

題 目

脳幹・脊髄におけるコリン作動性介在
ニューロンの形態学的解析

ほんごう ゆう

本郷 悠

(神経病学専攻)

防衛医科大学校

平成25年度

目次

第 1 章：緒言.....	1
はじめに.....	1
研究の背景.....	2
研究の動機.....	9
第 2 章：脳幹鰓弓運動性神経核における C-terminal 起始細胞の存在領域検索	14
第 1 節：背景・目的.....	14
第 2 節：対象と方法.....	16
第 3 節：結果.....	20
第 4 節：考察.....	24
まとめ.....	27
第 3 章：コリン作動性ニューロン特異的な細胞標識法の確立.....	28
第 1 節：背景・目的.....	28
第 2 節：対象と方法.....	29
第 3 節：結果.....	34
第 4 節：考察.....	38

まとめ	44
第 4 章：脊髄 partition cell の形態学的特徴の解析	45
第 1 節：背景・目的	45
第 2 節：対象と方法	46
第 3 節：結果	50
第 4 節：考察	56
まとめ	64
第 5 章：総合考察	65
今後の展望	69
結論	71
引用文献	72
図表	83
謝辞	120

第1章：緒言

はじめに

神経学の歴史を通して、多くの先人たちがニューロンの形に迫ろうと試みてきた¹⁾。ニューロンは他の体細胞とは著しく形態上の特徴が異なり、幾多にも分枝する樹状突起や、はるかに離れた部位へと投射する軸索を有する。こうした空間的広がりがあるため、一つのニューロンの細胞体から、樹状突起の末端や軸索終末に至る、神経細胞の全容を捉えるのは容易ではない。

一つ一つのニューロンの形や投射様式に関する知識は、そのニューロンが持つ役割を理解する上で必須の知見である。Golgi 法の発見以来、現在に至るまで種々の方法で単一ニューロンの形態解析が行われてきた。しかしながら、現在にあってもまだ、一つのニューロン全体の形を捉えることは難しく、単一ニューロンの形態解析研究は発展の途上にあるといえる。

本研究では、脊髄・脳幹において運動調節に関わるコリン作動性介在ニューロンに着目し、その形態学的な解析を行った。

“ニューロンの真の形がわからない間は神経学の全体が宙に浮いている”²⁾という言葉が示すように、神経系の理解のためには形態学的な基盤を欠くことはできない。本研究成果は、運動調節にかかわるコリン作動性神経のネットワークを、形の上から理解する一助になると考えている。

研究の背景

コリン作動性介在ニューロン

コリン作動性ニューロンは、末梢では運動ニューロンや自律神経系にあって運動・自律神経機能に働き、中枢では線条体、前脳基底部、中脳・橋被蓋などにあつて随意運動の調整、注意や学習、睡眠-覚醒などの機能に深く関与するなど、末梢・中枢神経系において重要な役割を担っている（図1-1）。これらのうち、一部は α 運動ニューロンなどのように遠方へ情報を伝達する投射ニューロン（projection neuron）として働き、一部は比較的短い距離で情報を伝達し、神経細胞間の興奮調整を行う介在ニューロン（interneuron）として働いている。

中枢神経系においてコリン作動性介在ニューロンは、前脳の線条体、内側中隔核等から、脊髄に至るまで広範な部位に存在する。

こうした多様なコリン作動性介在ニューロンのなかにあつて、脊髄前角の α 運動ニューロンに直接シナプスするニューロンが最近注目され始めている。脊髄前角の α 運動ニューロンにシナプスするコリン作動性介在ニューロンは、**C-terminal**と呼ばれる特徴的な神経終末を持ち、同様の神経終末は、脳幹の運動性神経核上でも見られる。脳幹・脊髄の**C-terminal**の起始細胞となるコリン作動性介在ニューロンの形態学的特徴については、まだ不明な点が多く、最近になって新たな知見の報告が相次いでいる。

C-terminal

C-terminal の構造と機能

骨格筋を支配する α 運動ニューロンの細胞体ならびに近位樹状突起には、大型で、多くの spherical synaptic vesicle を含む特徴的な神経終末が接している。これらの神経終末のシナプス後膜直下には subsurface cistern と呼ばれる厚さ 10 nm ほどの小胞体様構造が接しており、このため Conradi らによって C-bouton と名付けられ⁴⁾、現在ではこの終末は‘C-bouton’または‘C-terminal’と呼称されている。C-terminal は、脊髓前角の α 運動ニューロンのみならず、脳神経運動核における α 運動ニューロンともシナプスを形成する。

C-terminal は化学的にはコリン作動性であり^{5),6)}、シナプス後部には受容体として muscarinic 2 受容体 (m2) を持つ⁷⁾。シナプス前部には電位依存性 Ca チャンネルである Cav 2.2 受容体が豊富に存在し、シナプス後部の m2 受容体の近傍には、電位依存性 K チャンネルである Kv 2.1 受容体⁸⁾や、細胞内 Ca 濃度に応じて開閉する SK チャンネルが共在する⁹⁾。また、subsurface cistern 上には σ 1 受容体が豊富に存在している¹⁰⁻¹¹⁾。これら C-terminal に近接して存在する機能分子は C-terminal の存在マーカーとしても用いられている (図 1-2)。

C-terminal の詳細な機能的意義は現在のところ明らかではないが、C-terminal が m2 受容体を介して α 運動ニューロンの発火頻度を増大させると

いう報告¹²⁾や、C-terminal の機能欠損動物が動作特異的な運動障害を示したという報告¹³⁾が存在し、状況に応じて運動ニューロンの興奮性を調節する機能を持つことが推定されている。C-terminal のシナプス後膜直下にある subsurface cistern は細胞内の小胞体と連続している可能性が指摘されており¹⁴⁾、C-terminal はシナプスを介して細胞内のカルシウム濃度に影響することで、シナプス後部の神経細胞興奮を調整するのだと考えられる。また、運動ニューロンを特異的に侵す筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者脊髄と ALS モデル動物の脊髄において C-terminal の形態・運動ニューロン上の数が変化しているという報告¹⁵⁻¹⁸⁾や、subsurface cistern 上に豊富に存在する $\sigma 1$ 受容体の遺伝子変異で家族性の ALS を発症する家系の報告¹⁹⁻²⁰⁾があるため、C-terminal は病的過程における運動ニューロンの機能維持にも関与している可能性がある。

脊髄 C-terminal 起始細胞と partition cell

C-terminal を運動ニューロンに送る起始細胞の存在領域は、長く不明のままであった。ネコを用いた脊髄損傷実験²¹⁻²²⁾では、損傷部位以下の前角 α 運動ニューロン上の C-terminal に変化が見られないため、脊髄の C-terminal 起始細胞は脊髄内で比較的短い投射を送る介在ニューロンであろうと予想されていた。

最近になって Nakata²³⁾、Miles¹²⁾、Zagoraiou¹³⁾らが脊髄 VII 層内側・X 層に C-terminal 起始細胞を見出し、相次いで報告しており、これらの細胞群は徐々

に注目を集めている。

脊髄VII層にはコリン作動性の介在ニューロンが存在することは以前から報告されていた²⁴⁻²⁷⁾。Barber, Phelps らは、これらのニューロンがVII層と後角の境を画するように存在することから、‘partition cell’ と名付けた^{24,28)}。Partition cell は、中心管からの距離に従って、medial group/intermediate group/lateral group の3群に分類できるとされる(図 1-3)。Zagoraïou らの報告によれば、脊髄の C-terminal 起始細胞はこのうちの medial group の細胞群にあたる¹³⁾。C-terminal 起始細胞や、それを含む脊髄コリン作動性の介在ニューロン群である partition cell は、局在部位は知られているものの、細胞の詳細な形態学的特徴は不明のままであり、それら細胞の持つ機能的意義も、充分明らかとはなっていない。

脳幹における C-terminal 起始細胞

脊髄の C-terminal 起始細胞のみならず、脳幹の C-terminal 起始細胞についても、最近報告されはじめている。Haizuka らは舌下神経核に C-terminal を送る起始細胞の存在領域を探索し、それらが延髄大細胞性網様体中存在することを確認した²⁹⁾。現在のところ脳幹の運動性神経核に C-terminal を送る起始細胞の存在領域についての報告はわずかで、舌下神経核以外の脳幹運動性神経核に C-terminal を送る細胞の存在領域は不明のままに残されている。

単一ニューロンレベルの神経回路解析

神経系はニューロン同士の結合により作りだされた伝導路の集合体である。神経伝導路は微視的には個々のニューロンの情報伝達から成り、巨視的にはそれらニューロン集団同士がやり取りする情報伝達のネットワークで構成される。

したがって、神経伝導路の解析手法も、大きく分けて単一ニューロンの結合解析を目指すものと、細胞集団としての結合解析を志向するものとに分けられる。単一ニューロンにおける樹状突起の広がりや、軸索終末の投射先を形態学的に捉えることは、そのニューロンが行う情報処理の様式を推定することに繋がる。ひるがえって細胞集団同士の結合様式を知ることは、個々のニューロンにより処理された情報の伝達経路を理解することである。細胞集団同士の巨視的な情報の流れも重要であるように、情報の素子とも言える個々の細胞の形態を知ることは、神経系の理解において極めて重要である。

単一ニューロンの形態解析および結合解析の歴史は古く、Golgi 法を駆使してニューロン説を確立した Cajal の偉大な業績はその代表的なものである^{30,31)}。Golgi 法は神経細胞体や軸索、樹状突起を精細に染色することが可能であるが、染色されるニューロンが全くランダムだったり、幼若動物のニューロンでなければよく染まらない、髄鞘化された軸索はほとんど可視化できないなど、種々の欠点がある。

Golgi 法の欠点を克服する手法として細胞内染色法が開発された³²⁾。この手法は、標識物質を充填したガラス管微小電極を用いて、細胞内記録やホールセルパッチクランプ法により細胞の性質を調べた後に、ニューロンを染色する方法である。開発当初のこの手法では、軸索や神経終末の可視化は困難だったが、新たな標識物質の開発などに伴い、方法の改良が進んでいる。

1970 年代頃から、神経細胞に標識物質を取り込ませ、軸索輸送を利用することで神経細胞全体を標識する手法が発達してきた。オートラジオグラフィ法や西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 法³³⁾は、こういった手法のなかで最も古く開発されたものである。1980 年代には様々な蛍光色素 (Diamino Yellow, Fast Blue, True Blue, Fruolo Gold など)³⁴⁻³⁷⁾や、WGA (コムギ胚凝集素)³⁸⁾、コレラトキシン³⁹⁻⁴⁰⁾、PHA-L (白インゲンマメレクチン)⁴¹⁾などの高感度な標識物質が開発され、1980 年代後半～1990 年代には表面に蛍光物質やビオチンなどを結合したデキストラン (BDA : biotinylated dextran amine など)⁴²⁾や、可視化のための物質を結合したポリスチレンビーズなどが開発された⁴³⁻⁴⁴⁾。こうした標識物質を用いた解析方法は高い解像度を持ち、単一ニューロンの伝導路解析にも利用可能である。これらの手法は現在も神経伝導路の理解に大きく貢献している^{45),46)}。

1990 年代ころから遺伝子工学を用いた細胞標識法も開発され始めてきた。例

えば、ウイルスベクター法により、さまざまな標識物質の遺伝子を細胞内に導入して、目的の神経細胞を単一ニューロンレベルで可視化することが可能となった。この手法は *in vivo* の系においてより自然に近い形のニューロンを観察でき、目的とするニューロンを効率的に Golgi 染色と同様な解像度で可視化することが出来る⁴⁷⁾。さらに経シナプ斯的にニューロンの連鎖様式を解析する方法⁴⁸⁻⁴⁹⁾や、特定のニューロン集団の機能を選択的に活性化/除去する方法⁵⁰⁻⁵¹⁾なども開発されており、ウイルスベクター法は、細胞の可視化にとどまらない広い応用範囲を持つ方法である。

また、Cre/lox システムを用いた細胞種特異的な標識法も、最近広く用いられている。Cre recombinase (Cre) は、P1 バクテリオファージに由来する部位特異的組み換え酵素の一種で、DNA 上の lox 配列と呼ばれる部位を認識し、部位特異的な遺伝子組み換えを起こす⁵²⁻⁵³⁾。この性質を利用して、ニューロンを様々な蛍光蛋白で可視化する方法⁵⁴⁾や、特定のニューロンに機能分子を組み込む手法など⁵⁵⁾様々な試みがなされている。

遺伝子工学を用いた手法は、様々な遺伝子改変動物、ウイルス種、標識物質、付加シグナル等を利用して改良が進んでおり、今後も神経伝導路解析の大きな武器であり続けるであろうと考えられる。

研究の動機

脳幹鰓弓運動性神経核における C-terminal 起始細胞の存在領域検索について

脊髄の C-terminal 起始細胞については、2007 年に Miles らがその存在領域を初めて報告した¹²⁾。その後、脊髄 C-terminal 起始細胞は、*Pitx2* という転写因子を特異的に発現することも示された¹³⁾。

C-terminal は脊髄のみならず脳幹の運動性神経核にも多く認められる^{7, 56-58)}。外眼筋支配の脳神経核では C-terminal は見られない⁷⁾、もしくは他の部位と C-terminal の形態が異なる⁵⁶⁾とする報告もあるが、概ね脊髄運動ニューロンと同様に脳幹の運動性神経核のニューロンにも C-terminal は分布している。

Haizuka らは舌下神経核へ C-terminal を送る起始細胞が延髄の大細胞性網様体中存在することを見出した²⁹⁾。舌下神経核は脊髄前角の運動核である IX 層の吻側延長構造であり⁵⁹⁾、延髄の大細胞性網様体（延髄網様核腹側部、中間網様核ならびに巨細胞性網様核）は脊髄 VII, VIII 層の吻側延長構造である⁶⁰⁻⁶¹⁾。脊髄において C-terminal 起始細胞が VII 層内側にあり、IX 層の運動ニューロンへと投射していることを考え併せると、体性運動ニューロンへと投射する C-terminal 起始細胞の存在領域は吻側から尾側まで共通していると考えられる。

このように体性運動性神経核における C-terminal の理解が進む一方で、体性運動性神経核とは異なる分化メカニズムを持つ鰓弓運動性神経核（三叉神経、

顔面神経、疑核)へ投射する C-terminal 起始細胞は未だ同定されておらず、その存在領域は不明のままである。さらに、これらの細胞が脊髄 C-terminal 起始細胞と同様に転写因子 *Pitx-2*を発現しているか否かは明らかではない。

本研究ではいまだ明らかでない、脳幹鰓弓運動性神経核に分布する C-terminal 起始細胞の存在領域を解明するべく、順行性トレーサーである biotinylated dextran amine (BDA) を用いて存在領域候補の検索を行った。また、脳幹 C-terminal 起始細胞が脊髄 C-terminal 起始細胞と共通の特性を有するのかを検討するため in situ hybridization の手法を用いて脳幹における *Pitx-2*の存在確認を行った。

脳幹 C-terminal 起始細胞の存在領域を明らかにした結果、こうした介在ニューロンについて、細胞個々の形態学的特徴を解明する必要があると思われたため、以下の研究を計画した。

コリン作動性ニューロン特異的な細胞標識法の確立について

これまでの報告や、研究項目1.の結果から明らかなように、脳幹や脊髄におけるC-terminal起始細胞は、その投射先である α 運動ニューロンの近傍に存在する。C-terminal起始細胞の形態学的特徴を推定するに当たり、単にコリン作動性神経を網羅的に可視化する方法を採るのは、適当ではない。例えば何らかのコリン作動性神経のマーカーを用いた免疫組織化学法などでは、

C-terminal起始細胞も、その近傍にある α 運動ニューロンも、いずれもコリン作動性ニューロンであるため、多くの細胞が一度に可視化される。そのため、個々の細胞の樹状突起や軸索投射のパターンなどの情報は埋もれてしまうことになる。

従来コリン作動性ニューロンの伝導路は、主に順行/逆行性トレーサーによる標識と、免疫組織化学法を組み合わせることで解析されてきた。

トレーサーはニューロンの形態学的特徴を可視化するのに適しているが、伝達物質にかかわらず非特異的にニューロンに取り込まれるため、コリン作動性ニューロンのみを目的にした解析には不向きである。免疫組織化学法と組み合わせれば細胞種特異的な標識が可能だが、一度に多くのニューロンが可視化されるため、個々のニューロンの形態学的特徴を観察するのは困難となる。

単一ニューロンレベルの形態学的特徴は、神経細胞の解剖学的・機能的特性を知る上で必須の知見であるが、神経伝達物質ごとに特異的な形態解析を単一ニューロンレベルで実現できる手法は現在発展の途上である。

そこで、Cre/lox誘導性のレポーター蛋白発現系を利用し、変異アデノウイルスの局所注入による細胞種特異的な遺伝子組み換えを行うことでコリン作動性ニューロンの順行性標識を実現する系を計画した。過去にもCre/loxシステムとアデノウイルスを利用した、細胞種特異的なニューロン可視化の方法が報告さ

れているが⁶²⁾、同手法を用いた単一ニューロンレベルの解析はなされていなかった。C-terminal起始細胞の投射解析には細胞種特異的で、解像度の高い手法が必要と考え、研究に着手した。

なお、本研究の成果を応用し、Cre-driverマウスを変更することで、コリン作動性ニューロン以外の様々なニューロン特異的な伝導路の標識も今後可能となりうると考えている。

脊髄 partition cell の形態学的特徴の解析について

脊髄を、コリン作動性ニューロンのマーカーである choline acetyltransferase (ChAT) で免疫組織化学染色すると、大きくわけて5つのコリン作動性ニューロン群を見出すことができる。すなわち、運動ニューロン、partition cell, central canal cluster cell, 交感神経節前ニューロン、後角コリン作動性ニューロンである(図 1-2)。なお、交感神経節前ニューロンは胸髄以下に存在する。これらのうち、partition cell は α 運動ニューロンの近傍に存在し、脊髄IX層へ軸索を送るため、以前から C-terminal 起始細胞の候補と考えられていた。

Partition cell は中心管からの距離にしたがって medial/intermediate/lateral の3群に分けられるとされる。これらのうち、最も中心管に近く存在する medial group は、脊髄における C-terminal 起始細胞と考えられることが2009年に報告された¹³⁾。さらに、この知見を元に Stepien らは変異狂犬病ウイルスを用い、

起始細胞群の存在/投射様式を明らかにした⁶³⁾。このように、**partition cell** のなかでも **medial group** には近年注目が集まっているが、他のグループを含めた **partition cell** 全体に関する報告は少ない。例えばこれらのコリン作動性介在ニューロンはどういった基準で 3 群に分けられるのか、また、これらの細胞はどのように樹状突起を伸ばし、どのような形態学的特徴があるのか、といった疑問は先行研究では解明されていない。**C-terminal** 起始細胞を含む、脊髄VII層に局在するコリン作動性介在ニューロンの形態学的情報は、未だ不明であるこれらの細胞群の機能を理解するためにも重要である。

そのため、上記研究項目 2. で開発したコリン作動性ニューロン特異的な細胞標識方法を用いて、脊髄VII層のコリン作動性介在ニューロンの形態学的特徴を単一ニューロンレベルで解析する研究を計画した。

本論文では第 2 章で脳幹レベルの **C-terminal** 起始細胞存在領域の検索について結果を述べ、第 3 章でコリン作動性ニューロン特異的な細胞標識法の確立について述べる。さらに第 4 章で脊髄VII層のコリン作動性介在ニューロンの形態学的特徴について解析結果を述べる。第 5 章ではこれらの結果を総括し、今後の研究の展望について述べる。

第2章：脳幹鰓弓運動性神経核における C-terminal 起始細胞の存在領域検索

第1節：背景・目的

α 運動ニューロン上に見られる，コリン作動性の大型神経終末である C-terminal は，脊髄のみならず脳幹においても認められる．現在までに，動眼神経核，外転神経核，三叉神経運動核，顔面神経核，疑核，舌下神経核等において C-terminal の存在が確認されている (7,56-58)．

脳幹の運動性神経核は，その分化様式によって 2 つのグループに分けられる．すなわち，体性運動性神経核と，鰓弓運動性神経核である．前者には動眼神経核，外転神経核，舌下神経核が含まれ，後者には三叉神経運動核，顔面神経核，疑核が含まれる．いずれのグループにおいても，C-terminal は見られるが，その起始細胞の存在領域に関する報告はわずかである．体性運動性の神経核については，舌下神経核へ C-terminal を送る起始細胞の存在領域を解明した Haizuka らの報告が既にある (29)．一方で鰓弓運動性神経核へ C-terminal を送る起始細胞の存在領域は未だ不明であり，分化様式の異なる体性運動性神経核と，鰓弓運動性神経核とで，C-terminal 起始細胞の存在領域が異なるのか，共通であるのかは分かっていない．

逆行性標識法を用いた過去の報告では，鰓弓運動性神経核へ直接シナプスする介在ニューロンが，大細胞性網様体を含む領域に存在することが示されてい

る⁶⁴⁻⁶⁹⁾。さらに、延髄においては、大細胞性網様体の一部にコリン作動性神経が存在するという報告もある⁷⁰⁾。これらの報告から、鰓弓運動核へ直接シナプスするコリン作動性介在ニューロンは大細胞性網様体中存在することが推測できる。実際、コリン作動性介在ニューロンが延髄網様体から、三叉神経運動核⁶⁹⁾や、顔面神経核へ直接投射することを示した報告⁷¹⁾もあるため、鰓弓運動性神経核へ **C-terminal** を送る細胞の存在領域の候補としては、大細胞性網様体が最も考えやすい。

また、脊髄においては **C-terminal** 起始細胞が *Pitx2* という転写因子を特異的に発現していることが近年明らかとなった¹³⁾。*Pitx2*は、左右の体軸形成や、眼、歯、下垂体、心臓、筋などの形成、視床下部や中脳の神経細胞の **migration** などに働く転写因子である⁷²⁻⁷⁴⁾が、成体の脊髄では、VII層内側にある **C-terminal** 起始細胞のみで見出されている^{13,75)}。脳幹と脊髄の **C-terminal** 起始細胞が共通した性質を持つと仮定すると、脳幹でも起始細胞の存在領域に *Pitx2* の発現が見られると考えられる。

そこで、まず脳幹における **C-terminal** 起始細胞の存在領域を検索する目的で、脳幹における *Pitx2* の発現様式を検討した。さらに、大細胞性網様体への順行性トレーサー注入実験を行い、鰓弓運動性神経核へ **C-terminal** を送る起始細胞の存在領域を確定した。

第2節：対象と方法

実験動物

実験には 25-40g の ICR マウス (SLC, 静岡, 日本) と, ICR-C57BL/6J 混血のマウス計 24 頭を使用した。3 頭は *in situ hybridization* (ISH) に供し, 21 頭は順行性トレーサー注入実験に用いた。本実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行われ, 実験動物の取り扱いに関しては, 実験動物取扱指針に従って行った。

In situ hybridization

マウス *Pitx2* の RNA プローブは Donna M. Martin 博士より供与を受けた。マウス腹腔内に 5 % 抱水クロラル 0.40-0.45 ml を麻酔した後, ブアン固定液を左心室から灌流し, 固定した。その後, 脳と脊髄を摘出し, パラフィンに包埋し, 8 μ m 厚のパラフィン切片を作製した。脱パラフィン, 水和後, 0.3 % triton-X を含む phosphate buffered saline (PBS) (0.3 % triton-X/PBS) で 5 分間処理した。その後 0.2 M HCl で 20 分間処理し, 内在性のアルカリフォスファターゼの不活性化を行った。さらに 20 μ g/ml proteinase K/PBS で 8-12 時間処理後, 4 % paraformaldehyde (PFA) を含む 0.1 M phosphate buffer (0.1 M PB) (4 % PFA/0.1 M PB) で再固定した。続いて 0.2 % グリシン/PBS に反応させたのち, プレハイブリダイゼーション溶液 (50 % foramide, 10 % dextran

sulfate, 5×SSC, 1×Denhardt's solution, 1 % sodium dodecyl sulfate, 100 μ g/ml heparine, 10 mM dithiothreitol, 1 mg/ml ssDNA) により 2 時間処理した. その後 Digoxigenin (Dig)で標識したプローブにより, 70°Cで 14 時間ハイブリダイゼーション (ハイブリダイゼーション溶液は, プレハイブリダイゼーション溶液に 1 mg/ml tRNA を加えたもの)を行った. ハイブリダイゼーション後, 組織を 1×及び 0.1×saline-sodium citrate buffer (SSC) により 65°Cで洗浄した.

