡しの機能を担っているものと推察される。この M2 の 3 領域における運動情報処理・感覚情報処理において果たす役割については今後の研究が待たれる。



また、嗅周野（perirhinal cortex, PRh）において、特徴的な分布が確認された（図3）。このPRhは海馬とのつながりが深く、高次感覚連合野と海馬の橋渡しをする事で記憶に関わっていると考えられている。この記憶は、オブジェクトに対する記憶機能と特に関わり深いと報告されている（Squire & Wixted, 2011）。一つ目の特徴は、M1やS1に投射する細胞の数を両側で観察した時、吻側部では注入部位と対側のS1に投射する細胞が非常に多く標識され、対してM1に投射する細胞は少なかった。この対側のPRhでの細胞分布は、尾側へ移るにつれ徐々に減少していく傾向がみられた。一方、同側ではM1やS1に投射する細胞の数はほぼ同じであり、吻側から尾側へと細胞数に大きな変化は見られなかった。このような対側が優位となることは、他の大脳皮質にはあまり見られない特徴となっている。二つ目の特徴は、細胞の分布する層の変化である。大脳皮質は6層構造となっており、このPRhでは4層がない1,2,3,5,6層に分けられている。PRhの吻側では第5層の浅層に細胞が集中しており、尾側に近づくにつれ第5層の深層から第6層に分布するようになっていた。これらの吻側から尾側へのM1やS1に投射する細胞の分布の変化がどのような意味を持っているのか、今後調べていきたい。



今回の研究成果は、本学歯学会第136回例会中における研究成果発表会のほか、来年3月の日本解剖学会（沖縄）での発表を予定している。また、国際学術誌への投稿を目指している。

【参考文献】

- Veinante P, Deschênes M (2003) Single-cell study of motor cortex projections to the barrel field in rats. *J Comp Neurol* 464:98-103.
- Ferezou I, Haiss F, Gentet LJ, Aronoff R, Weber B, Petersen CC (2007) Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron* 56:907-923.
- Matyas F, Sreenivasan V, Marbach F et al. (2010) Motor control by sensory cortex. *Science* 330:1240-1243.
- Mao T, Kusefoglu D, Hooks BM, Huber D, Petreanu L, Svoboda K (2011) Long-range neuronal circuits underlying the interaction between sensory and motor cortex. *Neuron* 72:111-123.
- Sohn J, Takahashi M, Okamoto S, Ishida Y, Furuta T, Hioki H (2017) A Single Vector Platform for High-Level Gene Transduction of Central Neurons: Adeno-Associated Virus Vector Equipped with the Tet-Off System.

Plos One 12(1):e0169611.

Wimmer VC, Bruno RM, de Kock CP, Kuner T, Sakmann B (2010) Dimensions of a projection column and architecture of VPM and POm axons in rat vibrissal cortex. *Cereb Cortex* 20(10):2265-2276.

Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T (2012) A morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: a single neuron tracing study with viral vectors *Cereb Cortex* 22(12):2840-2857.

Squire, L.R., Zola-Morgan, J.T. (1991) The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annual Review of Neuroscience* 34:259-288.