シグナル検出には, 抗 Dig 抗体溶液 (1 : 500 アルカリフォスファターゼ標識抗 Dig 抗体 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), blocking reagent(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) と, Nitro blue tetrazolium (NBT) /5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)を用いた.

さらに, *Pitx2*陽性細胞とコリン作動性神経との分布を比較するため, ISHを行った組織の隣接切片を用いて, ChAT に対する免疫組織化学染色を行った. すなわち, 組織を脱パラフィン, 再水和の後に 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中にてマイクロウェーブ処理を 10 分間行った. Tris buffered saline (TBS) で洗浄, 0.3 %過酸化水素・メタノールにて室温で 30 分間処理した後, 再度 TBS で洗浄, TSA blocking reagent (TSA Biotin system, Parkin Elmer life sciences, MA, USA) にて 60 分間ブロッキングした. 一次抗体溶液 (1:200 ヤ

ギ由来抗ヒト ChAT 抗体 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), TSA blocking reagent, 0.5 %triton-X) により 4℃で 12 時間反応させた後, TBS-T (0.05 % Tween 20-TBS) で洗浄し, 二次抗体溶液 (1:400 ウマ由来抗ヤギ IgG 抗体 (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) 中にて室温で 60 分間インキュベートした. その後 TBS-T で洗浄し, ABC キット (Vectastain Elite, Vector laboratories) を用いて 30 分間反応を行った. その後, TBS で洗浄した後に 3,3-Diaminobenzidine (DAB) (Dojindo, Tokyo, Japan) に塩化ニッケルを添加してシグナルを検出した.

トレーサー注入実験

実験動物を 5 %抱水クロラル (500 mg/Kg) で麻酔した後, 頭部固定装置 (Narishige, Tokyo, Japan) に固定し, 皮切, 軟部組織除去の後に開頭した. 本研究では, biotinylated dextran amine (BDA) (3000 MW ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を順行性トレーサーとして使用した. BDA 注入は電気泳動により行った. 注入にさいしてはガラス管マイクロピペットと定電流装置 (CS3, Trans Kinetics, Canton, MA, USA) を用いて, 5~8 μ A の電流を, 8 秒通電・8 秒休止のサイクルで 20 分間注入した. 定位手術における注入点は, Paxinos と Franklin のアトラス⁷⁶⁾を参考に決定した.

BDA 注入から 7 日後, 実験動物を 5 %抱水クロラルで麻酔し, 4 %PFA/0.1

MPB で灌流固定した。その後、脳を摘出し、4 %PFA/0.1 MPB 溶液で 2 時間後固定し、さらに 20 %グリセリン/0.1 MPB に 48 時間浸漬した。その後、ミクロトーム (HM440E; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて冠状断した 40 μ m 厚の凍結切片を作成し、切片を 4 シリーズに分けた。こうして作成した切片のうち、シリーズ 2 は主に順行性トレーサーを可視化する目的で使した。即ち、ABC (avidin-biotin-peroxidase complex) キットを用いて 4°C で一晩反応させた後、DAB と塩化ニッケルによる発色反応を行った。その後切片をゼラチンコートしたスライドガラス上に貼り付け、対比染色のため Nissl 染色を行った。

免疫組織化学

BDA 注入実験を行った個体について、BDA で可視化された神経終末のうち、どれがコリン作動性であるかを確認するため、シリーズ 1 の切片を用いて、BDA と vesicular acetylcholine transporter (VACHT) の二重染色を行った。すなわち、切片を TBS にて 10 分間 3 回洗浄し、室温で 1 時間ブロッキング溶液 (TBS 中に 5 %normal donkey serum, 0.5 % trinton X-100) に浸漬後、一次抗体溶液 (1:1600 ヤギ由来抗ラット VACHT 抗体 (Merck Millipore) ,5 % normal donkey serum, 0.5 % triton-X100, TBS) で一晩反応させた。これを TBS で 10 分間 3 回洗浄し、2 次抗体溶液により室温で 2 時間反応させた。2

次抗体溶液は、0.5 %triton-X を添加した TBS に、400 倍希釈した Cy3 標識ロバ由来抗ヤギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) と、600 倍希釈した Cy2 標識抗 Streptavidin 抗体 (Jackson Immuno Research) とを溶解したものである。2 次抗体による反応後、再び洗浄し、スライドガラスに貼付し、脱水、透徹、封入して観察した。

観察

共焦点顕微鏡 Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Jena, Germany) で観察した。細胞構築の区分は Paxinos と Flankrin⁷⁶⁾に従った。

第 3 節：結果

1. 脳幹におけるコリン作動性神経と *Pitx2* の発現様式の確認

脊髄において C-terminal 起始細胞のマーカーとされる転写因子 *Pitx2* の脳幹における発現パターンを ISH で確認した (図 2-1)。

錐体交叉のレベルにおいて *Pitx2* 陽性細胞は、中間細胞性網様核の中心管周囲の領域に存在していた (図 2-1A, 2-1B 左)。脳幹の吻側へと追跡すると、舌下神経尾側レベルにおいて、*Pitx2* 陽性細胞は、尾側に比べて数が減少してゆき、また、中間細胞性網様核や内側網様核などの外側の領域に認められるようになった (図 2-1C, 2-1D 左)。さらに、舌下神経核の中間部レベルより吻側では *Pitx2* の発現が認められなくなった。

ついで、延髄尾側で見られる *Pitx2* 陽性細胞が、脊髄と同様にコリン作動性であるかを検証した。*Pitx2* の発現を ISH で確認した切片の隣接切片を用いて、コリン作動性マーカーである choline acetyltransferase (ChAT) の免疫組織化学染色を行った。*Pitx2* 陽性細胞と、ChAT 陽性細胞の分布は、延髄の尾側では中心管付近においてよく一致するが、延髄吻側では両者の分布が一致しなくなることが観察された。延髄尾側においては ChAT 陽性細胞の分布が *Pitx2* 陽性細胞の分布と一致するため、この部位ではコリン作動性ニューロンは、脊髄と同様に *Pitx2* を発現していると考えられた。さらに、同一の細胞が 2 つの隣り合う切片にまたがって存在し、一方は ISH で *Pitx2* 陽性となり、もう一方は免疫組織化学染色で ChAT 陽性となっていると思われる例も観察された (図 2-1E-F)。この結果も、延髄尾側においてコリン作動性ニューロンが *Pitx2* を発現していることを強く支持するものである。

錐体交叉より吻側では、単独で ChAT を発現する細胞や、*Pitx2* を発現する細胞は認めるものの、両者を同時に発現する細胞は認められなかった (図 2-1D)。さらに、舌下神経中間部より吻側のレベルでは、網様体に *Pitx2* 陽性細胞が見られなくなった。しかしながら ChAT 陽性細胞は延髄吻側、橋、中脳などに至るまで、大細胞性網様体内に認められた (図 2-1G-J)。

2. 鰓弓運動性神経核に C-terminal を送る起始細胞の存在領域の探索

鰓弓運動性神経核へ C-terminal を送る起始細胞の存在領域を確定するために、BDA 注入と VACHT による免疫染色を組み合わせた実験を行った。①体性運動性神経核における C-terminal 起始細胞が大細胞性網様体に認められていること、②先行研究で、大細胞性網様体を含む領域にコリン作動性神経が確認されていること、③前項の実験で、延髄尾側において *Pitx2* 陽性細胞を中間細胞性網様核（この神経核も、大細胞性網様体の一部である）に認めたこと、の3点を考慮し大細胞性網様体を存在領域の候補と考えた。

表 2-1 に、BDA の注入部位について示す。表 2-2 には、BDA と VACHT とで二重標識をうけた神経終末をカウントした結果を示した。注入実験を行った 21 例中 18 例で、鰓弓運動性神経核上に C-terminal を確認することができた。代表的な注入例での注入結果を図 2-2 に示す。

錐体交叉のレベルの中間細胞性網様核および延髄腹側網様核領域に注入した例では、舌下神経核、疑核、顔面神経核、三叉神経運動核上の神経終末に BDA が陽性となった（図 2-2F）。これらの神経終末のうち、大型のものがコリン作動性であるかどうかを検討するために BDA と VACHT の二重染色を行った。その結果、運動神経細胞の細胞体や近位樹状突起に接する大型の神経終末では BDA と VACHT がいずれも陽性となり、これらの神経終末が C-terminal であ

ることを確認できた (図 2-2G-H)。

さらに吻側の中間細胞性網様核, 延髄腹側網様核, 大細胞性網様核の領域に注入した例では, 舌下神経核, 疑核, 顔面神経核, 三叉神経運動核上の少数 (4-60 個) の神経終末が BDA 陽性となった。こうした, ごく少数の C-terminal しか BDA 陽性とならない例でも, 舌下神経核, 疑核, 顔面神経核, 三叉神経運動核のすべてにおいて同時に BDA 陽性の C-terminal を認める例があった (図 2-2D)。この事実はすなわち, 起始細胞領域にわずかしき BDA が取り込まれない場合でも, 上記した神経核すべてに順行性に標識が行き渡ることを意味している。すなわち, 複数の神経核へと同時に投射する C-terminal 起始細胞が存在することを示唆する結果と考えられた。その他, 少数の C-terminal のみが可視化された例では, 対側優位 (同側 : 28.3 %, 対側 : 71.7 %) に舌下神経核, 疑核, 三叉神経運動核に投射が見られた例 (図 2-2E) や, 対側優位 (同側 : 14.3 %, 対側 : 85.7 %) に三叉神経運動核のみに投射を認めた例 (図 2-2A) などもあり, 必ずしも C-terminal 起始細胞の投射様式は一樣ではないことが推察された。

外側巨細胞性傍核と顔面神経核に BDA が注入された例では, 舌下神経核, 疑核, 三叉神経運動核, 顔面神経核に BDA 陽性の C-terminal が見られた (図 2-2B)。

青斑下核や, 延髄大細胞性網様体の吻側延長構造である橋網様核に BDA 注

入した例では、鰓弓運動性神経核上に BDA 陽性の C-terminal は認めなかった。

第 4 節：考察

脳幹における *Pitx2* 陽性細胞の分布

今回、脳幹での *Pitx2* の発現様式を解析することで、延髄尾側の C-terminal 起始細胞は、脊髄におけるそれらと相違点を持つことが明らかとなった。

脊髄においては C-terminal 起始細胞は脊髄 VII 層内側および X 層において、中心管の近傍に存在し^{12,13,63)}、*Pitx2* を特異的に発現している¹³⁾とされる。今回の検討では、延髄尾側において脊髄と同様に、中心管近傍の脳幹網様体にコリン作動性で *Pitx2* 陽性の細胞を見出すことができた。この領域では、脊髄と同様に、*Pitx2* 陽性の C-terminal 起始細胞が中心管付近に分布していると考えられる。しかしながら、舌下神経核中間部レベルより吻側の脳幹網様体では *Pitx2* 陽性細胞が見られなくなった。つまり、脊髄や延髄尾側においては *Pitx2* を発現する C-terminal 起始細胞が存在しているが、より吻側の領域では、C-terminal 起始細胞は *Pitx2* を発現しなくなるのだと考えられる。

こうした結果は、*Pitx2* の発現は、伝達物質によって規定されないことを意味する。事実、*Pitx2* の発現は、必ずしもコリン作動性神経のみに見られるわけではない。例えば、中脳上丘では *Pitx2* は GABA 作動性神経に発現しており⁷³⁾、また中脳被蓋においてはグルタミン酸作動性神経に *Pitx2* が発現している

ことが知られている⁷⁴⁾。つまり、この転写因子の発現は、神経細胞の伝達物質に規定されるのではなく、発現する神経細胞の吻尾方向の局在部位によって規定されていると考えられる。今回の研究では、延髄吻側よりも中枢においては、*Pitx2*はC-terminal 起始細胞のマーカーとはなりえないことが初めて明らかとなった。

鰓弓運動性神経核へ C-terminal を送る起始細胞の存在領域の確定

今回の研究で、鰓弓運動性神経核へ C-terminal を送る起始細胞は、舌下神経核へ C-terminal を送る起始細胞と同様に、大細胞性網様体中存在することが明らかとなった。ほとんどの例で、大細胞性網様体からは両側の鰓弓運動性神経核へ C-terminal の投射が見られた。特に、ごく少数のみ起始細胞へ BDA 取り込みが見られた例においても、一側の大細胞性網様体から、両側の複数の鰓弓運動性神経核へ C-terminal が投射しているのが観察された。例えば M467 においては、少数の C-terminal 起始細胞にしか BDA 取り込みが認められていないにもかかわらず、両側の舌下神経核、顔面神経核、三叉神経運動核、対側の疑核へ C-terminal 投射を認めた。逆行性標識法を用いた過去の報告でも、大細胞性網様体の介在ニューロンには、鰓弓運動性神経核へ両側性に投射するものがあることが報告されており^{66-67,69)}、今回の結果に合致すると言える。脊髄においても、C-terminal 起始細胞の約 50 %は両側に投射し、左右の同名の

筋群を支配する運動ニューロンへと **C-terminal** を送ることが報告されている

63). **C-terminal** 起始細胞は、脊髓・脳幹では両側の運動ニューロンへ同時に投射し、咀嚼や **hopping** などの左右一致した運動の発揮に関与すると考えられる。

今回の結果は、鰓弓運動性神経核に **C-terminal** を送る起始細胞が左右の神経核へ同時に投射している可能性を強く示唆するものであった。しかし、個々の起始細胞がどういった形態的特徴を持ち、どのようにして運動性神経核へ軸索を伸張しているかは明らかとならなかった。こうした詳細な解析を行うには、単一ニューロンレベルで細胞形態を解析する手法が必要と考えられた。

まとめ

本章の結果をまとめると、以下のように結論付けられる。

- ①In situ hybridization の結果、脳幹の C-terminal 起始細胞は、脊髄における起始細胞と異なり、延髄吻側より中枢のレベルにおいては転写因子 *Pitx2* を発現しないことが明らかとなった。
- ②鰓弓運動性神経核に C-terminal を送る起始細胞は、舌下神経核に C-terminal を送る起始細胞と同様に、大細胞性網様体に存在することが明らかとなった。さらに、これらの C-terminal 起始細胞は、両側の複数の鰓弓運動性神経核へ同時に投射していると考えられた。
- ③C-terminal 起始細胞のさらに詳細な投射様式を解明するには、単一ニューロンレベルでの細胞の形態把握が必要と考えられた。

第3章：コリン作動性ニューロン特異的な細胞標識法の確立

第1節：背景・目的

前章で明らかとなったような、脳幹 C-terminal 起始細胞の投射様式をさらに詳細に解析するためには、単一ニューロンレベルでの細胞形態の把握が必須である。今回着目しているコリン作動性ニューロンの形態を把握するためには、細胞種特異的で、部位特異的な新たな解析法が必要と考え、研究に着手した。

従来、神経伝導路の解析は変性実験や標識物質の注入、免疫染色等の手法を用いて進められてきた^{34,44,46,59)}。1990年代ころから、遺伝子工学の発展に伴ってウイルスや遺伝子組み換え動物を用いた新たな手法が登場し、神経伝導路解析の手法は以前にも増した発展を遂げている。

アデノウイルスは8Kb以上のサイズが大きい遺伝子組み込みが可能なほか、高い力価での精製も容易で、分裂期ではない細胞にも遺伝子導入を行うことができる⁷⁷⁻⁷⁹⁾。そのため、アデノウイルスは神経伝導路解析に適したベクターとなりうる。近年、レポーター蛋白に膜移行シグナルを付加することで、解像度の高い神経伝導路解析を実現する手法が開発され、より詳細な解析が可能となった^{47,80-81)}。

一方で、細胞種特異的に遺伝子組み換えを起こす手法として Cre/lox システム^{52-53,82)}も近年広く用いられるようになってきている。Cre recombinase (Cre)

は、P1 バクテリオファージに由来する部位特異的組み換え酵素の一種で、DNA 上の lox 配列と呼ばれる部位を認識し、部位特異的な遺伝子組み換えを起こす。

アデノウイルスベクターと、Cre/lox システムとを組み合わせれば、部位特異的・細胞種特異的な可能となるはずであり、それを試みた先行研究も存在する⁶²⁾。しかしながら、先行研究では単一ニューロンレベルでの神経伝導路解析は行われておらず、この方法にはさらに改良の余地があると考えた。

今回の研究ではアデノウイルスベクターと Cre/lox システムの組み合わせにより、コリン作動性神経の詳細な伝導路解析を可能にする方法の開発を試みた。

本手法は、遺伝子改変マウスを変更することで種々の神経伝導路解析に利用可能であり、応用範囲の広い手法であると考えている。

第 2 節：対象と方法

本実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て、防衛医科大学校組み換え DNA 実験指針および防衛医科大学校実験動物取扱動物取扱指針に基づいて行った。

実験動物およびアデノウイルスベクター

実験には、choline acetyltransferase (ChAT) プロモーター下に Cre 発現遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (ChAT-Cre マウス：GM24Sat)⁸³⁾を用いた。この変異動物は、コリン作動性神経特異的に Cre を発現するマウ

スである。ChAT-Cre マウスはカリフォルニア大学デービス校 Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC)より購入し、実際のウイルス注入は、ChAT-Cre マウスと野生型の ICR マウス (SLC, 静岡, 日本) とをかけ合わせたマウスに行った。ChAT-Cre マウスと野生型 ICR マウスとのかけ合わせマウスへの変異遺伝子の組み込みは、polymerase chain reaction (PCR) により確認した。実験には、25-50 g のマウス計 106 頭を使用した。

変異アデノウイルスベクターは、共同研究者である石川県立看護大学中田隆博博士より供与を受けた。今回の研究に使用したアデノウイルスベクターは 2 種類ある (図 3-1)。

すなわち、①Ad-nDsRed/myrGFP および、②Ad-STOP/myrGFP-WPRE の 2 種類である。Ad-nDsRed/myrGFP ベクターは、Cre 存在下では、緑色の蛍光色素である Green Fluorescent Protein (GFP) を主に細胞膜において発現し、Cre 非存在下では赤色の蛍光色素である DsRed を核内で発現する。

Ad-STOP/myrGFP-WPRE ベクターは、Cre 存在下では GFP を主に細胞膜において発現し、Cre 非存在下ではレポーター蛋白を発現しない。

ChAT-Cre マウスと、前述した 2 種類の変異アデノウイルスベクターとを用いて注入実験を行い、コリン作動神経の可視化に最適な条件を検討した。

ウイルスベクターの注入

前投薬として 0.2 %アトロピン (2 mg/Kg) を実験動物へ投与し、その後 5 % 抱水クロラル(500 mg/Kg)を投与し麻酔した。頭部固定装置に固定し、皮切および軟部組織の剥離を行い、内側中隔核へ注入する例については開頭を、脊髄へ注入をする例については頸椎 C6 の椎弓切除を施行した。アデノウイルスベクターに NaCl を添加した溶液 50-700 nl をハミルトンシリンジ内に充填し、微小ガラス管を取り付けたハミルトンシリンジをマイクロポンプ (Ultra Micro Pump II, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) に装着して、マウス中枢神経内へウイルスベクターを圧注入した。ウイルスベクター溶液中の NaCl 濃度は、先行研究⁸⁴⁾にならい、注入実験全例において 1 M に調整した。

マウス中枢神経系へのウイルス注入は、線条体、内側中隔核、頸髄に対して行った。線条体や内側中隔核の注入例は予備的な実験と位置づけ、実験系が期待通りに作用することを確認する目的で行った。これらの例では詳細な条件検討は行わず、700~1500 nl のウイルスベクターを注入し、注入後 5-14 日の生存期間を置いて灌流固定した。

脊髄Ⅶ層に注入した例では、ウイルスベクター注入量や注入後の生存期間について検討した。注入量は 50~700 nl の範囲で変更し、注入後の生存期間は 3-28 日間の範囲で変更した。注入速度は、注入部位に関わらず全例で 100 nl/min

とした. ウイルスベクターの力価は, Ad-nDsRed/myrGFP が 1.0×10^9 pfu/ml, Ad-STOP/myrGFP-WRPE が 3.0×10^7 pfu/ml であった. 注入は Paxinos と Franklin のアトラス⁷⁶⁾を用いて定位的に施行した.

組織標本作製

前章で記載したのと同様の方法で, 注入実験後にそれぞれの生存期間をおいて, 4%PFA/0.1MPB にてマウスの灌流固定を行い, 脳および脊髄を摘出し, 凍結標本作製した. 作成した標本を用いてミクロトーム (HM 400E, Carl Zeiss) により $40 \mu\text{m}$ の連続切片を作成し, 切片を 4 シリーズに分けた.

ほとんどの例で, 作成した切片のシリーズ 2 は抗 GFP 抗体による免疫組織化学染色を行い, 注入の良好な例では残りのすべてのシリーズでも注入中心領域を染色した. また, 場合によりシリーズ 1, 3 は GFP と VACHT の免疫二重染色に使用した (方法・結果は 4 章に記載). シリーズ 4 は予備とした.

免疫組織化学染色

作成した連続切片のシリーズ 2 を主に用いて, ウイルスベクター由来の GFP 検出のための免疫組織化学染色を行った.

切片を TBS にて洗浄し, 室温で 1.5 時間ブロッキング溶液 (ブロックエース粉末 (DS バイオファーマメディカル社, 大阪, 日本), 0.5 % triton-X100, 蒸留水) に浸漬振盪し, その後 1 次抗体溶液 (1:400 自家作成ウサギ由来抗ラッ

ト GFP 抗体, ブロッキング溶液, 0.5 % triton-X100) 中において室温で 1 晩反応させた. その後 TBS で洗浄して, 次に 2 次抗体溶液 (1 : 500 ビオチン標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体 (Vector laboratories), TBS, 0.5 % triton-X100) に室温で 2 時間浸漬振盪し, さらに TBS で洗浄の後 ABC キットを用いて 1 晩反応を行った. その後, TBS で洗浄し, DAB に塩化ニッケルを添加して発色を行い, スライドガラスに貼付, 脱水透徹して封入し観察した.

蛍光二重染色

ウイルスベクターによる GFP 発現がコリン作動性神経特異的に起きていることを確認するため, 一部の例で GFP と ChAT について二重染色を行った. 切片を TBS で洗浄の後, ブロッキング液 (TSA blocking reagent, 0.5 % triton-X100) に室温で 1 時間反応させ, その後 1 次抗体溶液 (1:1000 自家作成ウサギ由来抗ラット GFP 抗体, 1:200 ヤギ由来抗ヒト ChAT 抗体 (Merck Millipore), TSA-blocking buffer, 0.5 % triton-X100) 中で一晩反応させた. その後さらに TBS で洗浄し, 2 次抗体溶液 (1:500 ビオチン標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体 (Vector laboratories), TBS, 0.5 % triton-X100) に室温で 2 時間浸漬振盪し, さらに洗浄の後, 蛍光抗体液 (1:200 Cy2 標識抗 Streptoavidin 抗体 (Jackson Immuno Research), 1:400 Cy3 標識ロバ由来抗ヤギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research), TBS, 0.5 % Triton-X100) で 2 時間反応させ

た後、さらに洗浄の後スライドガラスに貼付、脱水、透徹して封入し観察した。

観察

蛍光顕微鏡 ECLIPSE 80 i (Nikon, Tokyo, Japan)、共焦点顕微鏡 Zeiss LSM510 (Carl Zeiss) で観察した。一部の例で、Stereoinvestigator system (MBF bioscience, Williston, VT, USA) と、描画ソフトである Neurolucida(MBF bioscience)を用いて細胞形態のトレース図を作成した。細胞構築の区分は Paxinos と Flankrin⁷⁶⁾に従った。

第 3 節：結果

1. 本研究の実験系の検証

研究を開始するに当たり、過去の報告からコリン作動性神経の存在が確認されている中枢神経系の様々な部位に対し、アデノウイルス注入実験を行った。

線条体・内側中隔への注入では、ウイルスベクター注入により期待した通りの遺伝子組み換えが見られた (図 3-2, A, B)。また、注入の良好な例では、切片を越えて樹状突起をトレースすることも可能であった (図 3-2, C)。抗 GFP 抗体と、コリン作動性神経のマーカーである ChAT の二重染色を行い、ChAT-Cre マウスへのウイルスベクター注入が、コリン作動性神経特異的に GFP 発現を誘導することも確認した (図 3-2, D-F)。

しかしながら、アデノウイルスを大量に注入することで注入中心周囲の神経

細胞が変性・脱落するため、神経系の投射解析の目的に使用するためにはウイルス注入量や注入後の生存期間の条件検討が必要であることが判明した（図 3-2, G,H）。そのため、脊髄Ⅶ層内側注入例では、最適な注入後の生存期間・アデノウイルス注入量の条件検討を行った。

2. 脊髄Ⅶ層内側注入例での条件検討

脊髄Ⅶ層内側注入例（図 3-2, I-K）では、注入後の生存期間およびウイルス注入量の検討を詳細に行った。これらの検討は、2 種あるアデノウイルスベクターのそれぞれについて行った。

2-1. *Ad-nDsRed/myrGFP* での検討

2-1-1. 術後生存期間の検討

ウイルス液を脊髄へ注入後、5 日・8 日・10 日で検討した。注入後 8 日後までは GFP 標識が増え続けるが、10 日後には注入領域に著明な細胞脱落が見られた（図 3-3）。この傾向は、ウイルス液を比較的大量（700 nl）注入した場合でも、少量（80～150 nl）注入した場合でも、同様に認められた。*Ad-nDsRed/myrGFP* を脊髄へ注入する場合には、8 日間が最適な生存期間と考えた。ウイルス液 700 nl 注入では、注入中心近傍でコリン作動性介在ニューロンのみならず、運動ニューロン等の目的としない細胞も標識された。そのためできるだけ少量のウイルス液注入で、限

られた細胞集団のみを標識する条件を検討した。

2-1-2. 注入量の検討

生存期間については、このウイルスベクターで最適と考えられる 8 日間に設定した。ウイルス注入量を減らすにつれ、GFP による標識は注入中心近傍のみに限局し、また、目的とする脊髄Ⅶ層内側のコリン作動性ニューロンも、ごく少数レベルで可視化できるようになった（図 3-4）。ウイルスによるコリン作動性ニューロン特異的な GFP 発現が安定して認められる最少注入量は、80～150 nl であり、これより少ない注入量ではレポーター蛋白の発現が安定しなかった。

2-2. Ad-STOP/myrGFP-WPRE での検討

2-2-1. 術後生存期間の検討

ウイルス液 700 nl を注入後、8 日・14 日・28 日後で検討した。

全般的に、Ad-nDsRed/myrGFP の例と比較して、標識細胞での GFP 発現は弱い傾向が見られた。検討した最大日数である 28 日後の時点においても、明らかな細胞脱落を認めなかった。生存期間が長期になるにつれて、注入領域中心部付近ではシグナルが増加し続け、単一ニューロンの樹状突起の形態や軸索投射の解析が困難となる傾向があった（図 3-5）。また、生存期間が長期間になるにつれて、注入中心から吻尾方向に離れ

た部位に広く標識細胞が認められるようになった。注入中心近傍の運動ニューロンが標識される範囲は生存期間に関わらず一定であることから、これらの吻尾方向に離れた部分の標識細胞は、注入中心付近の神経終末から逆行性に標識を受けたものと推測した。注入中心から離れた部位のニューロンについては、細胞形態の把握が可能だった。

これらの観察事実から、Ad-STOP/myrGFP-WPRE は、逆行性標識に適したベクターであると考えた。検討した範囲では、14 日生存の例での標識は比較的まばらで、個々の細胞形態の確認に適していた。ただし、この条件で形態の把握が可能なのは、注入中心から吻尾に離れた部位で逆行性標識を受けた細胞に限られていた。

2-2-2. 注入量の検討

Ad-STOP/myrGFP-WPRE においても、ウイルス液の注入量の検討を行った。生存期間は、上記の検討で最適と判断した 14 日間に設定し、ウイルス液注入量は 300・700 nl で検討した。このウイルスベクターでも、注入量に応じてシグナル量を調整することが可能だった。ただし、大量注入・少量注入いずれの条件でも、中心領域での細胞形態の解析は困難だった。単一ニューロンレベルでの形態解析が可能なのは、逆行性に標識された細胞に限られていた (図 3-6)。そのため、このウイルスベクターを用いた細胞

胞形態の解析は、注入中心から離れた部位の細胞で行う事にした。300 nl

以下の注入では安定した結果は得られなかった。

脊髄へウイルス注入を行った以上の実験結果から、以下のように結論付けた。

脊髄へのウイルス注入実験において；

①Ad-nDsRed/myrGFP では、a. 最適な生存期間は 8 日である。b. 注入量に応じて、より限局した部位の解析を行う事が可能であり、検討した範囲では、80～150nl の注入が単一ニューロンレベルの解析には適当である。c. 少量のウイルス注入では、注入中心近傍に標識が限局する傾向があり、比較的短い経路を順行性に解析するのに適する。

②Ad-STOP/myrGFP-WPRE は、a. 生存期間が長くなるにつれ、シグナルが増え続ける。今回目的とするような、単一ニューロンレベルの形態解析には 14 日程度の生存期間が最適である。b. 注入量を調節しても、注入中心付近の解析は困難である。c. 広範囲の逆行性感染を起こす傾向があるため、やや長い経路を逆行性に解析するのに適する。

第 4 節：考察

アデノウイルスベクターによる投射解析

アデノウイルスベクターは高力価の精製が容易で、感染細胞での遺伝子発現効率が高く、非分裂細胞にも感染が可能である。サイズの大きい遺伝子配列

を組み込むことが可能であるのも特徴で、近年開発されたガットレスアデノウイルスベクターは、最大 36Kb までの配列を収容できる⁸⁵⁾。こうした利点から、アデノウイルスベクターは神経系を解析する目的で以前から用いられてきた。

現在、神経系の解析に用いられるウイルスベクターとしては、他に狂犬病ウイルス、シンドビスウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス

(*adeno-associated virus* : AAV) などがある⁸⁶⁻⁸⁹⁾。今回の実験系は Cre/lox システムを利用しているために RNA ウイルスである狂犬病ウイルス、シンドビスウイルス、レンチウイルスはベクターとして利用することが出来ない。また、AAV は導入できる遺伝子サイズが小さいため、ベクターとして選択しなかった。

類似の手法を用いた先行研究

今回の検討のように、Cre/lox システムとアデノウイルスベクターを組み合わせ、神経細胞を標識する試みはすでに先行する報告がある⁶²⁾。この報告は、大脳皮質の興奮性ニューロンに Cre を発現したマウス (CamK II α -Cre マウス) の皮質に、loxP 配列を有するアデノウイルスベクターを注入し、皮質の興奮性/抑制性ニューロンの分布を明らかにすることを試みたものである。この先行研究では、細胞種特異的な可視化に成功しているものの、解析はニューロン群の可視化に留まっており、単一ニューロンレベルでの投射解析は行われていない。

先行研究と、我々の方法で解像度の違いが見られる理由は、2点考えることが出来る。

まず、先行研究においては、マウスの皮質に 500 nl ものウイルスベクター注入を行っており、今回の我々の検討した注入量よりもはるかに大量のベクターを使用している。今回の検討でも、ウイルスベクター大量注入が原因と思われる神経細胞の変性・脱落が観察された。先行研究においては、大量注入により注入中心の軸索・樹状突起などの損傷が生じ、詳細な投射解析を妨げていたのだと思われる。

また、先行研究と、今回の研究においては、レポーター蛋白の膜移行性に違いがある。先行研究では、レポーター蛋白である GFP に、膜タンパク質である GAP43 タンパクの N 末残基に存在する palmitoylation site⁸¹⁾が付加されている。今回の研究では、GFP に付加するタンパク質として Fyn タンパク質 N 末残基にある myristoylation/palmitoylation site⁸⁰⁾を選択した。これらのタンパク質はいずれも、タンパク翻訳後の GFP が細胞膜へ移行し、より高い解像度で神経細胞の形態が描出されることを目的として付加されている。両者の間には、神経細胞可視化の効果に差があると考えられており、Fyn タンパクの myristoylation/palmitoylation site を付加した GFP (myrGFP) は、GAP43 タンパクの palmitoylation site を付加した GFP (palGFP) と比較して、より

高感度に神経突起を可視化することが報告されている⁸⁰⁾。このように、より高い解像度が得られる膜移行シグナルを今回利用したため、先行研究よりも精細に神経細胞を描出できたのだと思われる。

本研究では、注入条件を最適化し、高い感度で神経細胞を可視化しうるウイルスベクターを利用することで、単一ニューロン可視化を追求した。そのため、先行研究よりも高い解像度で、目的とするニューロンのみを可視化することが出来たのだと考える。

2 種のウイルスベクターの特徴

アデノウイルスは、神経回路標識に用いられ始めた当初は順行性トレーサーとしての利用がなされたが^{77,90)}、ウイルス濃度の調整や⁹¹⁾、添加する溶媒⁹²⁾などにより逆行性トレーサーとしても利用しうることが報告されている。

今回用いた 2 種のウイルスベクターにおいても、一方は順行性トレーサーとして、もう一方には逆行性トレーサーとしての特性が見られた。

Ad-nDsRed/myrGFP は、解析に適する術後生存期間が比較的短く、注入中心近傍に標識が限局するため順行性トレーサーとしての利用に適していた。これに対し、Ad-STOP/myrGFP-WPRE は解析に適する術後生存期間は長く、また、注入中心から遠い距離を逆行性に標識するため逆行性トレーサーとしての利用に適していた。こうした両者の違いは、それぞれのコンストラクトにより

誘導される遺伝子組み換えの形式に依存すると考えられる。

Ad-nDsRed/myrGFP は, Cre 存在下で必ず GFP を発現するよう設計されているのに対し, Ad-STOP/myrGFP-WPRE は Cre 存在下でも, 必ずしも GFP を発現しない。また, Ad-nDsRed/myrGFP は Cre 非存在下では DsRed を発現するよう設計されているが, Ad-STOP/myrGFP-WPRE は Cre 非存在下ではレポーター蛋白を発現しないよう設計されている。これらの違いが, 両ベクターの効果の違いとなって表れていると思われる。

おそらく Ad-nDsRed/myrGFP に感染した Cre 陽性細胞にあっては, 感染後から GFP 発現が直線的に増加し, 感染から日数を経るほど GFP が細胞内に蓄積すると思われる。GFP を含む蛍光タンパクは一般に凝集しやすい事が知られている⁹³⁾。そのため, Ad-nDsRed/myrGFP の注入では, 急激な凝集タンパクの発現によって感染細胞の機能障害が惹起される可能性がある。その反面, GFP が短期間で大量に発現することにより, 注入中心近傍が明瞭に可視化されるのであらうと考えられる。さらに, Cre 非存在下で発現する DsRed もまた, 凝集体をつくりやすい傾向があるため, 細胞変性を引き起こす可能性が指摘されている⁹⁴⁾。DsRed によって周囲のグリア細胞等が変性を起こすことも, Ad-nDsRed/myrGFP での細胞変性の傾向が強いこと, ひいては術後の至適生存期間が短いことに影響しているのだと思われる。

これに対し、Ad-STOP/myrGFP-WPRE では GFP 発現はランダムにおき、ベクター感染細胞での GFP 蓄積の速度は比較的ゆるやかであると考えられる。また、Cre を持たない細胞で DsRed が発現することもないため、Ad-nDsRed/myrGFP と比較して周囲の組織の障害も軽微で、長期間の生存期間をとることが可能なのだと思われる。その反面、GFP は時間経過に伴って直線的に増加するわけではなく、術後生存期間を長く設定しても、Ad-nDsRed/myrGFP と比較すると淡い染色像しか得られないという欠点が見られるのであろう。

まとめ

本章の結果をまとめると、以下のように結論付けられる。

- ①アデノウイルスベクターと、**Cre/lox** システムを用いて、コリン作動性ニューロンを特異的に標識することができた。さらに、ウイルスベクターの注入条件を最適化することで、極めて限局した範囲の細胞集団を標識し、単一ニューロンレベルの形態把握が可能となった。
- ②今回の方法と類似の手法を用いた先行研究よりも、高い解像度で細胞標識を実現できた。ウイルスベクター注入の条件を最適化できたこと、より感度の高い膜移行シグナルを使用したこと、によるものと考えた。
- ③検討を行った 2 種のアデノウイルスベクターのうち、一方は順行性トレーサーとしての利用に適しており、もう一方は逆行性トレーサーとしての利用に適している、という特性が見られた。この特性の違いは、各々の遺伝子組み換えの様式を反映しているものと考えた。

第4章：脊髄 partition cell の形態学的特徴の解析

第1節：背景・目的

脊髄におけるコリン作動性ニューロンには、運動ニューロン, partition cell, central canal cluster cell, 交感神経節前ニューロン, 後角コリン作動性ニューロンなどがある²⁴⁾.

なかでも partition cell は、その一部が C-terminal の起始細胞であると考えられている^{13,63)}. Barber, Phelps らによって、その存在が報告されて以来、partition cell の形態に関する報告は少なく、初めて partition cell が見出された頸髄においてさえ、未だにこれらの細胞の詳細な形態的特徴は明らかでない.

また、partition cell に関する最近の報告は、腰髄のみに着目しているが^{12-13,32,95-96)}、脊髄全長にわたって存在するであろう partition cell の全体的な理解には脊髄吻側での検討も欠くことはできないと思われる.

そのため、本研究では、Barber, Phelps らによる partition cell の区分を再定義し、細胞の形態学的特徴を明らかにし、さらに脊髄吻側における partition cell の分布を確認することを目的として、頸髄における検討を行った.

Partition cell の形態学的特徴の解明に当たっては、前章で開発した、コリン作動性神経特異的な神経標識法を用いることにした.

第 2 節：対象と方法

実験動物およびアデノウイルスベクター

前出の ChAT-Cre マウスおよびアデノウイルスベクターを用いて、脊髄 VII 層への注入実験を行った。使用したのは ChAT-Cre マウスと野生型 ICR マウスとのかけ合わせマウス 38 頭である。使用したマウスの体重は 25-50 g であった。ウイルスベクターは、前章で使用した 2 種類のウイルスベクターを用いた。

ウイルスベクター注入

まず、partition cell の分布を確認するための実験を行った。Ad-nDsRed/myrGFP については 80-700 nl 注入し、5-10 日の生存期間をおいた。また、Ad-STOP/myrGFP-WPRE については 300-700 nl を注入し、8-28 日の生存期間を置いた。

ついで、単一ニューロンの可視化を目的とした実験を行った。前章で検討したように、Ad-nDsRed/myrGFP については注入量を 80-150 nl とし、生存期間を 8 日にした。Ad-STOP/myrGFP-WPRE については注入量を 300-700 nl とし、生存期間を 14 日に設定した。

実験動物には、前章までで記載の通り麻酔・椎弓切除を行い、頸髄 C5-6 レベルへベクター注入を施行した。マウスへのベクター注入は、前章までで行った実験と同様に、ハミルトンシリンジと微小ガラス針を用いて行った。

Partition cell の鑑別

脊髄に見られるコリン作動性ニューロンとしては、**partition cell** の他に、 α 運動ニューロン、**central canal cluster cell**、交感神経節前ニューロン、後角コリン作動性ニューロンがある。これらのコリン作動性ニューロンは、VII層に散在する **partition cell** とは、以下に述べるような分布や形態上の違いがある。

α 運動ニューロンは一般に大型で、多極性の形態をとり、VII層よりも腹側の脊髄前角に分布し、支配筋群ごとに密度の高い細胞集団を形成している。また、**central canal cluster cell** は、小型で、中心管周囲を取り巻くように存在し、樹状突起を主に吻尾方向に伸ばすため、冠状断の切片では樹状突起に乏しい円形の細胞に見える。交感神経節前ニューロンは、胸髄以下にあり、中心管の背側からVII層背側~VI層に存在し、脊髄側索まで伸びる神経突起束でお互いがつながりあわされるという形態的な特徴を持つ。後角コリン作動性ニューロンは、全て小型で、後索に沿って存在するものや、III層内に見出されるものなどがあるが、全て明らかにVII層から離れた部位に存在する^{24,28)}。

各細胞集団のこうした特徴を踏まえ、明らかにVII層から離れて存在し、樹状突起の形態などから **partition cell** 以外のニューロンと判定できるものは、今回の検討には加えなかった。

組織切片作成

灌流固定および組織標本作製は、前章に記載した方法と同様である。すなわち、4 %PFA 溶液で灌流固定を行い、ミクロトームを用いて 40 μm 厚の連続切片を 4 シリーズ作製した。

こうして作製した切片のうち、脊髄VII層における **partition cell** の分布の解析には主にシリーズ 2 の切片を用いた。**Partition cell** の単一ニューロンレベルの解析は、解析対象の細胞が含まれる領域で全シリーズを染色した。

さらに、形態を確認できた **partition cell** の樹状突起の広がりを追跡するため、ウイルスベクターを注入した例と同一週齢のマウス脊髄を用いて組織標本作製した。ウイルスベクター注入例と同様に 40 μm 厚の薄切切片を作成し、それらを Nissl 染色した。こうして得られた組織切片から、ベクター注入例で **partition cell** が確認できる切片と同一の脊髄高位のものを選び出した。この Nissl 染色された切片上に、トレースした **partition cell** の像を重ね合わせ、樹状突起が脊髄のどの層まで広がっているかを確認した。

免疫組織化学

ウイルスベクターによって脊髄コリン作動性神経特異的に発現した GFP は、前章に記載した方法と同様に免疫組織化学染色で可視化した。

蛍光二重染色

ウイルスベクター注入により GFP 発現がコリン作動性ニューロン特異的に起きていることを裏付けるため、GFP と、コリン作動性神経終末のマーカーである VACHT の蛍光二重染色を行った。主にシリーズ 1, 3 を用いて染色を施行した。すなわち、切片を TBS で洗浄後、1 % H_2O_2 を添加したメタノール溶液に 1 時間浸漬し、さらに TBS で洗浄し、1 次抗体溶液 (1:2000 ラット由来抗 GFP 抗体 (ナカライテスク, 京都, 日本), 1:1000 ヤギ由来抗 VACHT 抗体 (Abcam, Cambridge, UK), tris-NaCl-blocking buffer, 0.5 % triton-X100) で 1 晩反応させた。その後、TBS で洗浄後、GFP の検出のため 2 次抗体溶液 (1:500 ウサギ由来抗ラット IgG 抗体 (Vector laboratories), tris-NaCl-blocking buffer, 0.5 % triton-X100) にて 1 時間反応を行い、さらに TBS で同様に洗浄した。続いて、ABC キットによる反応と VACHT 検出のための 2 次抗体反応を遮光下で行った。すなわち、ABC キット反応液に 2 次抗体溶液 (1:400 Cy3 標識ロバ由来抗ヤギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research), 0.5 % Triton-X100) を加えたものに切片を浸漬し 2 時間室温で反応させた。なお、以下の反応はすべて遮光下で行った。TBS で洗浄の後、TSA (Tyramide Signal Amplification) 溶液 (1.25 μM biotinylated tyramine, 3 $\mu\text{g/ml}$ glucose oxydase (ナカライテスク, 京都, 日本), 2 mg/ml beta-D-glucose, 1 %

bovine serum albumin, 0.1 M PB) による反応を 30-45 分間行い, 再び TBS で洗浄し, もう一種の 2 次抗体溶液 (1:600Cy2 標識抗 Streptoavidin 抗体 (Jackson Immuno Research), TBS, 0.5 %Triton-X100)で 2 時間反応させ, 洗浄し, スライドガラスに貼付, 脱水透徹して観察した.

観察

全シリーズを染色した例の一部において, Stereoinvestigator system (MBF bioscience) と, 描画ソフトである Neurolucida (MBF bioscience) を用いて細胞形態のトレース図を作成した. トレース図は, 連続切片を二次元平面上で重ね合わせることで得られた像をもとに作成した. 細胞形態の解析には, Neurolucida 専用の解析ソフトである Neuro explorer (MBF bioscience) を用いた.

統計解析

Partition cell の細胞面積に基づくクラスター分析には, 統計ソフト JMP 10 (SAS institute, Cary, NC, USA) を用いた.

第 3 節 : 結果

1. Partition cell の形態解析

1-1. Partition cell の分布様式

ChAT-Cre マウス脊髄Ⅶ層内側へアデノウイルスベクターを注入することで,

VII層に存在するコリン作動性介在ニューロン, すなわち **partition cell** が可視化されるようになった (第 3 章). これらの細胞について, 細胞面積のヒストグラムを描いたところ, 分布は二峰性を示すことが分かった (図 4-1). そこで, **partition cell** の細胞面積をクラスター分析したところ, これらのニューロンは, 細胞面積が $84.5 \pm 30.2 \mu\text{m}^2$ の群と, 面積が $226.9 \pm 69.1 \mu\text{m}^2$ の群とに分かれることが判明した.

細胞面積の大小を元に, 可視化された計 99 個の **partition cell** をプロットしたところ, これらのニューロンは小型/大型細胞の比率を変えながら, 中心管付近から灰白質の外側まで広く分布していることが分かった (図 4-2).

さらに, 中心管からの距離に応じて小型・大型細胞の分布がどのように変化するかを調べたところ, 中心管から $100 \mu\text{m}$ 以内の領域では大型細胞が多く (小型 : 35.3 %, 大型 : 64.7 %) $100 \sim 400 \mu\text{m}$ の領域には小型細胞が多く (小型 : 60-66.7 %, 大型 : 33.3-40 %), $400 \mu\text{m}$ より離れた領域では再び大型細胞が多くを占める (小型 : 36.3 %, 大型 : 63.7 %) という傾向があることが判明した (図 4-3).

こうした細胞構築の違いから, 脊髓VII層を 3 つの領域に区分した. 即ち, 中心管から $100 \mu\text{m}$ 以内の内側領域, $100-400 \mu\text{m}$ の中間領域, 中心管から $400 \mu\text{m}$ 以上離れた領域の外側領域である. さらに, それぞれの領域に含まれる

partition cell を, medial/intermediate/lateral group に分類することにした.

1-2. Partition cell の形態学的特徴

前章で最適化した条件で注入実験を行うことにより, ほぼ単一ニューロンレベルで partition cell を可視化し得たため, 可能な例については Neurolucida を用いてトレース図を作成した. トレース図は, 隣接切片で連続性のある神経突起を, すべて 2 次元平面に投影することで作成した. 今回, トレース図を作成することで樹状突起の広がりや軸索投射の様式を追跡し得たニューロンは, 計 8 個である (図 4-4).

今回の実験で可視化し得たこれらのニューロンは, 上述のようにその存在領域によって 3 群に分類した. これらの細胞について, 細胞体中心を基準に, 樹状突起が伸張する角度と, 樹状突起先端から細胞体中心までの直線距離とを測定した. そのうえで, それぞれのニューロンがどの方向へ樹状突起を伸ばす傾向が強いかを確かめた. 結果として, 3 群のニューロンはそれぞれ, 樹状突起を伸ばす方向に特徴があることが明らかとなった (図 4-5). また, それぞれのニューロンについて樹状突起の脊髄内での広がりを確認したところ, 3 群のニューロンは各々, 樹状突起の広がりにも違いがあることが明らかとなった (図 4-6). 以下に, 各ニューロンの特徴を示す.

1-2-1. medial group

最も内側に存在する一群である（図 4-4, 緑色の細胞）。樹状突起は主に腹側へ伸びる傾向があった（図 4-5, 上段のグラフ）。Ⅶ層内に留まる樹状突起が全樹状突起長の 41.3~61.1 %で、残りの多くはⅧ層・Ⅸ層内に終わっていた。Ⅷ・Ⅸ層内の樹状突起は全樹状突起長の 37.3~51.3 %で、3 群中で最も高率にⅧ・Ⅸ層から入力を受けるニューロンと考えられた（図 4-6, 左の列）。樹状突起の広がりと同側で終わるニューロン（M659, M668）と、両側へと樹状突起を伸ばすニューロン（M630）の 2 種類を確認できた。この群で細胞形態を解析できたのは、いずれも大型のグループに属する細胞である。

1-2-2. intermediate group

Ⅶ層の中間部に存在するニューロン群である（図 4-3 赤色の細胞）。樹状突起を水平方向および腹側へと伸ばす傾向が強かった（図 4-5, 中段のグラフ）。全樹状突起長のうち、74.5~77.6 %が同側のⅦ層内に留まっていた。M641 は対側Ⅶ層にまで樹状突起を伸張しており、左右のⅦ層から入力を受けていると考えられた。この群のニューロンの樹状突起は、Ⅶ層に次いでⅧ・Ⅸ層内で終止するものが多く、Ⅹ層に終止するものがわずかに見られた（図 4-6, 中の列）。この群では、小型細胞（M610）と大型細胞

(M641, M660) の両者の形態を解析することが出来たが、いずれのニューロンについても樹状突起が伸びる方向は類似していた。

1-2-3. lateral group

もつとも中心管から離れて存在する群である(図 4-4. 青色の細胞)。樹状突起の伸びる方向には大きな特徴は見いだせなかった。比較的長い樹状突起が多く見られた。確認できた樹状突起はすべて同側に留まっており、主に同側からの入力を受けるニューロンと考えられた。樹状突起の大部分(83.3-92.5 %)がⅦ層内に留まっていた。また、3 群の中では比較的、後角のⅤ層・Ⅵ層などに終わる樹状突起が多く見られた(図 4-6, 右の列)。この群でも小型細胞(M622)、大型細胞(M628)の形態解析を行うことができたが、両者は似通った形態学的特徴を有していた。

2. C-terminal を投射する partition cell の確認

Partition cell が可視化された例において、大型神経終末も同時に可視化された例が見られた。これらの大型神経終末を伴う軸索は、しばしば白質から灰白質内へと投射していた(図 4-7 A,B)。この神経終末が運動ニューロン上に接する像も見られた(図 4-7 C)。

Partition cell と大型神経終末を同時に認めた例の一部を用いて、コリン作動性神経終末のマーカーである VACHT と、GFP との二重染色を行った。その結

果, **partition cell** と同時に可視化される大型神経終末は **C-terminal** であることが確認され, ベクター注入により可視化された細胞の一部は, **C-terminal** 起始細胞であることの裏付けを得た (図 4-7 D).

また, **partition cell** の **medial group** のみが **C-terminal** の起始細胞であるかを確認する目的で, 全シリーズの切片を用いた染色を行った. 全シリーズを染色した M619 において, 可視化された **C-terminal** および **partition cell** を観察したところ, **C-terminal** と同時に可視化された **partition cell** は, **intermediate group** もしくは **lateral group** の **partition cell** のみであった. すなわち, M619 では **C-terminal** は可視化されているものの, **medial group** の **partition cell** は確認できなかった (図 4-8).

さらに, 26 例を用いた追加検討を行った. この追加検討において, **partition cell** と **C-terminal** との可視化の確認には, 1 個体につき 4 シリーズ作成した連続切片のうち, 1 シリーズのみを用いた. こうして検討したもののうち, **partition cell** と **C-terminal** が同時に可視化された例は 14 例であった. この 14 例中の 9 例においても, **medial group** は可視化されず, 中間~外側領域でのみ **partition cell** を認めた (表 4-1).

第4節：考察

Partition cell の形態学的特徴

脊髄Ⅶ層の内側から外側にわたって存在するコリン作動性の介在ニューロンは Barber, Phelps らによって見出され, ‘partition cell’ と呼ばれていた. これらの細胞は, 中心管からの距離に応じて medial/intermediate/lateral group の3群に分類されていたが^{24,28)}, その基準は曖昧であり, 3群のニューロンが明確な違いを有しているのかは, 明らかではなかった. 今回の研究で, partition cell の分類を細胞構築から再定義し, 明確な基準のもとで3群に分けることができ, それらの形態学的な特徴を解析することができた.

今回確認できた partition cell はいずれの群も, 樹状突起の成分の40%以上がⅦ層に終わっており, これらのニューロンの主な入力元の一つは脊髄Ⅶ層であると考えられる. また, 過去の報告において partition cell は, medial/intermediate/lateral いずれの群も, 脊髄前角へと軸索投射する可能性が指摘されている^{24,28)}. これらのことから, 3群の partition cell は, 主にⅦ層から入力を受け, Ⅸ層へと出力するという共通の投射様式を持つことが予想される. さらに, partition cell は, どの群のニューロンも歩行運動に応じて活動性を増すことが過去に報告されているため⁹⁷⁾, 3群のニューロンは, 機能の上でも, 運動調節に与るという似通った性質を持つと考えられる.

最近, C-terminal 起始細胞が I a 介在ニューロン (I a 線維から入力を受け, 拮抗筋の運動ニューロンに抑制的に働くニューロン) ヘシナプスを送るということが報告された⁹⁸⁾. この報告と, I a 線維の神経終末を多く受ける VII 層⁹⁹⁾ に, partition cell の樹状突起の多くの成分が見られることとは無関係ではないと思われる. すなわち, 今回確認した partition cell の一部, あるいは全ては, I a 線維からの入力情報を受け, 一方では C-terminal を介して運動ニューロンの興奮調節を行い, 他方で I a 介在ニューロンへ入力することで作動筋と拮抗筋の円滑な協調に働いているのだと考えうる.

今回確認した 3 群の partition cell には共通した特徴が見出される一方で, 各群のニューロンはそれぞれ異なった形態学的特徴も有していた. それらは各々のニューロンの機能的な違いを反映しているものと思われる.

Medial/intermediate group のニューロンは, いずれも細胞体が VII 層近傍の VII 層に存在し, また, VII 層および VIII 層に多く樹状突起を広げていた. VIII 層と, その近傍の VII 層腹側には, 対側の運動ニューロンに軸索投射する交連性の介在ニューロン (commissural interneuron) が存在することが知られている¹⁰⁰⁾. これらのニューロンは大部分がグルタミン作動性もしくはグリシン作動性であると考えられているが, 一部にはコリン作動性ニューロンも存在する⁹⁵⁾. 今回の結果でも, 注入側から対側へ投射するコリン作動性の軸索が確認された. 交

連性介在ニューロンは、上位からは、VII層腹側、VIII層に投射する網様体脊髓路¹⁰¹⁾や前庭脊髓路¹⁰²⁾などの入力を受け、末梢からは group I 線維や group II 線維からの入力を受けることが知られている¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。今回確認した **partition cell** のうち **medial group** や **intermediate group** のニューロンは、一部はこうした交連性ニューロンである可能性がある。

また、group I 線維や group II 線維から入力を受け、同側、対側の運動ニューロンへ投射する介在ニューロンがVII層にあることも知られており¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾、過去の報告では、VII層でも中間部から外側に比較的多く見られている。こうした介在ニューロンは、VII層内で樹状突起を多方向に伸ばすことが確認されており、形態的に、今回確認した **lateral group** のニューロンと類似したものが報告されている。

さらに、VII層中間ないし外側領域に存在し、離れた髄節の運動ニューロンへと直接投射するコリン作動性介在ニューロンがあることも最近報告されている¹⁰⁹⁾。今回の結果でも、こうした投射を行っていると思われる軸索が認められた。今回確認した **intermediate group** や、**lateral group** の **partition cell** は、このような投射様式のニューロンに含まれる可能性も考えられる。

なお、M630 で見られた **medial group** のニューロンや M641 で見られた **intermediate group** のニューロン（図 4-4）のように、両側に樹状突起を広げ

るニューロンは、樹状突起が同側で終わるものとはやや異なる性質があると考えられる。**Medial/intermediate group** のニューロンは、樹状突起が広がる範囲が両側か、片側かによってさらに細分類が可能であるかもしれない。

いずれにしても、今回確認したニューロンと類似した形態的特徴をもち、運動ニューロンに直接接続する介在ニューロンが過去に報告されている。

Partition cell は、中枢や末梢からの入力を統合し、運動ニューロンへの出力によって、歩行などの運動機能の調節に働くニューロンであると思われる。

現在のところ、樹状突起や細胞体を介した **partition cell** への入力については、**medial group** のものが GABA 作動性・セロトニン作動性・グルタミン作動性の各神経終末を受けていることが報告されているのみ¹³⁾であり、それらの入力元もはっきりとしない。今回得られた知見は、**partition cell** への入力をさらに詳細に解析する手がかりになると思われる。

Partition cell で見られた細胞面積の違い

先行研究では、**partition cell** の細胞面積は概ね一様であるとしており^{13,24,28)}、今回多く見られたような小型細胞についての言及は少ない。今回採用した手法では、従来の免疫組織化学法では染色が困難であった **partition cell** の 2 次、3 次樹状突起や、Ⅲ層のコリン作動性終末などが明瞭に描出できているため、過去の方法では見られなかった細胞群が今回明らかになったのだと考える。今回

確認し得た限りでは、**intermediate group** や **lateral group** のそれぞれにおいて小型と大型細胞の樹状突起の形態的特徴は類似していた。そのため、これらの細胞はサイズは異なるが、類似の入力元からシナプスを受けているものと思われる。細胞サイズの大小は出力様式の違いを反映している可能性があり、例えば、**C-terminal** の投射先である α 運動ニューロンの運動単位の大きさに応じて起始細胞のサイズが異なる可能性や、あるいは投射先の α 運動ニューロンが速筋支配であるか、遅筋支配であるかによって起始細胞のサイズが異なるといった可能性などが考えられるが、現段階ではこれらの仮説を支持する所見がないため今後の検証が必要である。

なお、今回検討した領域で見られうる他のコリン作動性神経として、**central canal cluster cell** や、交感神経節前細胞などがあるが^{24,27-28,110)}、これらのニューロンは分布の特徴から **partition cell** と鑑別が可能であり、こうした細胞集団を誤って検討に組み入れている可能性は低いと考えた。

C-terminal 起始細胞に関する先行研究との比較

脊髄 **C-terminal** 起始細胞の存在領域を初めて明らかにしたのは **Miles** らである。彼らは、脊髄VII層内側のコリン作動性介在ニューロンが **C-terminal** の起始となることを見出し、これらの細胞は、かつて **partition cell** の **medial group** と呼ばれていたものと同一であると報告した¹²⁾。

Miles らの報告以後は、もっぱらⅦ層内側の領域に存在する細胞集団に注目して C-terminal 起始細胞に関する報告がなされているが^{12-13,63,95-96,111)}、これらの報告は、すべて腰髄を対象にした検討である。C-terminal 起始細胞に関する先行報告は、Ⅶ層のどこまでを内側と見做すかという基準を欠いており、また、これらの報告の中には、今回定義した intermediate group に属する細胞を C-terminal 起始細胞としているものもある。すなわち、本研究で明らかにした細胞構築を元にした分類を適用すれば、intermediate group の partition cell にも C-terminal 起始細胞が存在する可能性がある。さらに、今回検討した intermediate group の分布は、中心管から 400 nm 以内と、従来腰髄で報告されている起始細胞の分布範囲よりも広い領域にわたっていた。すなわち、C-terminal 起始細胞の分布範囲は、頸髄ではやや外側に広がっている可能性がある。C-terminal の研究を進めるに当たり、こうした吻尾方向での起始細胞の分布の違いを認識することは重要であると思われる。

Partition cell と C-terminal が可視化された例について

M619において、C-terminal と同時に可視化されたのが intermediate/lateral group の partition cell のみであったことは、即ち、C-terminal の起始細胞が medial group の partition cell に限らないことを示唆している。さらに、追加の検討で、partition cell もしくは C-terminal が可視化された例は 26 例あった

が、このうちの 9 例においても、C-terminal と同時に可視化されたのは、intermediate/lateral group の partition cell のみであった。この所見もまた、intermediate/lateral group の partition cell から C-terminal が送られている可能性を示唆しており、C-terminal 起始細胞が必ずしも medial group の partition cell に限らないという仮説を支持する結果であると言える。

26 例の追加検討の結果は、4 シリーズ作成した連続切片のうち、1 シリーズのみを用いて行った観察から得られたものであるため、観察から漏れた切片の中に C-terminal を投射する medial group の partition cell が含まれていた可能性も考える。しかし、これらの例すべてで均一な方法で観察を行ったにもかかわらず、medial group の partition cell と C-terminal 起始細胞が同時に確認できた例はむしろ少数であったこと（26 例中 5 例のみ）からは、やはり C-terminal 起始細胞は medial group に限らない可能性が示唆される。

なお、上記の 26 例のうち、partition cell のみが可視化されていた 4 例では、ウイルス感染により産生された GFP が、神経終末を標識する以前の時点で灌流・組織切片作成が行われたため、partition cell の細胞体のみが可視化されていたのだと考えられる。また、C-terminal のみが可視化されていた 8 例においては、GFP がニューロンの細胞体から神経終末を標識するのに十分な量産生されたのち、ウイルス毒性による変性などによって、細胞体は変性してしまった

ものの、神経終末のみは可視化されたままに残ったという可能性が考えられる。

Partition cell と **C-terminal** が同時に可視化されていた 14 例は、GFP が充分量産生され、細胞体も神経終末も同時に標識されている適切な時期に灌流・組織切片作成が行われたのだと思われる。

まとめ

本章の結果をまとめると，以下のように結論付けることが出来る．

- ①前章で確立した手法を用いることで，脊髄Ⅶ層にあるコリン作動性の介在ニューロン群，すなわち **partition cell** を可視化することができた．
- ②**partition cell** は細胞面積によって 2 つの群に分類することが出来た．
- ③さらに，2 群に大別できた **partition cell** の分布様式に従い，脊髄Ⅶ層の **partition cell** が存在する領域を内側領域・中間領域・外側領域に分類することができた．
- ④上記の内側領域・中間領域・外側領域に存在する **partition cell** は，それぞれに異なった傾向で樹状突起を伸ばしており，樹状突起の広がりも各々の細胞で異なることが明らかとなった．
- ⑤可視化された **partition cell** の一部は，C-terminal 起始細胞であるということを確認した．

第 5 章：総合考察

本研究では、脳幹・脊髄において、C-terminal という特徴的な神経終末をもつコリン作動性介在ニューロンに着目し、その形態学的な特徴の解明を試みた。今回得られた知見を元に、以下の 3 項目について考察する。

Pitx2 陽性細胞の分布領域と C-terminal 起始細胞の分布領域について

C-terminal 起始細胞は、2009 年に、脊髄においてその存在領域が明らかにされた。以来、脊髄における C-terminal 起始細胞の報告は相次いでいるが、脳幹における C-terminal 起始細胞の検討は、本研究以前には少なく、特に鰓弓運動性神経核へ C-terminal を送る起始細胞についての検討はなされていなかった。

今回の検討では、脳幹の吻側へ行くに従って、C-terminal 起始細胞が *Pitx2* を発現しなくなることが明らかとなった。すなわち、脳幹において *Pitx2* の発現パターンは、吻尾方向で変化してゆく可能性が示唆された。脊髄においても、*Pitx2* の発現は吻尾で異なることが既報で観察されている。すなわち、腰髄から胸髄では中心管付近に見られるが、頸髄では徐々に中心管から離れた外側領域へと分布が広がってゆく¹³⁾。*Pitx2* の分布に関する既報告と、今回の検討結果からは、この転写因子は神経伝達物質に依存して発現するのではなく、吻尾方向の局在に依存した発現をしていることが示唆される。

また、今回の脳幹での検討では、**C-terminal** 起始細胞自身も、脊髄から延髄吻側に向かうに従い、徐々にその分布領域が中心管から外側へ離れてゆく傾向があることが観察された。さらに、頸髄で行った本研究の結果でも、従来の報告にある腰髄での検討結果に比べ、**C-terminal** 起始細胞の分布領域がやや外側に広がっている可能性が考えられた。すなわち、**C-terminal** 起始細胞の分布領域もまた、吻尾でやや異なっていると考えられる。

Zagoraïou らの報告以来、**partition cell** の **medial group** で、かつ、*Pitx2* を発現しているもののみが **C-terminal** 起始細胞と考えられている。こうした立場に立てば、上記した結果は、「**C-terminal** 起始細胞は腰髄付近では中心管近傍にのみ分布し、吻側に行くに従って徐々に外側へと分布領域を広げる」とまとめることができる。

しかし、*Pitx2* の発現とコリン作動性ニューロンの分布が延髄吻側以降では一致しなくなることを考えると、脊髄においても、必ずしも *Pitx2* 発現細胞のみが **C-terminal** 起始細胞と限らない可能性もあると思われる（後述）。

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について

今回の実験系では、細胞体・樹状突起を単一ニューロンレベルで可視化し得たが、軸索終末までを可視化するに至らなかった。3 章の考察部分で述べたように、ウイルスベクター自身の問題によるところがあると思われる。

アデノウイルスは、大きいサイズの遺伝子を組み込み可能で、高力価の精製が容易なことが大きな利点であるが、反面、ウイルス自身に細胞毒性があり¹¹²⁾、免疫反応を惹起しやすい¹¹³⁾という望ましくない特徴も有している。さらに、今回レポーター蛋白として用いた **DsRed** も、ニューロンに対する毒性がある可能性がある。これらの原因のため、軸索終末へ **GFP** が十分に到達する前に神経変性・脱落が始まり、細胞の完全な可視化に至らなかったのではないかとと思われる。

こうした欠点を克服するために、**AAV** などの細胞毒性の低いウイルス種への変更や、免疫抑制剤の併用、**DsRed** 配列の削除などの手段が考えられる。また、今回の検討では **ABC** 法を用いたシグナル増感を行ったが、より感度の高いチラミドを用いた染色法¹¹⁴⁾などによって、高い解像度でニューロン解析を行うことが選択肢として残されている。

脊髄 **C-terminal** 起始細胞は *partition cell* の *medial group* に限られるのか？

今回、脊髄で行った検討では、**partition cell** の樹状突起の広がりについては明らかにすることができたが、細胞体から軸索終末までの可視化は実現できなかった。現時点で **C-terminal** 起始細胞の存在領域に関する報告は、順行性標識を用いた裏付けを欠いているため、かならずしも起始細胞の存在領域全てが解明されているとは限らない。そのため、今回開発した手法をさらに洗練して、

C-terminal 起始細胞の存在領域を改めて確認する必要がある。

現時点では、脊髄 C-terminal 起始細胞は partition cell の medial group のみであると考えられている。しかし、逆行性標識を用いた検討において、運動ニューロンと直接シナプスするコリン作動性の介在ニューロンが脊髄Ⅶ層の中間～外側領域に存在することが報告されている^{95,109)}。また、partition cell の全てのグループが脊髄前角へ軸索投射する可能性があることが指摘されている²⁸⁾。さらに今回ウイルスベクターにより C-terminal が可視化された例で、従来の分類での medial group を含まず、他の群の partition cell のみが同時に可視化される例もあったことを考えると、C-terminal 起始細胞は必ずしも medial group の partition cell だけに限らない可能性も充分考えられる。

今後さらに注入条件を検討し、ウイルスベクター種や染色の増感法を変更することで、partition cell それぞれの軸索終末までを可視化することを目指す。こうした検討の中で、はたして脊髄 C-terminal 起始細胞は medial group の partition cell のみであるのか、他のニューロン群も C-terminal を運動ニューロンに送っているのかが、明らかとなるはずである。

今後の展望

今回の研究成果を踏まえた展望を以下に述べる。

本研究第 2 章においては、延髄吻側以降で *Pitx2* が C-terminal 起始細胞のマーカーとなり得ないことが判明した。C-terminal は、外転神経、動眼神経などの神経核上にも認められるため、C-terminal 起始細胞は延髄より吻側においても存在するはずである。脳幹吻側部における起始細胞のマーカーは現在のところ不明であり、その探索が今後必要になると考えられる。

次に、今回の検討では、鰓弓運動性神経核に C-terminal を送る起始細胞が、両側の複数の鰓弓運動性神経核に同時に投射することが示唆された。しかし、脳幹 C-terminal 起始細胞の形態を単一ニューロンレベルで解明するにはいたらなかった。そのため、今後は本研究で開発した手法を用いて、脳幹の C-terminal 起始細胞の形態学的特徴を解明する必要があると考える。

また、本研究の第 3 章において、脊髄コリン作動性ニューロンの形態を単一ニューロンレベルで捉えることに成功したが、軸索終末までを可視化するには至らなかった。今回開発した方法を洗練し、より解像度が高く、ニューロン変性を起こしにくい手法とする必要があると思われる。今後はベクターウイルス種を変更することや、感度の高い染色法を用いることなどを検討し、軸索終末までの細胞の可視化を追求したい。

さらに、今回開発した手法は、**Cre driver** マウスを変更すれば、多様な神経系の解析に応用可能な方法である。そのため、将来的にはコリン作動性以外の介在ニューロンの解析にも取り組みたいと考えている。

最後に、本研究第 4 章では **partition cell** の形態学的特徴を明らかにしたが、**partition cell** へ樹状突起を介してどういった入力となされているのかについては、現在のところほとんど知見がない。今後は **partition cell** への入力がどのようなものであるかを解明する目的で、今回開発したニューロン可視化法と、伝達物質に対する免疫組織化学染色などを併用した解析を行いたい。

結論

本研究の結論は、以下の通りである.

1. 延髄の舌下神経核中間部より吻側においては, **C-terminal** 起始細胞に転写因子 *Pitx2* の発現が見られなくなる. (第 2 章)
2. 鰓弓運動性神経核へ **C-terminal** を送る起始細胞は, 延髄大細胞性網様体中存在する. (第 2 章)
3. 今回開発した, **Cre/lox** システムと, アデノウイルスベクターを用いた神経標識法により, 単一ニューロンレベルの形態解析が可能である. (第 3 章)
4. 脊髄の **partition cell** は, 脊髄灰白質内での分布により 3 群に分類可能で, 各々の群のニューロンは樹状突起の広がり異なる特徴がある. (第 4 章)

引用文献

1. 萬年甫. 脳を固める・切る・染める—先人の知恵. 東京, 日本: メディカルレビュー社, 2011.
2. 小川鼎三. 序文. In: 萬年甫 (編訳), 神経学の源流 2. ラモニ・カハール. 東京, 日本: 東京大学出版会, 1992.
3. Butcher LL, Woolf N.J. Cholinergic neurons and networks revisited. In: Paxinos G, editor. The Rat Nervous System. 3rd ed. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press, 2004.
4. Conradi S, Skoglund S. Observations on the ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the cat during postnatal development. *Acta Physiol Scand Suppl* 1969;333:5-52.
5. Nagy JI, Yamamoto T, Jordan LM. Evidence for the cholinergic nature of C-terminals associated with subsurface cisterns in alpha-motoneurons of rat. *Synapse* 1993;15(1):17-32.
6. Li W, Ochalski PA, Brimijoin S, Jordan LM, Nagy JI. C-terminals on motoneurons: electron microscope localization of cholinergic markers in adult rats and antibody-induced depletion in neonates. *Neuroscience* 1995;65(3):879-91.
7. Hellström J, Oliveira AL, Meister B, Cullheim S. Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. *J Comp Neurol* 2003;460(4):476-86.
8. Muennich EA, Fyffe RE. Focal aggregation of voltage-gated, Kv2.1 subunit-containing, potassium channels at synaptic sites in rat spinal motoneurons. *J Physiol* 2004;554(Pt 3):673-85.
9. Deardorff AS, Romer SH, Deng Z, Bullinger KL, Nardelli P, Cope TC, et al. Expression of postsynaptic Ca²⁺-activated K⁺ (SK) channels at C-bouton synapses in mammalian lumbar alpha-motoneurons. *J Physiol* 2012.
10. Mavlyutov TA, Epstein ML, Andersen KA, Ziskind-Conhaim L, Ruoho AE. The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience* 2010;167(2):247-55.
11. Mavlyutov TA, Epstein ML, Liu P, Verbny YI, Ziskind-Conhaim L, Ruoho AE. Development of the sigma-1 receptor in C-terminals of

- motoneurons and colocalization with the N,N'-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyl transferase. *Neuroscience* 2012;206:60-8.
12. Miles GB, Hartley R, Todd AJ, Brownstone RM. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(7):2448-53.
 13. Zagoraïou L, Akay T, Martin JF, Brownstone RM, Jessell TM, Miles GB. A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron* 2009;64(5):645-62.
 14. Siegesmund KA. The fine structure of subsurface cisterns. *Anat Rec* 1968;162(2):187-96.
 15. Pullen AH, Athanasiou D. Increase in presynaptic territory of C-terminals on lumbar motoneurons of G93A SOD1 mice during disease progression. *Eur J Neurosci* 2009;29(3):551-61.
 16. Pullen AH, Sears TA. Modification of "C" synapses following partial central deafferentation of thoracic motoneurons. *Brain Res* 1978;145(1):141-6.
 17. Herron LR, Miles GB. Gender-specific perturbations in modulatory inputs to motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 2012;226:313-23.
 18. Casas C, Herrando-Grabulosa M, Manzano R, Mancuso R, Osta R, Navarro X. Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain and behavior* 2013;3(2):145-58.
 19. Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 2011;70(6):913-9.
 20. Fecto F, Siddique T. SIGMAR1 mutations, genetic heterogeneity at the chromosome 9p locus, and the expanding etiological diversity of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 2011;70(6):867-70.
 21. McLaughlin BJ. Propriospinal and supraspinal projections to the motor nuclei in the cat spinal cord. *J Comp Neurol* 1972;144(4):475-500.
 22. Matsushita M, Ikeda M. Propriospinal fiber connections of the cervical motor nuclei in the cat: a light and electron microscope study. *J Comp Neurol* 1973;150(1):1-32.
 23. Nakata T, Matsuda S, Matsumura G, Kobayashi Y. C-terminals in the

- spinal ventral horn originate in cholinergic neurons in the medial lamina VII. Abstracts. Neurosci. Res. 2007;58S:S1-S244, (P2-e27).
24. Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 1984;229(3):329-46.
 25. Kobayashi Y, Okuda T, Fujioka Y, Matsumura G, Nishimura Y, Haga T. Distribution of the high-affinity choline transporter in the human and macaque monkey spinal cord. *Neurosci Lett* 2002;317(1):25-8.
 26. Misawa H, Nakata K, Matsuura J, Nagao M, Okuda T, Haga T. Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 2001;105(1):87-98.
 27. Phelps PE, Barber RP, Brennan LA, Maines VM, Salvaterra PM, Vaughn JE. Embryonic development of four different subsets of cholinergic neurons in rat cervical spinal cord. *J Comp Neurol* 1990;291(1):9-26.
 28. Phelps PE, Barber RP, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. Postnatal development of neurons containing choline acetyltransferase in rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 1984;229(3):347-61.
 29. Haizuka Y, Matsui T, Matsumura G, Kobayashi Y. Origin of C-terminals in the rat hypoglossal nucleus. *J Kyorin Med Soc* 2009;40:51-65.
 30. 萬年甫（編訳）．神経学の源流 2．ラモニ・カハール．東京，日本：東京大学出版会，1992．
 31. 萬年甫．脳の探求者ラモニ・カハール—スペインの輝ける星．東京，日本：中央公論社，1991．
 32. Stretton AO, Kravitz EA. Neuronal geometry: determination with a technique of intracellular dye injection. *Science* 1968;162(3849):132-4.
 33. Kristensson K, Olsson Y. Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res* 1971;29(2):363-5.
 34. Keizer K, Kuypers HG, Huisman AM, Dann O. Diamidino yellow dihydrochloride (DY . 2HCl); a new fluorescent retrograde neuronal tracer, which migrates only very slowly out of the cell. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 1983;51(2):179-91.

35. Kuypers HG, Bentivoglio M, Catsman-Berrevoets CE, Bharos AT. Double retrograde neuronal labeling through divergent axon collaterals, using two fluorescent tracers with the same excitation wavelength which label different features of the cell. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 1980;40(4):383-92.
36. Bentivoglio M, Kuypers HG, Catsman-Berrevoets CE, Dann O. Fluorescent retrograde neuronal labeling in rat by means of substances binding specifically to adenine-thymine rich DNA. *Neurosci Lett* 1979;12(2-3):235-40.
37. Schmued LC, Fallon JH. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 1986;377(1):147-54.
38. Fabian RH, Coulter JD. Transneuronal transport of lectins. *Brain Res* 1985;344(1):41-8.
39. Trojanowski JQ, Gonatas JO, Gonatas NK. Conjugates of horseradish peroxidase (HRP) with cholera toxin and wheat germ agglutinin are superior to free HRP as orthogradely transported markers. *Brain Res* 1981;223(2):381-5.
40. Trojanowski JQ, Gonatas JO, Gonatas NK. Horseradish peroxidase (HRP) conjugates of cholera toxin and lectins are more sensitive retrogradely transported markers than free HRP. *Brain Res* 1982;231(1):33-50.
41. Gerfen CR, Sawchenko PE. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res* 1984;290(2):219-38.
42. Veenman CL, Reiner A, Honig MG. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *Journal of neuroscience methods* 1992;41(3):239-54.
43. Katz LC, Burkhalter A, Dreyer WJ. Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature* 1984;310(5977):498-500.
44. Katz LC, Iarovici DM. Green fluorescent latex microspheres: a new retrograde tracer. *Neuroscience* 1990;34(2):511-20.

45. 石塚典生. 神経回路解析法の最近の進歩. *Brain and Nerve* 2010;62(3):205-07.
46. Lanciego JL, Wouterlood FG. A half century of experimental neuroanatomical tracing. *Journal of chemical neuroanatomy* 2011;42(3):157-83.
47. Tamamaki N, Nakamura K, Furuta T, Asamoto K, Kaneko T. Neurons in Golgi-stain-like images revealed by GFP-adenovirus infection in vivo. *Neuroscience research* 2000;38(3):231-6.
48. Wickersham IR, Finke S, Conzelmann KK, Callaway EM. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nature methods* 2007;4(1):47-9.
49. Yoshihara Y, Mizuno T, Nakahira M, Kawasaki M, Watanabe Y, Kagamiyama H, et al. A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene. *Neuron* 1999;22(1):33-41.
50. Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 2009;324(5925):354-9.
51. Karpova AY, Tervo DG, Gray NW, Svoboda K. Rapid and reversible chemical inactivation of synaptic transmission in genetically targeted neurons. *Neuron* 2005;48(5):727-35.
52. Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 1987;7(6):2087-96.
53. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(14):5166-70.
54. Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 2007;450(7166):56-62.
55. Kuhlman SJ, Huang ZJ. High-resolution labeling and functional manipulation of specific neuron types in mouse brain by Cre-activated viral gene expression. *PLoS One* 2008;3(4):e2005.
56. Yamamoto T, Hertzberg EL, Nagy JI. Subsurface cisterns in alpha-motoneurons of the rat and cat: immunohistochemical detection with antibodies against connexin32. *Synapse* 1991;8(2):119-36.

57. Gilmor ML, Nash NR, Roghani A, Edwards RH, Yi H, Hersch SM, et al. Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles. *J Neurosci* 1996;16(7):2179-90.
58. Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 1997;378(4):454-67.
59. Olzewski J, Baxter D. Cytoarchitecture of the human brain stem. 2nd ed. New York: Karger, 1982.
60. Leontovich TA, Zhukova GP. The Specificity of the Neuronal Structure and Topography of the Reticular Formation in the Brain and Spinal Cord of Carnivora. *J Comp Neurol* 1963;121:347-79.
61. Kanemitsu A. [3H]thymidine autoradiographic study in the transit part from the spinal cord to the medulla oblongata of the chick embryo--the ontogenetic relation between the reticular formation and the spinal cord. *Neurosci Lett* 1982;34(2):105-10.
62. Basu K, Gravel C, Tomioka R, Kaneko T, Tamamaki N, Siki A. Novel strategy to selectively label excitatory and inhibitory neurons in the cerebral cortex of mice. *Journal of neuroscience methods* 2008;170(2):212-9.
63. Stepien AE, Tripodi M, Arber S. Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells. *Neuron* 2010;68(3):456-72.
64. Hinrichsen CF, Watson CD. Brain stem projections to the facial nucleus of the rat. *Brain Behav Evol* 1983;22(2-3):153-63.
65. Isokawa-Akesson M, Komisaruk BR. Difference in projections to the lateral and medial facial nucleus: anatomically separate pathways for rhythmical vibrissa movement in rats. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 1987;65(2):385-98.
66. Li YQ, Takada M, Mizuno N. Premotor neurons projecting simultaneously to two orofacial motor nuclei by sending their branched axons. A study with a fluorescent retrograde double-labeling technique in the rat. *Neurosci Lett* 1993;152(1-2):29-32.
67. Popratiloff AS, Streppel M, Gruart A, Guntinas-Lichius O, Angelov DN,

- Stennert E, et al. Hypoglossal and reticular interneurons involved in oro-facial coordination in the rat. *J Comp Neurol* 2001;433(3):364-79.
68. Travers JB, Norgren R. Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 1983;220(3):280-98.
 69. Travers JB, Yoo JE, Chandran R, Herman K, Travers SP. Neurotransmitter phenotypes of intermediate zone reticular formation projections to the motor trigeminal and hypoglossal nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 2005;488(1):28-47.
 70. Jones BE. Immunohistochemical study of choline acetyltransferase-immunoreactive processes and cells innervating the pontomedullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 1990;295(3):485-514.
 71. Fort P, Luppi PH, Sakai K, Salvert D, Jouvet M. Nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat trigeminal motor nucleus: a double-labeling study with cholera-toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol* 1990;301(2):262-75.
 72. Hjalt TA, Semina EV. Current molecular understanding of Axenfeld-Rieger syndrome. *Expert reviews in molecular medicine* 2005;7(25):1-17.
 73. Martin DM, Skidmore JM, Philips ST, Vieira C, Gage PJ, Condie BG, et al. PITX2 is required for normal development of neurons in the mouse subthalamic nucleus and midbrain. *Developmental biology* 2004;267(1):93-108.
 74. Waite MR, Skidmore JM, Billi AC, Martin JF, Martin DM. GABAergic and glutamatergic identities of developing midbrain Pitx2 neurons. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2011;240(2):333-46.
 75. Enjin A, Rabe N, Nakanishi ST, Vallstedt A, Gezelius H, Memic F, et al. Identification of novel spinal cholinergic genetic subtypes disclose Chodl and Pitx2 as markers for fast motor neurons and partition cells. *J Comp Neurol* 2010;518(12):2284-304.
 76. Paxinos G, Franklin, K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.
 77. Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, et al. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science*

- 1993;259(5097):988-90.
78. Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S, Mandel JL. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(7):2581-4.
 79. Teschemacher AG, Wang S, Lonergan T, Duale H, Waki H, Paton JF, et al. Targeting specific neuronal populations using adeno- and lentiviral vectors: applications for imaging and studies of cell function. *Experimental physiology* 2005;90(1):61-9.
 80. Kameda H, Furuta T, Matsuda W, Ohira K, Nakamura K, Hioki H, et al. Targeting green fluorescent protein to dendritic membrane in central neurons. *Neuroscience research* 2008;61(1):79-91.
 81. Moriyoshi K, Richards LJ, Akazawa C, O'Leary DD, Nakanishi S. Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron* 1996;16(2):255-60.
 82. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994;265(5168):103-6.
 83. Gong S, Doughty M, Harbaugh CR, Cummins A, Hatten ME, Heintz N, et al. Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J Neurosci* 2007;27(37):9817-23.
 84. Tomioka R, Rockland KS. Improved Golgi-like visualization in retrogradely projecting neurons after EGFP-adenovirus infection in adult rat and monkey. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2006;54(5):539-48.
 85. Sakhuja K, Reddy PS, Ganesh S, Cantaniag F, Pattison S, Limbach P, et al. Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Human gene therapy* 2003;14(3):243-54.
 86. Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamamaki N, Kaneko T. In vivo transduction of central neurons using recombinant Sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2001;49(12):1497-508.
 87. Rahim AA, Wong AM, Howe SJ, Buckley SM, Acosta-Saltos AD, Elston KE, et al. Efficient gene delivery to the adult and fetal CNS using

- pseudotyped non-integrating lentiviral vectors. *Gene therapy* 2009;16(4):509-20.
88. Royo NC, Vandenberghe LH, Ma JY, Hauspurg A, Yu L, Maronski M, et al. Specific AAV serotypes stably transduce primary hippocampal and cortical cultures with high efficiency and low toxicity. *Brain Res* 2008;1190:15-22.
 89. Ugolini G. Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second-order and higher order central nervous system cell groups. *J Comp Neurol* 1995;356(3):457-80.
 90. Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford-Perricaudet LD, Poenaru L, Perricaudet M, et al. Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nature genetics* 1993;3(3):224-8.
 91. Ridoux V, Robert JJ, Zhang X, Perricaudet M, Mallet J, Le Gal La Salle G. The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells. *Neuroreport* 1994;5(7):801-4.
 92. Nishimura I, Uetsuki T, Dani SU, Ohsawa Y, Saito I, Okamura H, et al. Degeneration in vivo of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer amyloid precursor protein overexpressed by adenovirus-mediated gene transfer. *J Neurosci* 1998;18(7):2387-98.
 93. Snapp EL. Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide. *Trends in cell biology* 2009;19(11):649-55.
 94. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(22):11984-9.
 95. Bertrand SS, Cazalets JR. Cholinergic partition cells and lamina X neurons induce a muscarinic-dependent short-term potentiation of commissural glutamatergic inputs in lumbar motoneurons. *Frontiers in neural circuits* 2011;5:15.
 96. Coulon P, Bras H, Vinay L. Characterization of last-order premotor interneurons by transneuronal tracing with rabies virus in the neonatal mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 2011;519(17):3470-87.
 97. Huang A, Noga BR, Carr PA, Fedirchuk B, Jordan LM. Spinal cholinergic neurons activated during locomotion: localization and electrophysiological characterization. *J Neurophysiol* 2000;83(6):3537-47.

98. Siembab VC, Smith CA, Zagoraiou L, Berrocal MC, Mentis GZ, Alvarez FJ. Target selection of proprioceptive and motor axon synapses on neonatal V1-derived Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells. *J Comp Neurol* 2010;518(23):4675-701.
99. Ishizuka N, Mannen H, Hongo T, Sasaki S. Trajectory of group Ia afferent fibers stained with horseradish peroxidase in the lumbosacral spinal cord of the cat: three dimensional reconstructions from serial sections. *J Comp Neurol* 1979;186(2):189-211.
100. Jankowska E. Spinal interneuronal networks in the cat: elementary components. *Brain research reviews* 2008;57(1):46-55.
101. Matsuyama K, Nakajima K, Mori F, Aoki M, Mori S. Lumbar commissural interneurons with reticulospinal inputs in the cat: morphology and discharge patterns during fictive locomotion. *J Comp Neurol* 2004;474(4):546-61.
102. Krutki P, Jankowska E, Edgley SA. Are crossed actions of reticulospinal and vestibulospinal neurons on feline motoneurons mediated by the same or separate commissural neurons? *J Neurosci* 2003;23(22):8041-50.
103. Jankowska E, Cabaj A, Pettersson LG. How to enhance ipsilateral actions of pyramidal tract neurons. *J Neurosci* 2005;25(32):7401-5.
104. Jankowska E, Edgley SA, Krutki P, Hammar I. Functional differentiation and organization of feline midlumbar commissural interneurons. *J Physiol* 2005;565(Pt 2):645-58.
105. Jankowska E, Krutki P, Matsuyama K. Relative contribution of Ia inhibitory interneurons to inhibition of feline contralateral motoneurons evoked via commissural interneurons. *J Physiol* 2005;568(Pt 2):617-28.
106. Czarkowska J, Jankowska E, Sybirska E. Common interneurons in reflex pathways from group Ia and Ib afferents of knee flexors and extensors in the cat. *J Physiol* 1981;310:367-80.
107. Bras H, Cavallari P, Jankowska E, Kubin L. Morphology of midlumbar interneurons relaying information from group II muscle afferents in the cat spinal cord. *J Comp Neurol* 1989;290(1):1-15.
108. Bannatyne BA, Liu TT, Hammar I, Stecina K, Jankowska E, Maxwell DJ. Excitatory and inhibitory intermediate zone interneurons in pathways from feline group I and II afferents: differences in axonal

- projections and input. *J Physiol* 2009;587(Pt 2):379-99.
109. Liu TT, Bannatyne BA, Maxwell DJ. Organization and neurochemical properties of intersegmental interneurons in the lumbar enlargement of the adult rat. *Neuroscience* 2010;171(2):461-84.
110. Phelps PE, Barber RP, Vaughn JE. Generation patterns of four groups of cholinergic neurons in rat cervical spinal cord: a combined tritiated thymidine autoradiographic and choline acetyltransferase immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 1988;273(4):459-72.
111. Jovanovic K, Pastor AM, O'Donovan MJ. The use of PRV-Bartha to define premotor inputs to lumbar motoneurons in the neonatal spinal cord of the mouse. *PLoS One* 2010;5(7):e11743.
112. Washbourne P, McAllister AK. Techniques for gene transfer into neurons. *Current opinion in neurobiology* 2002;12(5):566-73.
113. Lowenstein PR, Mandel RJ, Xiong WD, Kroeger K, Castro MG. Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions. *Current gene therapy* 2007;7(5):347-60.
114. Wang N, Gibbons CH, Freeman R. Novel immunohistochemical techniques using discrete signal amplification systems for human cutaneous peripheral nerve fiber imaging. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2011;59(4):382-90.

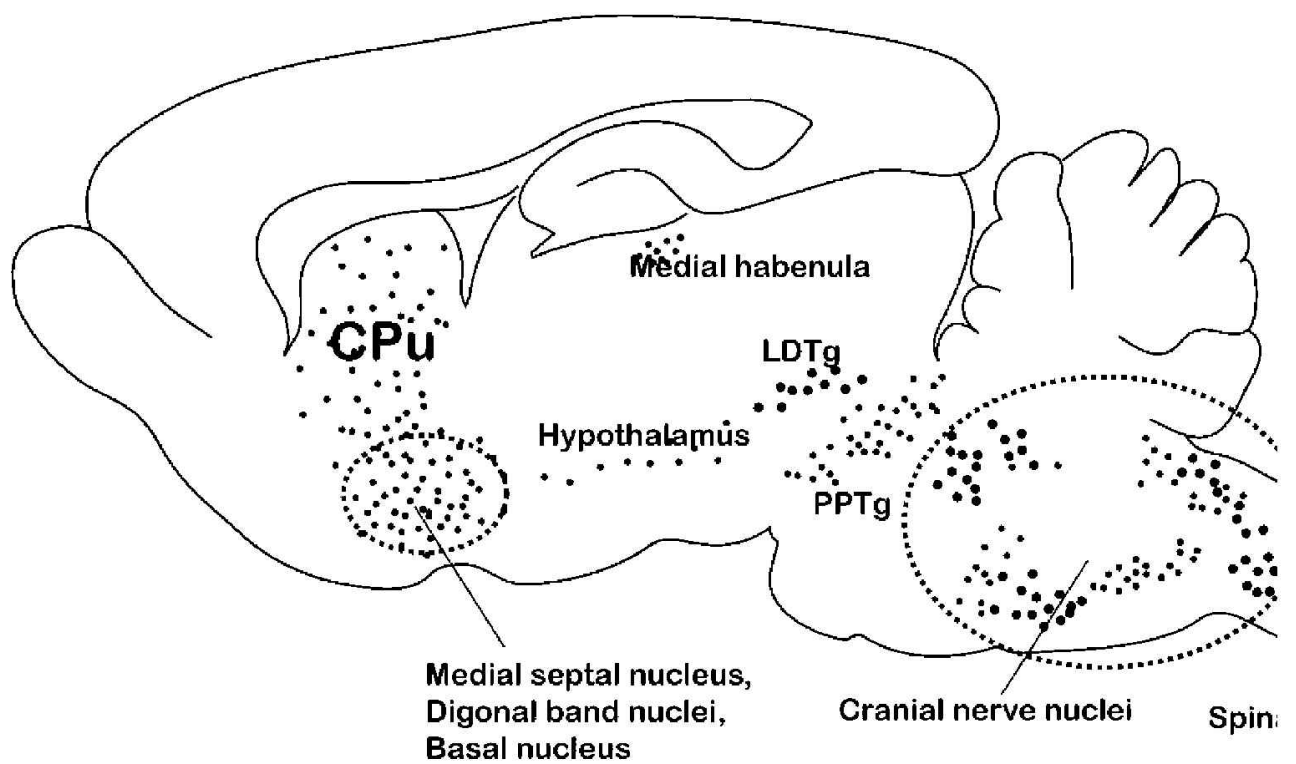


図 1-1. 中枢神経系における主なコリン作動性ニューロンの分布. (文献³⁾より改変).

コリン作動性ニューロン（赤丸）は、線条体、前脳基底部、視床下部、中脳、延髄、脊髄など
 CPu, caudate putamen; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; PPTg, pedunculopontine tegmentum

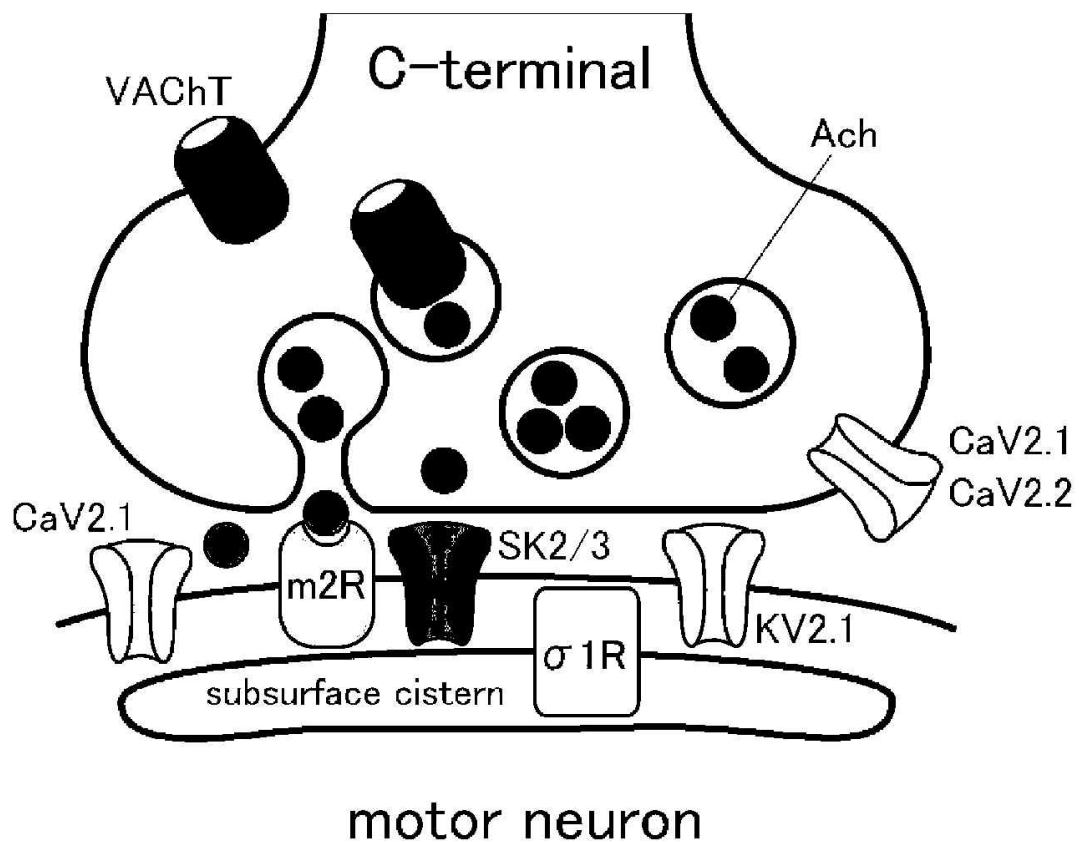


図 1-2. C-terminal と近傍の機能分子.

Ach, acetylcholine; CaV2.1, P/Q type voltage gated Ca channel ;
 CaV2.2, N type voltage gated Ca channel; KV2.1, voltage gated potassium
 channel; m2R, muscarinic 2 receptor; SK2/3, small conductance Ca activated
 potassium channel; σ 1R, sigma-1 receptor; VACht, vesicular acetylcholine
 transporter.

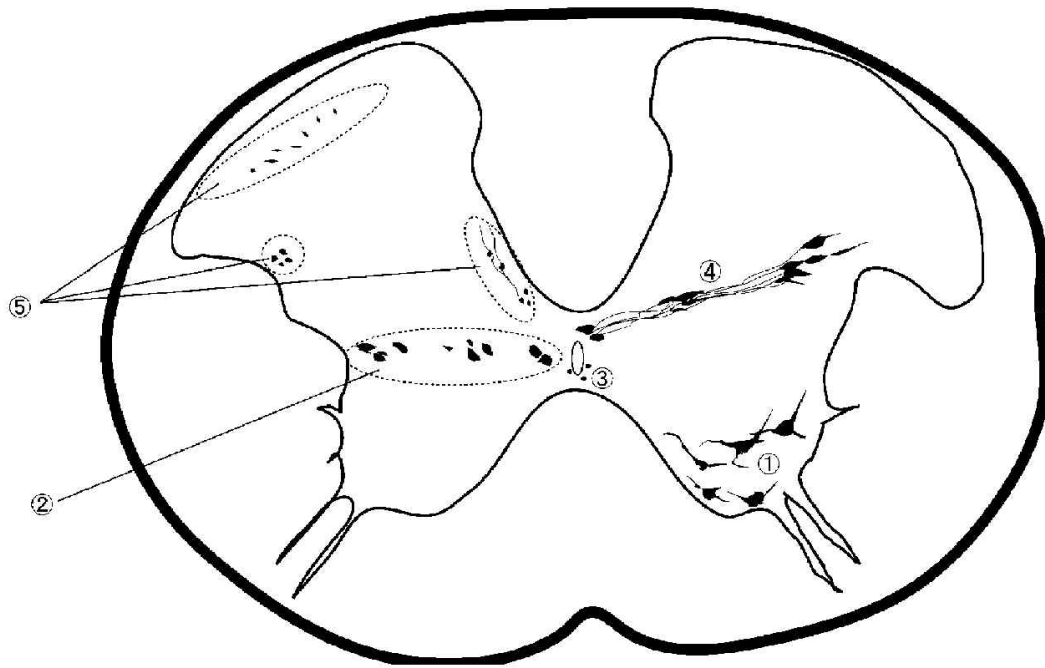


図 1-3. 脊髓の Choline acetyltransferase (ChAT) 陽性細胞.

(文献 28)を元に作図)

- ① : motor neuron. ② : partition cell. (medial/intermediate/lateral group)
- ③ : central canal cluster cell. ④ : spinal autonomic neuron.
- ⑤ : cholinergic dorsal horn cell.

Mouse #	Injection site		A-P (mm)	Lat (mm)
	Core	Halo		
427	SubC, PnC	-	-5.02	0.9
426	SubC	PnC	-5.02	1.0
428	PnC	IRt	-5.34	0.6
429	IRt, PnC	-	-5.40	0.8
583	LPGi, VIIIm	IRt, Gi	-6.00	1.0
584	LPGi, VIIIm	IRt, Gi	-6.24	0.8
416	IRt	Gi, PCRt, Sol, VeM	-6.36	0.9
469	IRt	Gi, PCRt, Sol, VeM	-6.36	1.0
468	Sol	IRt, PCRt, VSpO	-6.36	1.1
418	IRt, VeM	Gi, PCRt, Sol, VeSp	-6.40	0.9
467	IRt, Gi	PCRt	-6.64	0.8
466	IRt	Gi, PCRt, Sol, VeM	-6.72	0.8
495	IRt, Gi	PCRt, VeM	-6.72	0.8
496	IRt	Gi, PCRt, Sol, VSpI	-6.84	0.9
497	IRt, Gi	PCRt, VeM	-6.96	0.6
580	MdV	IRt	-7.56	0.6
581	MdV	IRt	-7.64	0.5
579	MdV, IO	IRt	-7.76	0.6
570	IRt, MdV	MdD, Cu	-8.12	0.6
568	IRt, MdV	MdD, Sol, Cu, Xd, XIIIm	-8.24	0.4
569	IRt, MdV, MdD	Cu	-8.24	0.6

表 2-1

表 2-1. BDA 注入部位.

実験を行った各個体について, BDA の注入部位を示す. 注入中心部位で, BDA 標識が高い密度で集中している領域を **Core** とし, その周辺でニューロンやグリア細胞の細胞体ならびにそれらの突起が非特異的に標識されている部位を **Halo** とした.

A-P, anterior-posterior; Lat, lateral; DV, dorsal-ventral.

VSpO, oral part of spinal trigeminal nucleus; VSpI, interpolar part of spinal trigeminal nucleus; VIIIm, facial nucleus; Xd, dorsal motor nucleus of vagus nerve; XIIIm, hypoglossal nucleus; Cu, cuneate nucleus; Gi, gigantocellular reticular nucleus; IO= inferior olive; IRt, intermediate reticular nucleus; LPGi, lateral paragigantocellular nucleus; MdD, dorsal part of the medullary reticular nucleus; MdV, ventral part of the medullary reticular nucleus; PCRt, parvicellular reticular nucleus; PnC, caudal part of pontine reticular nucleus; Sol, nucleus of solitary tract; SubC, subcoeruleus nucleus; VeM, medial vestibular nucleus; VeSp, spinal vestibular nucleus.



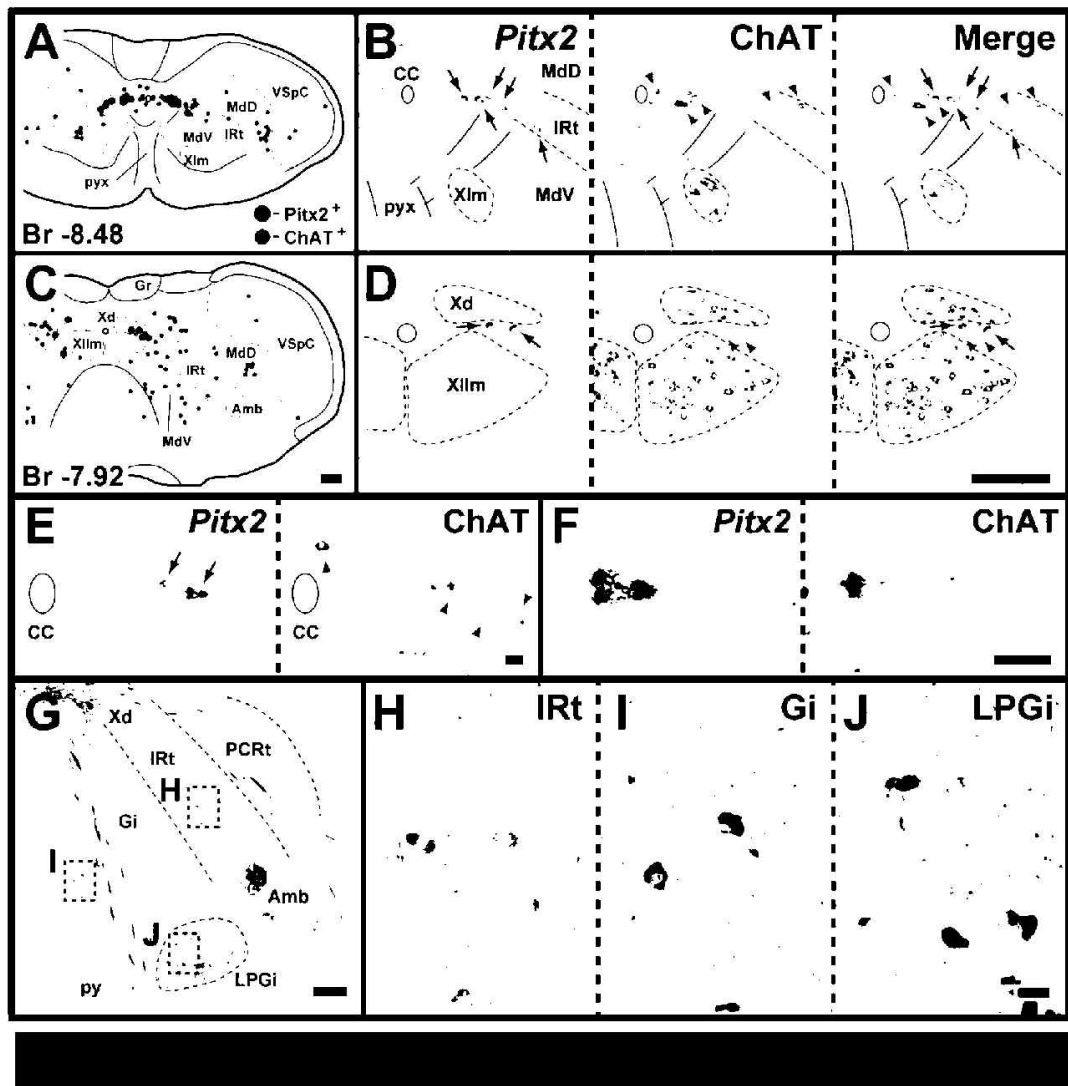
Mouse #	Vm		VIIIm		Amb	
	Ipsi	Cont	Ipsi	Cont	Ipsi	Cont
427	-	-	-	-	-	-
426	-	-	-	-	-	-
428	-	-	-	-	-	-
429	1	6	-	-	-	-
583	60	18	93	-	18	1
584	5	4	9	1	1	2
416	3	-	4	-	-	-
469	5	1	15	1	-	-
468	-	-	4	-	-	1
418	3	1	1	1	-	-
467	5	1	4	1	-	4
466	-	5	-	-	-	-
495	-	2	6	-	-	-
496	2	2	1	1	-	-
497	2	-	-	-	-	-
580	-	22	-	-	2	3
581	10	-	-	-	-	-
579	12	-	-	12	1	-
570	12	51	192	190	-	-
568	227	263	107	212	5	1
569	69	24	1	27	1	-

表 2-2.

表 2-2. 標識された C-terminal の分布.

BDA 注入によって順行性に標識された C-terminal の数をカウントした. #569 のように多数の C-terminal を複数の神経核で認める例がある一方で, BDA 注入が限局し, ごく少数の C-terminal しか標識されない例もあった. こうした少数の C-terminal のみが標識された例であっても, #584 や#467 のように複数の両側の鰓弓運動性神経核上に C-terminal を認めた.

Ipsi, ipsilateral side of injection site; Cont, contralateral side of injection site.
Vm, trigeminal motor nucleus; VIIm, facial nucleus; XIIIm, hypoglossal nucleus; Amb, ambiguous nucleus.



☒ 2-1.

図 2-1. 脳幹における *Pitx2* 陽性細胞とコリン作動性神経の分布パターン.

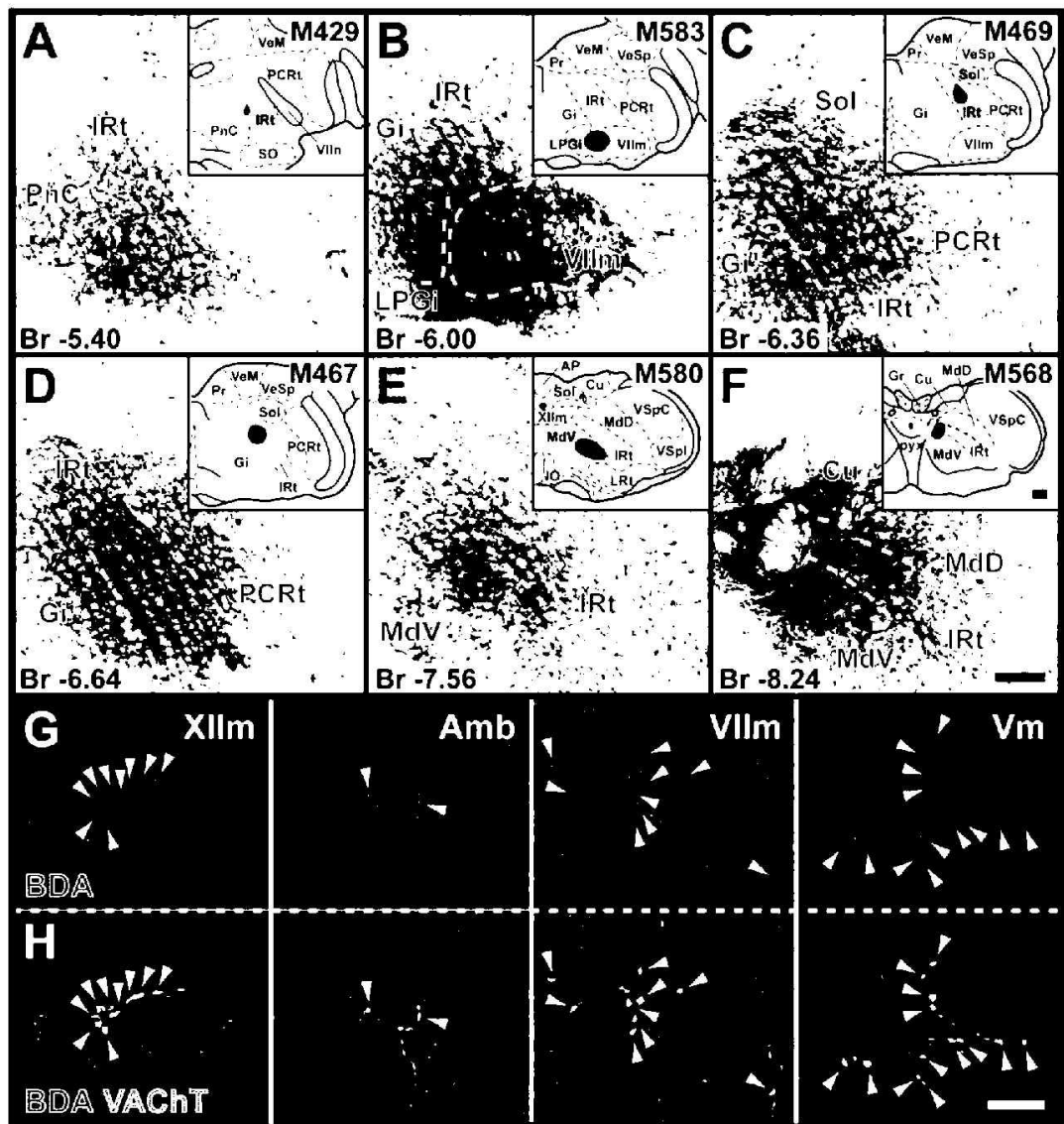
(A,C) 延髄尾側においては, *Pitx2* 陽性細胞 (緑) と, ChAT 陽性細胞 (黒) は, 中心管付近において分布が一致して見られた. (B,D) 隣接切片において *Pitx2* の ISH (左) と ChAT の免疫組織化学染色 (中) を行い, 分布パターンを確認した (右, 両者を重ね合わせた像). 中心管(cc)付近の中間細胞性網様核 (IRt) においては, *Pitx2* 陽性細胞 (矢印) の分布は, ChAT 陽性細胞 (矢じり) の分布と一致していた. (E,F) *Pitx2* と, ChAT を共に発現していると考えられる細胞も確認された. (G-J) 舌下神経核中間部 (C,D) よりも吻側のレベルでは, *Pitx2* 陽性細胞は確認できなくなり, 中間細胞性網様核 (H) や, 巨細胞性網様核 (I), 外側巨細胞性傍核 (J), などでは ChAT 単独陽性のニューロンが見られるようになった.

Scale bar: (A-D,G)= 200 μ m, (E,F,H-J)= 20 μ m.

線画の左下に示した数値は, 切片の位置を示す.

(例: Br -8.48 = プレグマから 8.48 mm 尾側のレベル)

VSpC, caudal part of spinal trigeminal nucleus; Xd, dorsal motor nucleus of vagus nerve; XIm, nucleus of accessory nerve; XIIIm, hypoglossal nucleus; Amb, ambiguous nucleus; cc, central canal; Gi, gigantocellular reticular nucleus; Gr, gracile nucleus; IRt, intermediate reticular nucleus; LPGi, lateral paragigantocellular nucleus; MdD, dorsal part of the medullary reticular nucleus; MdV, ventral part of the medullary reticular nucleus; pyx, pyramidal decussation.



2-2.



図 2-2. 代表的な注入例.

(A-F) BDA 注入中心の顕微鏡写真および、シェーマ (差し込み図). 差し込み図の濃い緑色は注入における Core を表わし, 薄い緑色は Halo を示す. (G,H) #568 で見られた C-terminal を示す. BDA で標識された大型神経終末 (G, 矢じり) は, 両側の舌下神経核 (XIIIm), 疑核 (Amb), 顔面神経核 (VIIIm), 三叉神経運動核 (Vm) で見られた. これらは免疫組織化学染色で BDA (緑色), VACHT (赤色) いずれも陽性であり (H, 矢じり), 大型のコリン作動性終末, すなわち C-terminal であると考えられる.

Scale bar: (A-F)= 200 μ m, (G,H)= 20 μ m.

Vm, trigeminal motor nucleus; VSpC, caudal part of spinal trigeminal nucleus; VIIIm, facial nucleus; XIIIm, hypoglossal nucleus; Amb, ambiguous nucleus; AP, area postrema; Br, bregma; BDA, biotinylated dextran amine; CGPn, central gray of the pons; Gi, gigantocellular reticular nucleus; Gr, gracile nucleus; IO, inferior olive; IRt, intermediate reticular nucleus; LPGi, lateral paragigantocellular nucleus; MdD, dorsal part of the medullary reticular nucleus; MdV, ventral part of the medullary reticular nucleus; PCRt, parvicellular reticular nucleus; PnC, caudal part of pontine reticular nucleus; Pr, prepositus nucleus; pyx, pyramidal decussation; SO, superior olive; Sol, nucleus of solitary tract; VACHT, vesicular acetylcholine transporter; VeM, medial vestibular nucleus; VeSp, spinal vestibular nucleus.

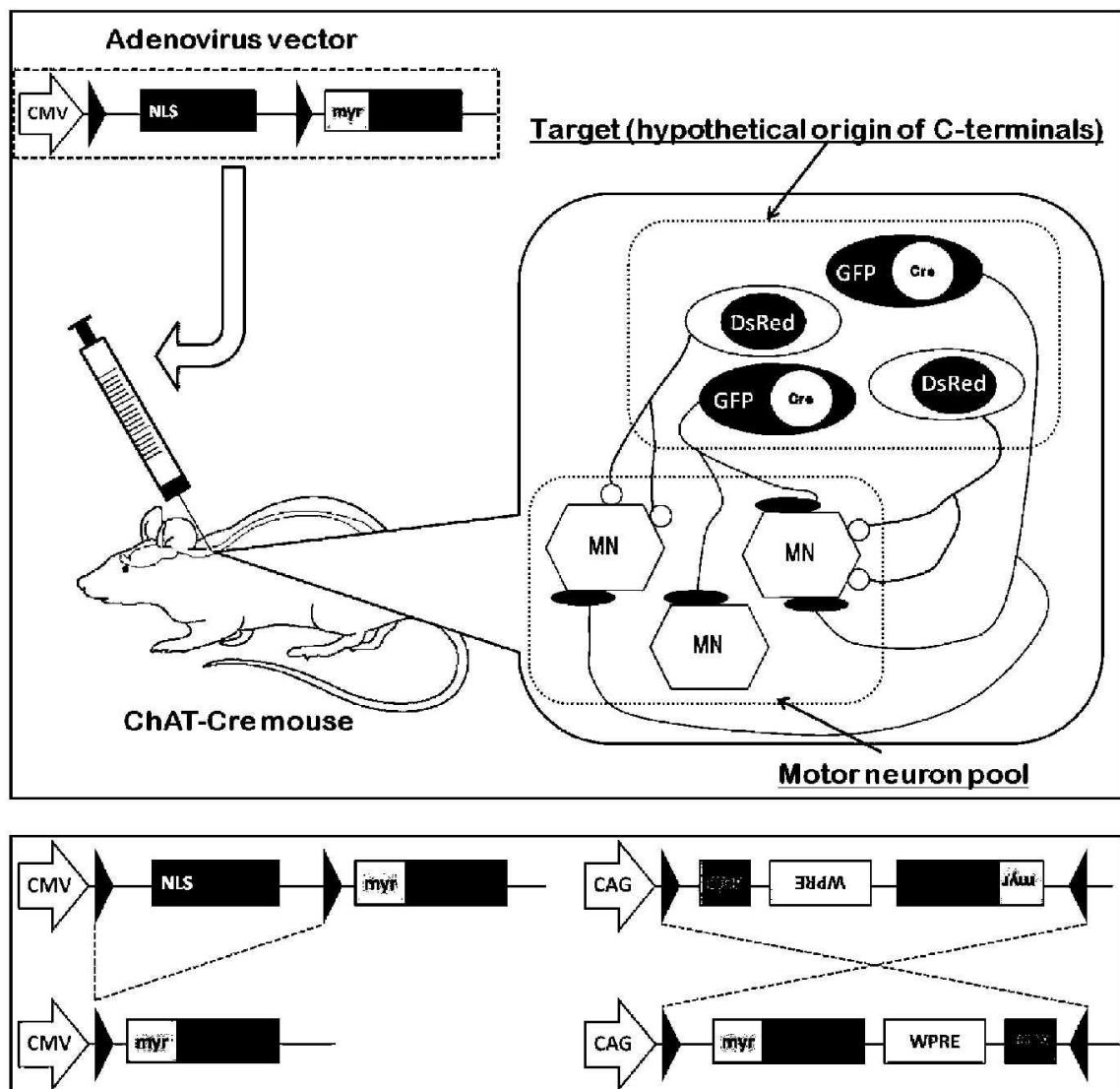


図 3-1.

図 3-1. アデノウイルスベクターと ChAT-Cre マウスを用いたコリン作動性神経特異的標識法の概要.

上段に、実験系の概要を示す. loxP 配列 (黒三角) を持つアデノウイルスベクターである Ad-nDsRed/myrGFP を ChAT-Cre マウスの C-terminal 起始細胞存在領域に注入すると、ウイルスベクターは、Cre recombinase (Cre) が存在しているコリン作動性ニューロンでは、主に細胞膜で GFP を発現する. そのため、C-terminal および起始細胞が GFP により可視化される. Cre 非存在の細胞ではウイルスベクターは細胞核で DsRed を発現する.

下段には、今回使用した 2 種のアデノウイルスベクターのコンストラクトを示す. Ad-nDsRed/myrGFP は上述のように Cre 存在下では膜移行シグナルを持つ GFP を発現し、Cre 非存在下では DsRed を発現する.

Ad-STOP/myrGFP-WPRE は、Cre 存在下で膜移行シグナルをもつ GFP をランダムに発現し、Cre 非存在下ではレポータータンパクを発現しない.

CAG, CMV-enhancer + chicken actin promoter; CMV, Cytomegalovirus promoter; Cre, Cre recombinase; GFP, green fluorescent protein; MN, motor neuron; myr, myristoylation/palmitoylation site of Fyn; NLS, nuclear localization signal; STOP, transcription terminate sequences; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

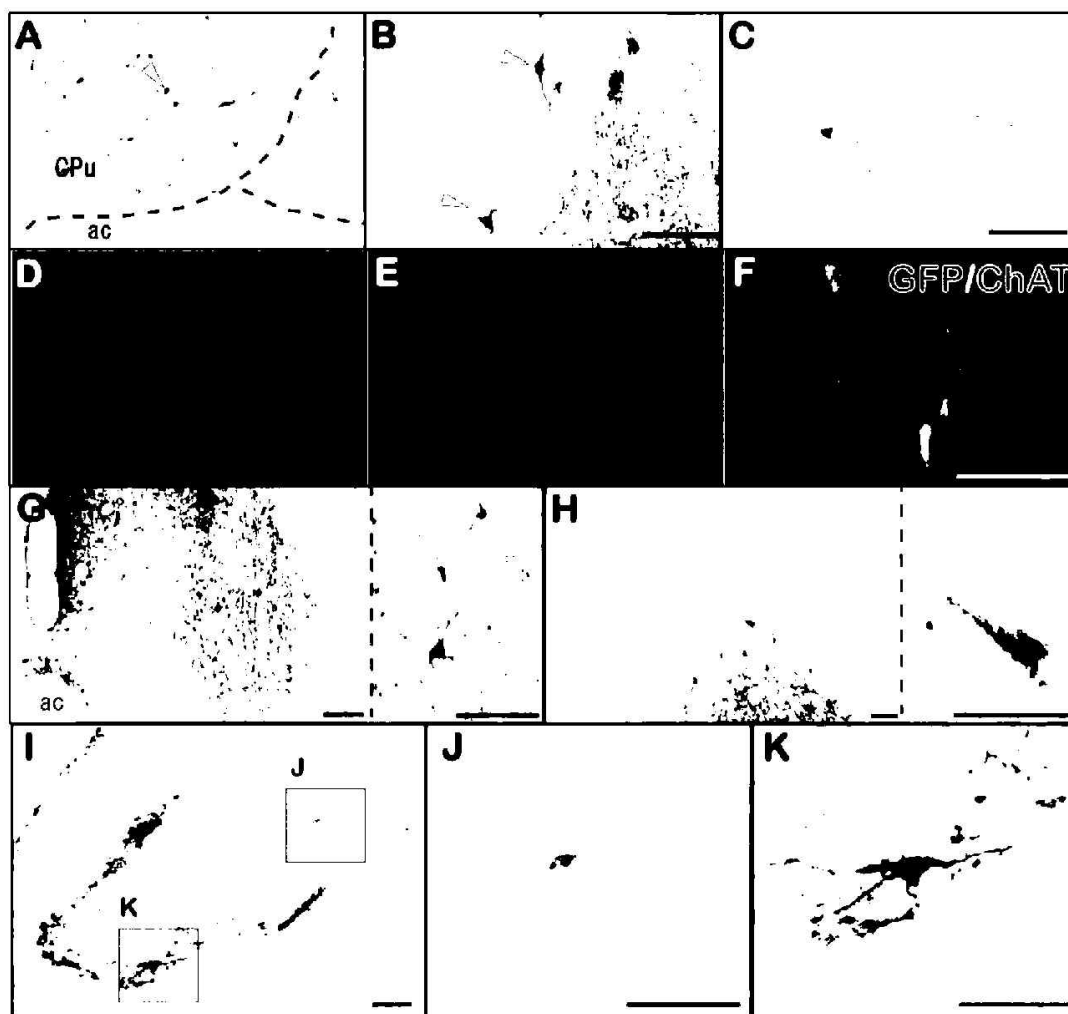


図 3-2.

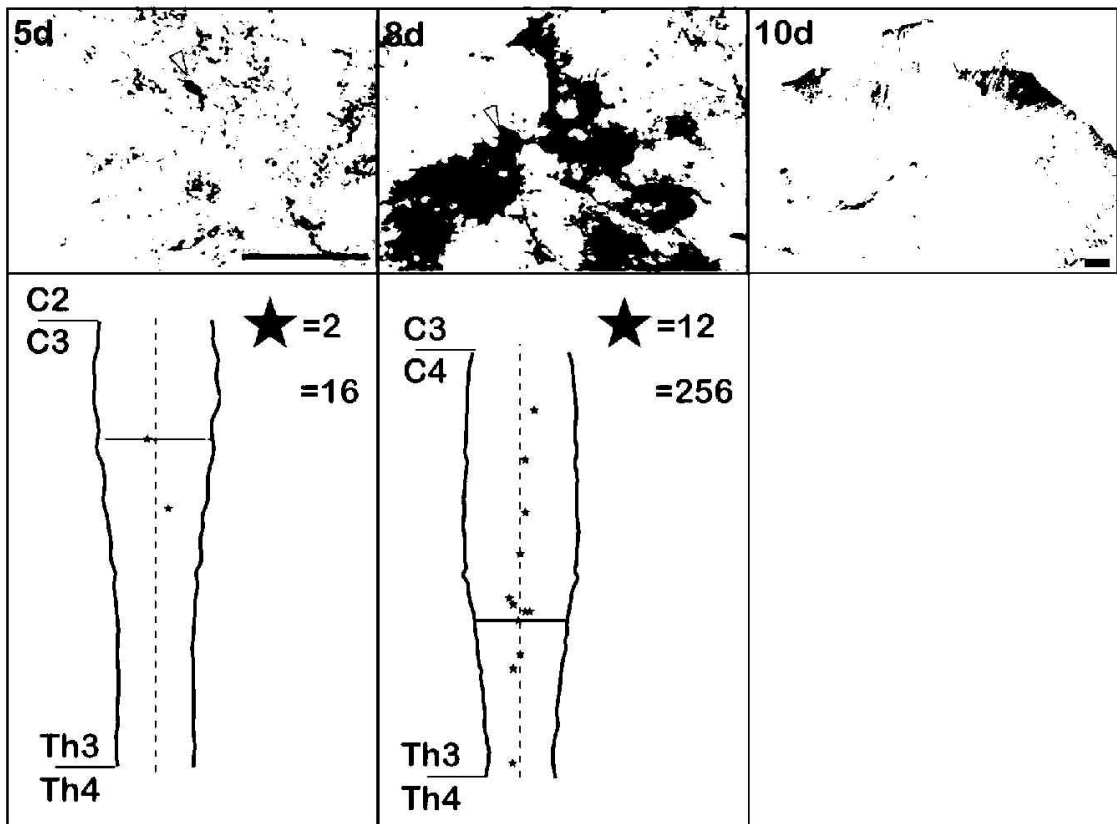
図 3-2. Ad-DsRed-myrGFP の ChAT-Cre マウス中枢神経内への注入結果.

(A-C) 線条体 (A), 内側中隔核 (B) にウイルスベクターを注入したところ, ニューロンが可視化された (三角). 注入の良好な例では, 線条体において樹状突起のトレースが可能だった (C). (D-E) 内側中隔核注入例で GFP (D), ChAT (E) の二重染色を行い, ウイルスベクター注入による GFP 発現がコリン作動性ニューロンに特異的に起きていることを確認した (F). (G-H) ウイルスベクター注入後からの生存期間, 注入量によって注入中心近傍でニューロンの変性が見られた. ウイルスベクター700nl 注入・注入後 5 日間生存例 (G) では可視化されるニューロンの形が保たれているが, 1500nl 注入・7 日間生存例 (H) ではニューロンの変性が明らかだった. (I-K) 脊髄注入例. Partition cell (J) および, 運動ニューロン (K) が同時に可視化されている.

Scale bar= 100 μ m

ac, anterior commissure; CPu, caudateputamen.

Ad-nDsRed/myrGFP :700 nl injection



☒ 3-3.

図 3-3. Ad-nDsRed/myrGFP の術後生存期間の検討.

700 nl 注入で術後生存期間を検討した. 術後 5 日ではシグナルは非常に弱く(三角), ニューロンの形態の評価は困難だった. 術後 8 日では, シグナルは増強するが, 目的とするニューロン(三角)以外のシグナルも強く, やはり評価が困難だった. 術後 10 日では注入中心近傍で著明な細胞脱落を認めた.

イラストの赤いラインは, 上に示した顕微鏡写真の切片の位置を示す. 青い星印は, 可視化されたコリン作動性の介在ニューロンを示す. 黄色い円は, 同時に可視化された運動ニューロンを示す. イラスト上での黄色い円の大きさは, 可視化された運動ニューロンの数を反映している.

Scale bar= 100 μ m.

C, cervical segment; Th, thoracic segment.

Ad-nDsRed/myrGFP : 8d survival

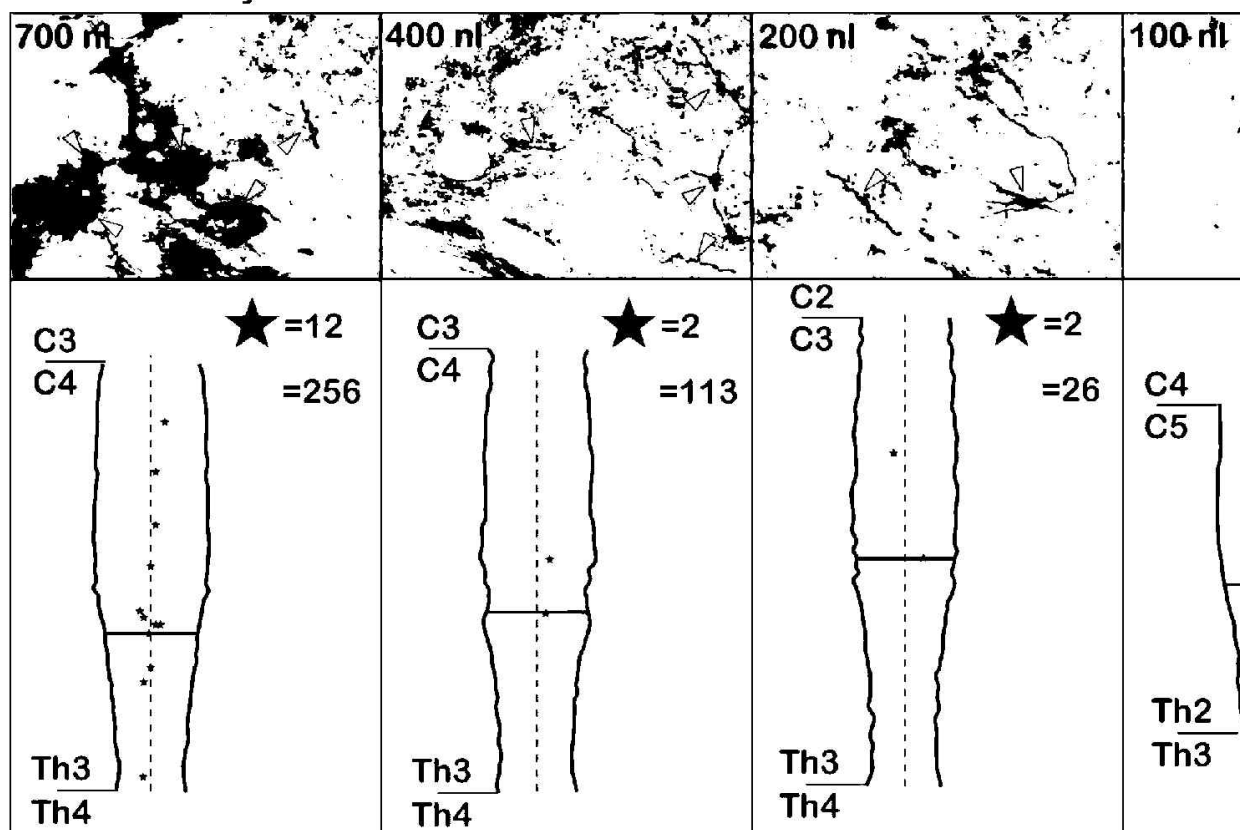


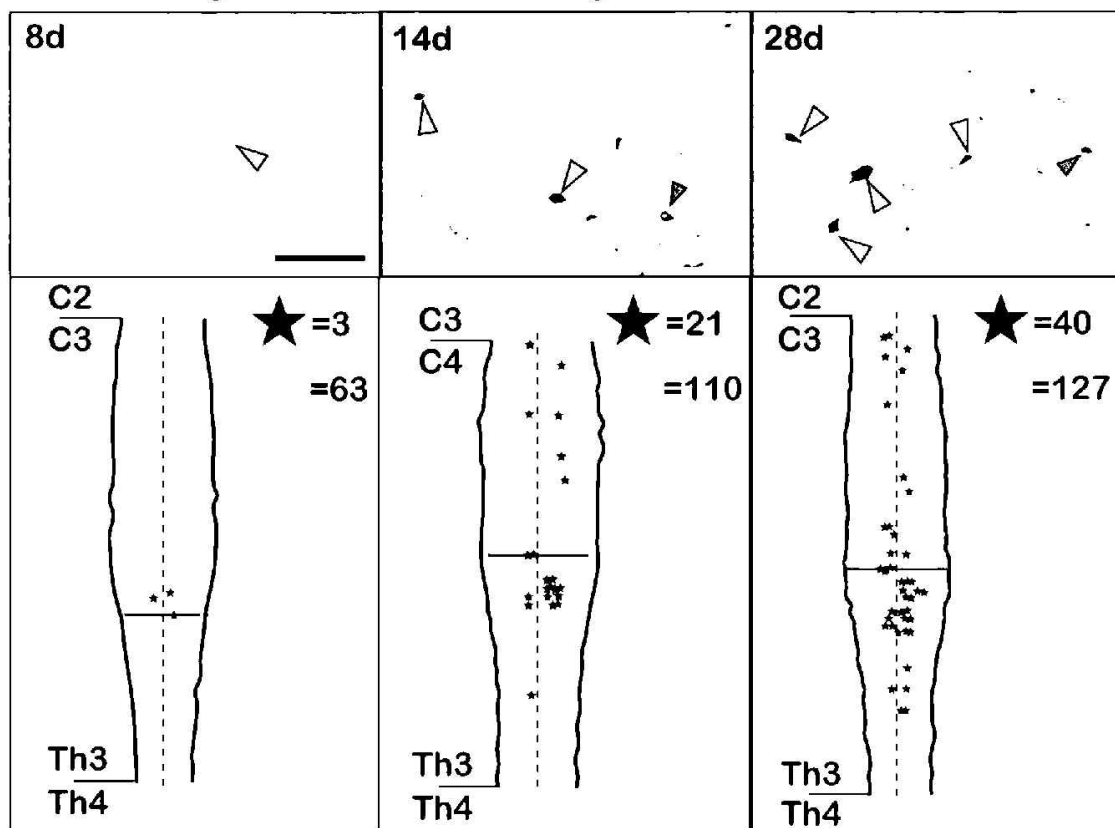
図 3-4.

図 3-4. Ad-nDsRed/myrGFP の注入量の検討.

術後 8 日の条件で，ウイルスベクターの注入量を検討した．注入量を減らすに
したがって，解析対象であるコリン作動性介在ニューロン（黄色の三角）以外
の過剰なシグナル（白の三角）を減らすことが出来た．100 nl 注入で，ほぼ単
一ニューロンレベルでコリン作動性介在ニューロンの形を捉える事が可能とな
った．

Scale bar= 100 μ m.

Ad-STOP/myrGFP-WPRE : 700 nl injection



☒ 3-5.

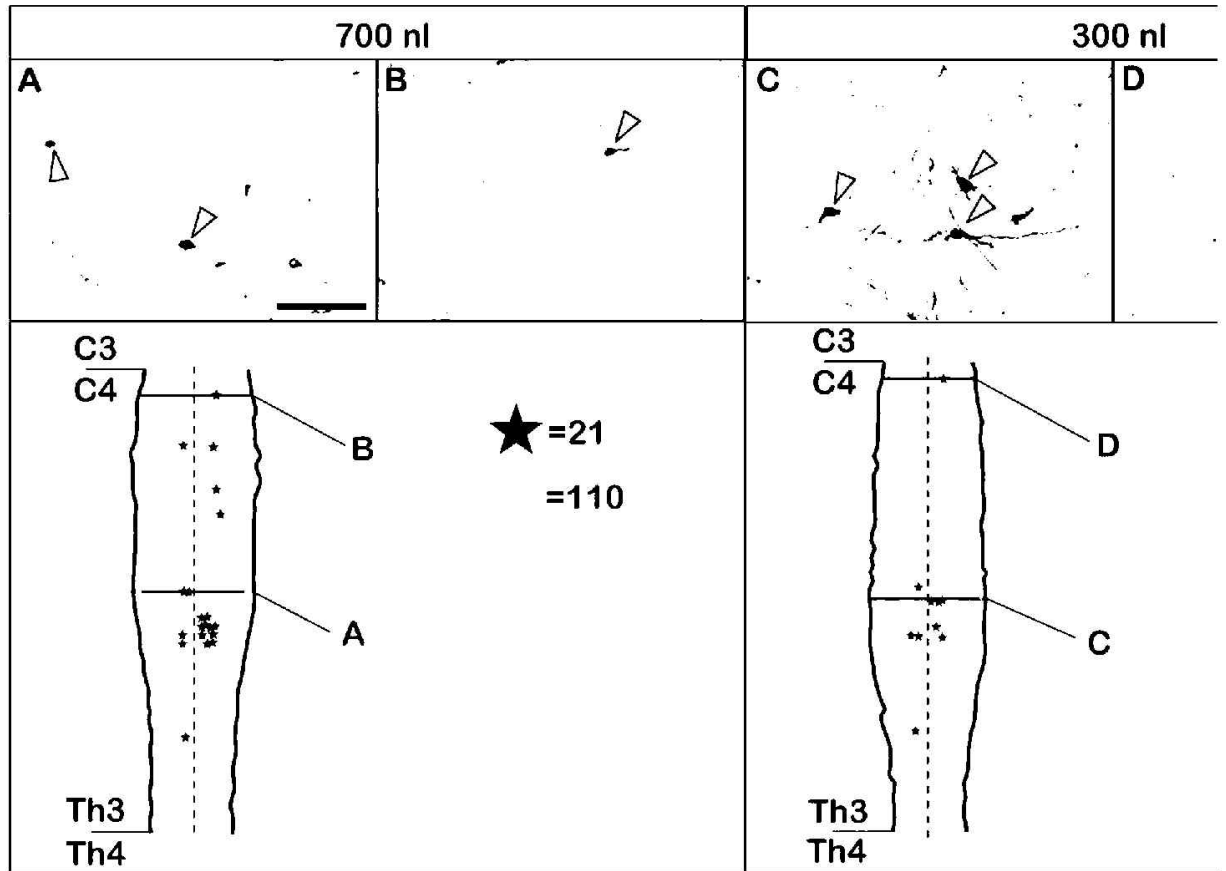
図 3-5. Ad-STOP/myrGFP-WPRE の術後生存期間の検討.

700 nl 注入で最適な術後生存期間を検討した. 術後 8 日ではシグナルが弱く, 細胞形態の把握が困難だった. 14 日, 28 日と生存期間が延長するにつれて, 標識される細胞の数 (黄色の三角) が注入中心近傍で増加し, さらに注入中心から吻尾に離れた部位でも標識細胞を認めるようになった.

※赤の三角は, 細胞の形が不明瞭であるなどの理由で, 解析の対象とはしなかったシグナルを示している.

Scale bar: =100 μ m

Ad-WPRE-myrGFP : 14d survival



☒ 3-6.

図 3-6. Ad-STOP/myrGFP-WPRE の注入量の検討.

術後 14 日の条件で，ウイルスベクターの注入量を検討した．注入量を減らし
ても，注入中心近傍で標識細胞が多数見られる傾向は変わらなかった (A,C)．
注入中心から離れた部位では，ニューロン一つ一つの形が把握できる程度にま
ばらな標識が得られた (B,D)．

Scale bar= 100 μ m.

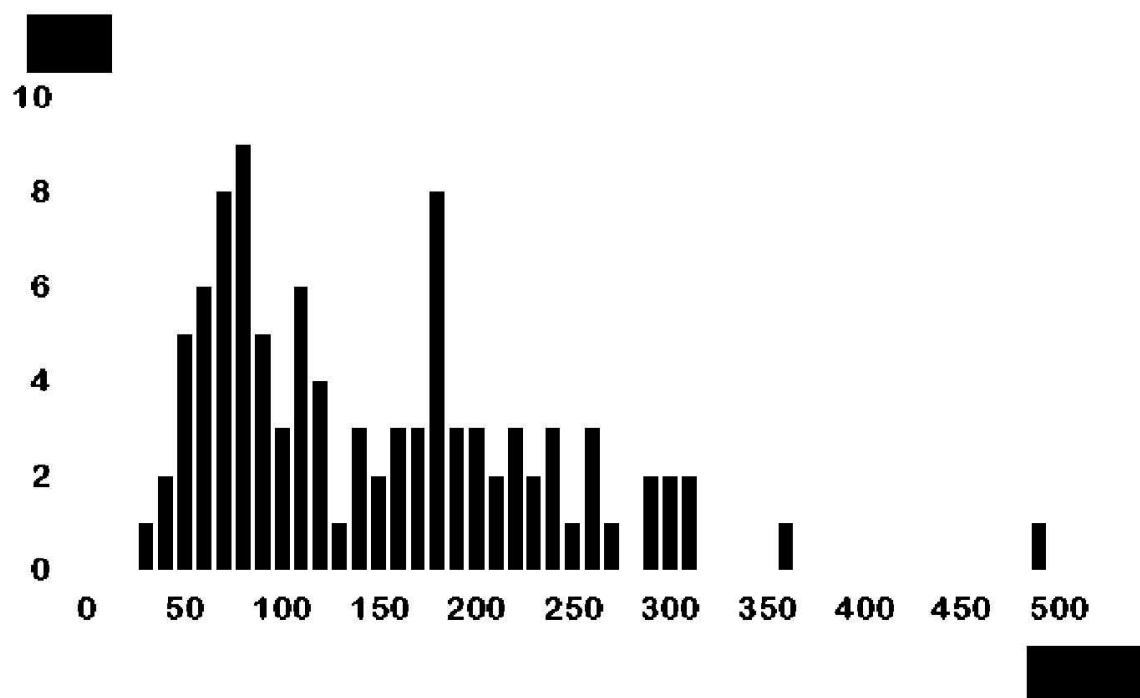


図 4-1. ウイルスベクターで可視化された Partition cell の細胞面積の度数分布.

縦軸は細胞数, 横軸は細胞面積を表す.

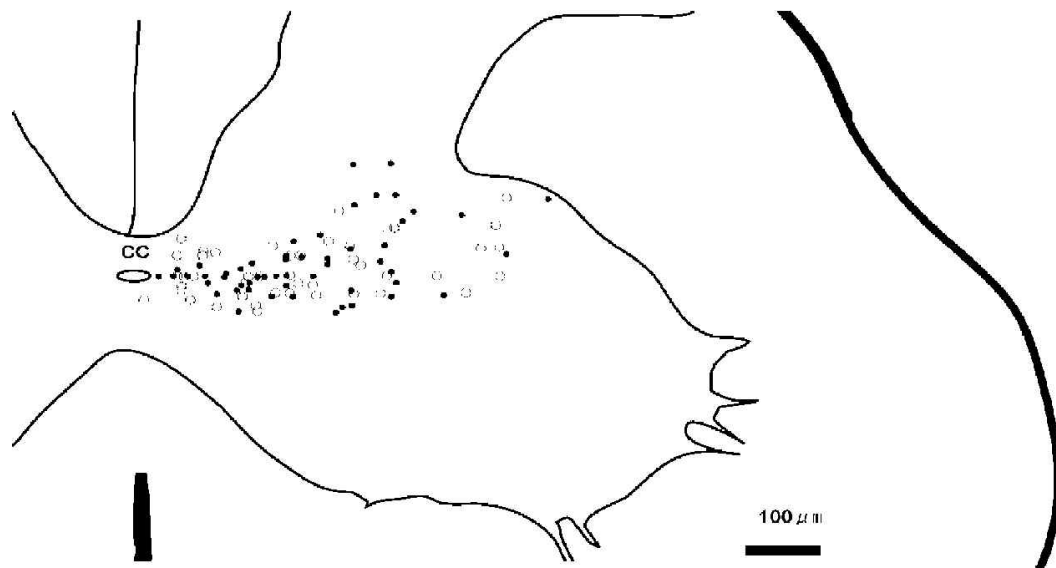


図 4-2. Partition cell の分布図.

可視化された **partition cell** の局在部位を，標準化した脊髓灰白質上にプロットした．黒丸は小型細胞を，白丸は大型細胞を表す．

cc, central canal.

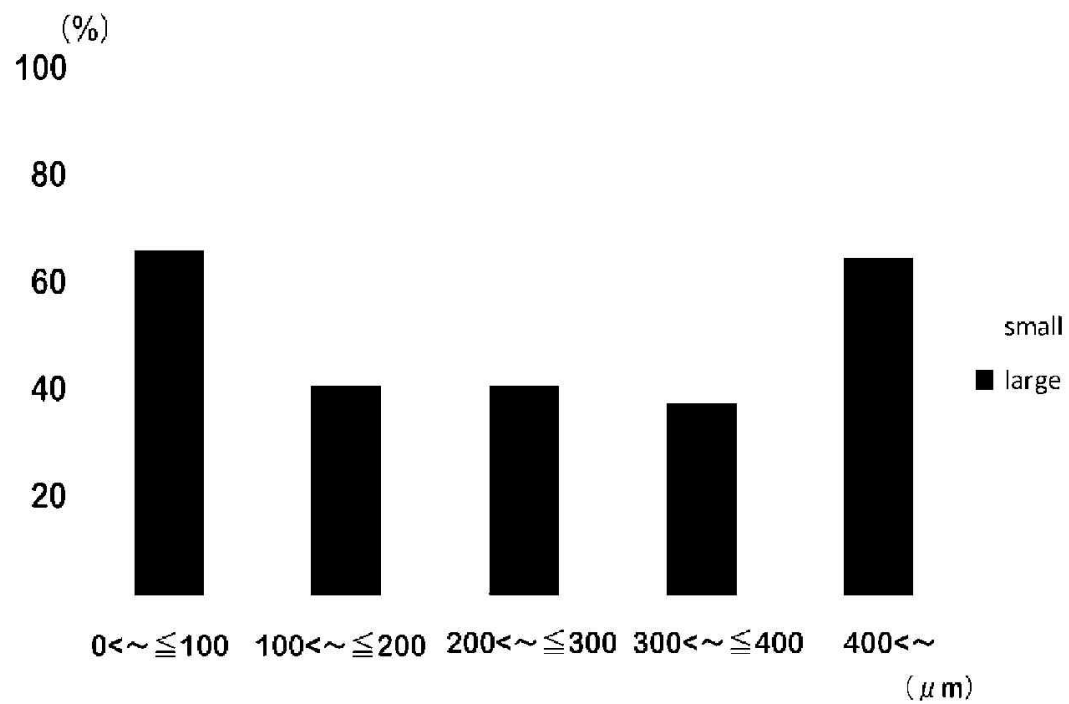


図 4-3. 中心管からの距離に応じた partition cell の分布.

縦軸は小型/大型細胞の占める比率を, 横軸は中心管から細胞までの距離を示す.

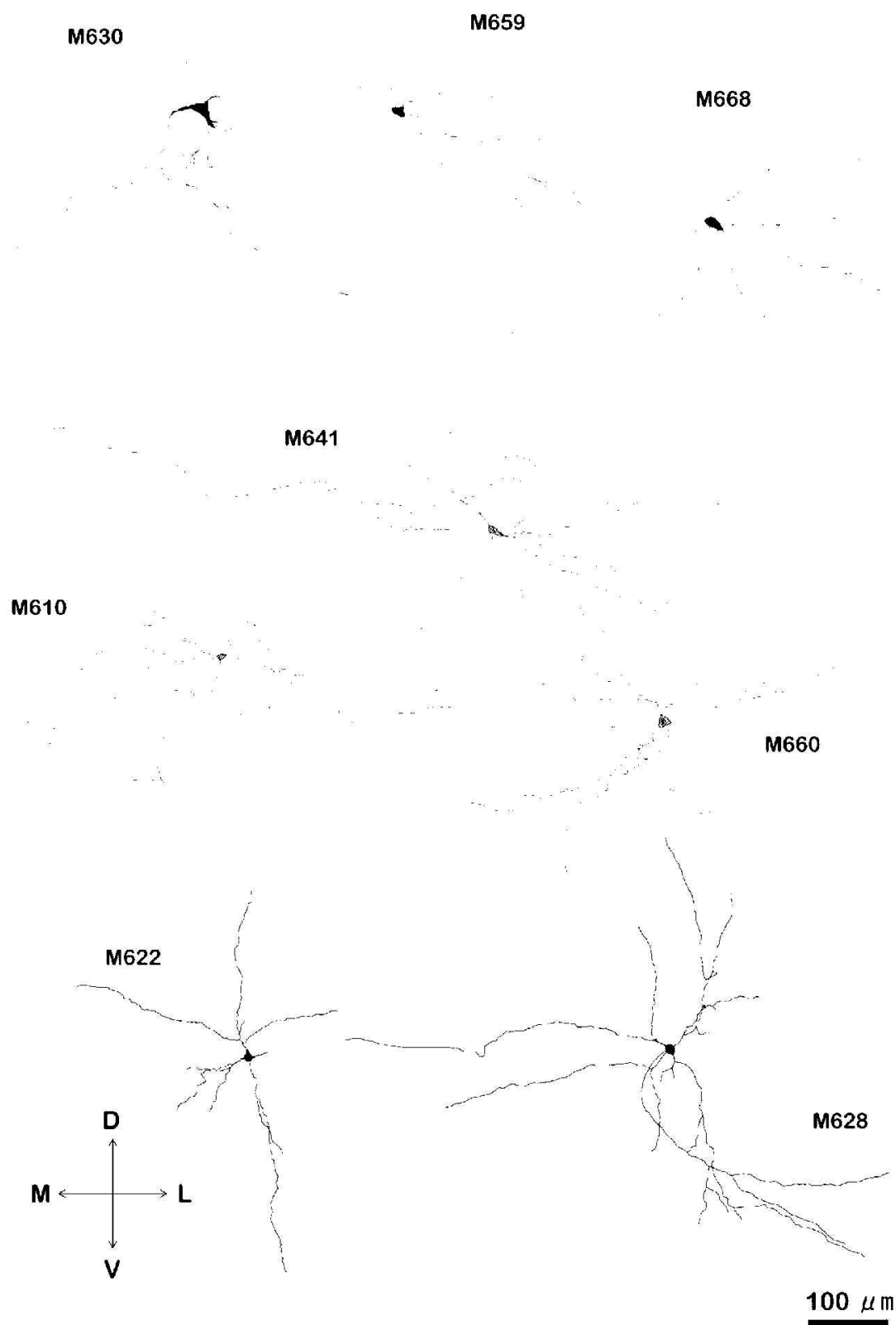


図 4-4.

図 4-4. Medial/intermediate/lateral group それぞれの partiton cell の形態.

細胞の色はそれぞれ, 緑=medial group, 赤=intermediate group, 青=lateral group のニューロンを表している.

ニューロンそれぞれに付記した記号と数字は, ニューロンが可視化された個体の番号を示す(例:M630=個体番号 630 への注入例で可視化されたニューロン).

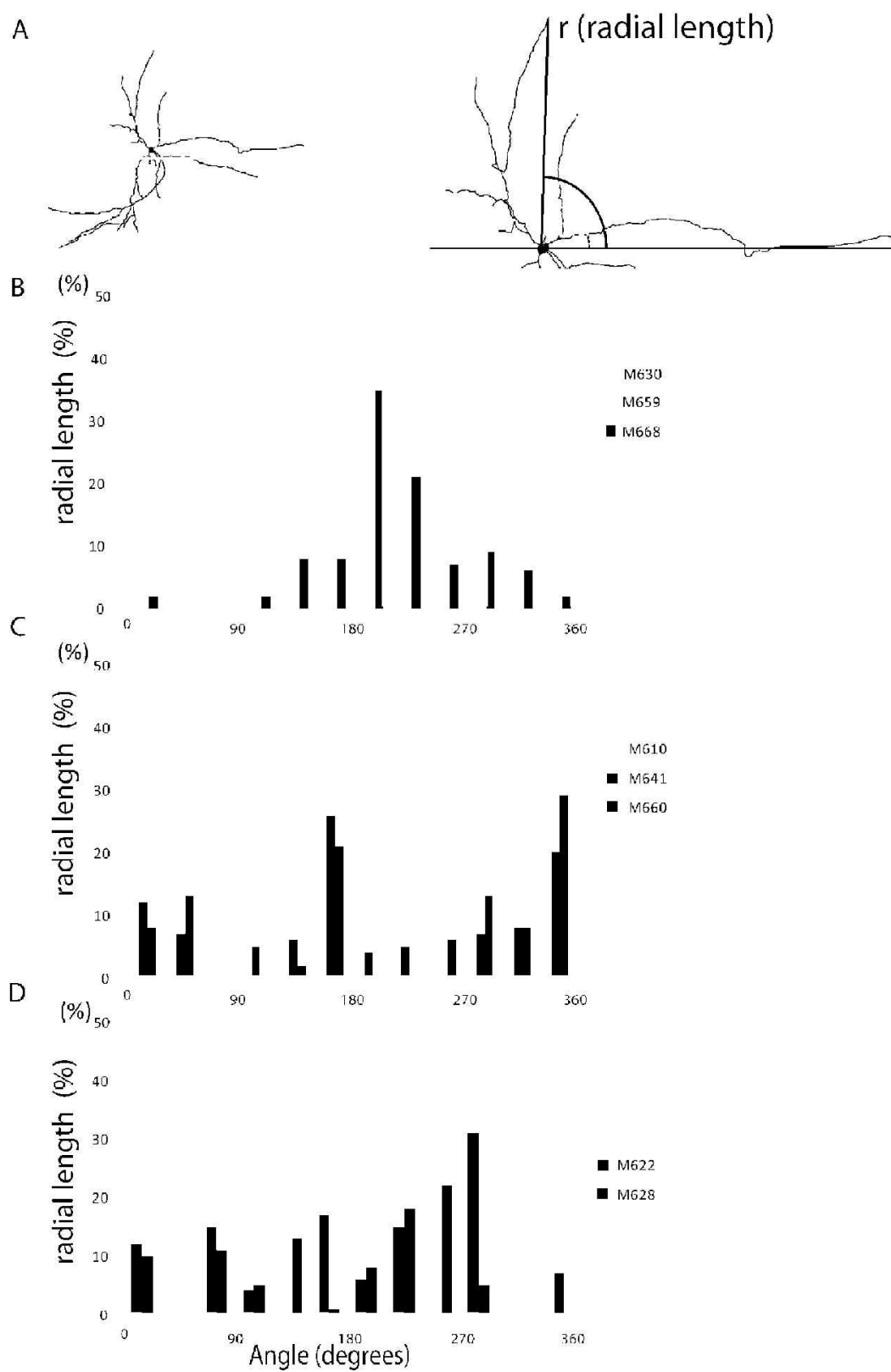


图 4-5.

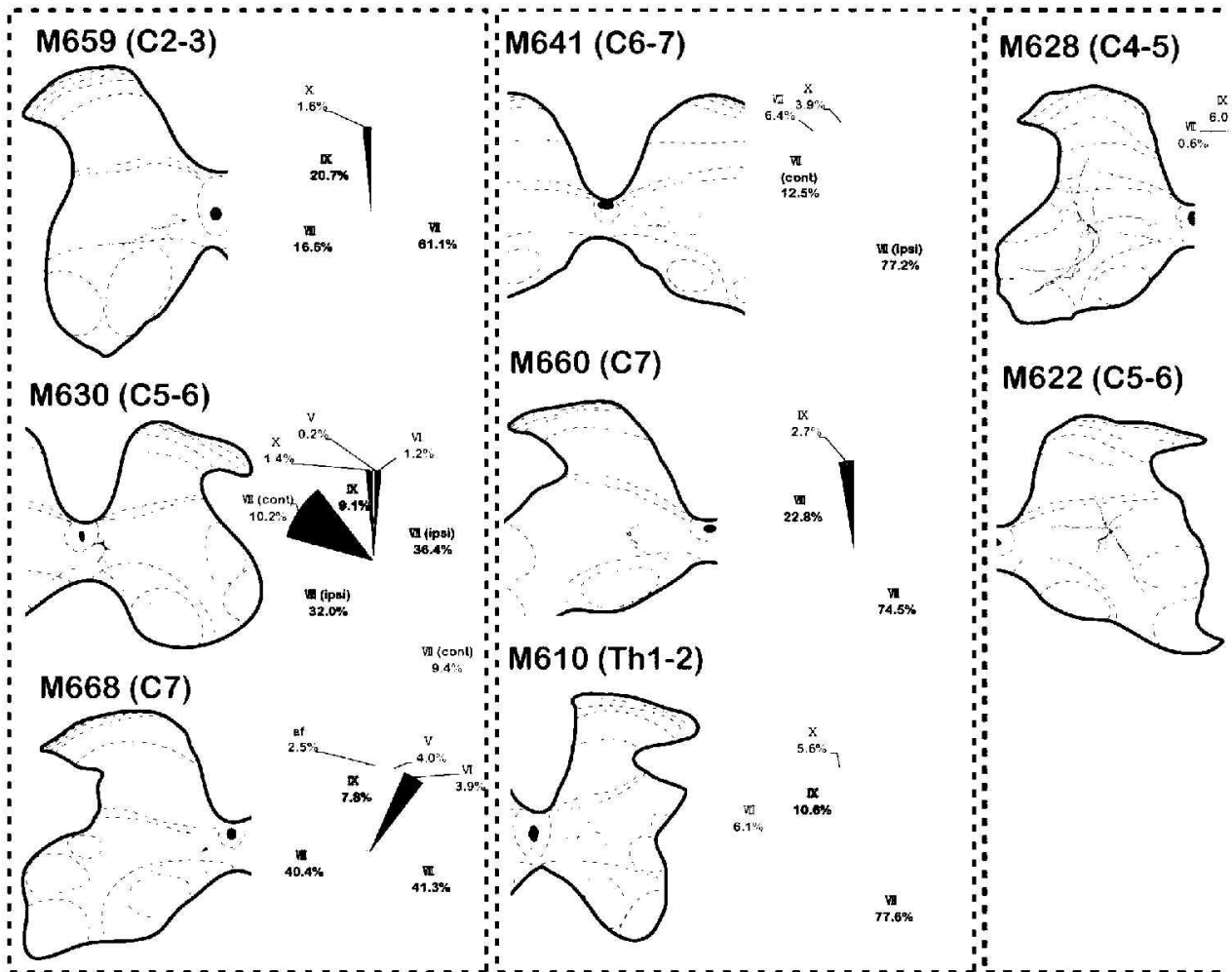
図 4-5. Partition cell 各群の細胞の形態学的特徴.

各群のニューロンが，どのような傾向で樹状突起を伸ばしているかを検討した.

(A) 検討方法の例. ニューロンが見られた切片上で，中心管の中心部と，前正中裂の中央を結ぶ線を垂直の基準とする．これに垂直に交わる線を水平線とする．ここで，可視化されたニューロンの細胞体中心を基準点とし，各樹状突起の先端と基準点とを直線で結ぶ．こうして得られた直線の長さ (r) と，直線が水平線と作る角度 (θ) とを計測し，グラフに反映させる．一つのニューロンにおいて，全ての樹状突起の先端で同様の検討を繰り返し，得られた全直線の長さの合計と，各個別の直線の長さとを百分率で表した．

(B-D) Partition cell の各群での検討結果. (B) medial group, (C) intermediate group, (D) lateral group.

グラフ横に示したのは，解析対象としたニューロンが可視化された個体の番号である(例:M630=個体番号 630 のマウスで可視化されたニューロンのデータ)．



☒ 4-6.

図 4-6. Partition cell の各群の細胞が示す脊髄内での広がり.

Partition cell が可視化された例の組織切片に, 同一週齢のマウス脊髄の, Nissl 染色した切片を重ね合わせ, 樹状突起の広がりを検討した. 黒線で描いたイラストは, Nissl 染色した脊髄切片を元に作図した. 実線は灰白質の境界を, 点線は脊髄の各層の境界を示し, その上に可視化された **partition cell** を重ねている. 個体番号横に括弧書きで示したのは, 切片の脊髄高位である. イラスト横の円グラフは, 各細胞の樹状突起が, 全体の樹状突起長の内どれほどの割合で脊髄各層内を占めているかを検討した結果である.

Scale bar= 100 μ m.

af, anterior funiculus; C, cervical segment; Th, thoracic segment;

cont, contralateral; ipsi, ipsilateral.

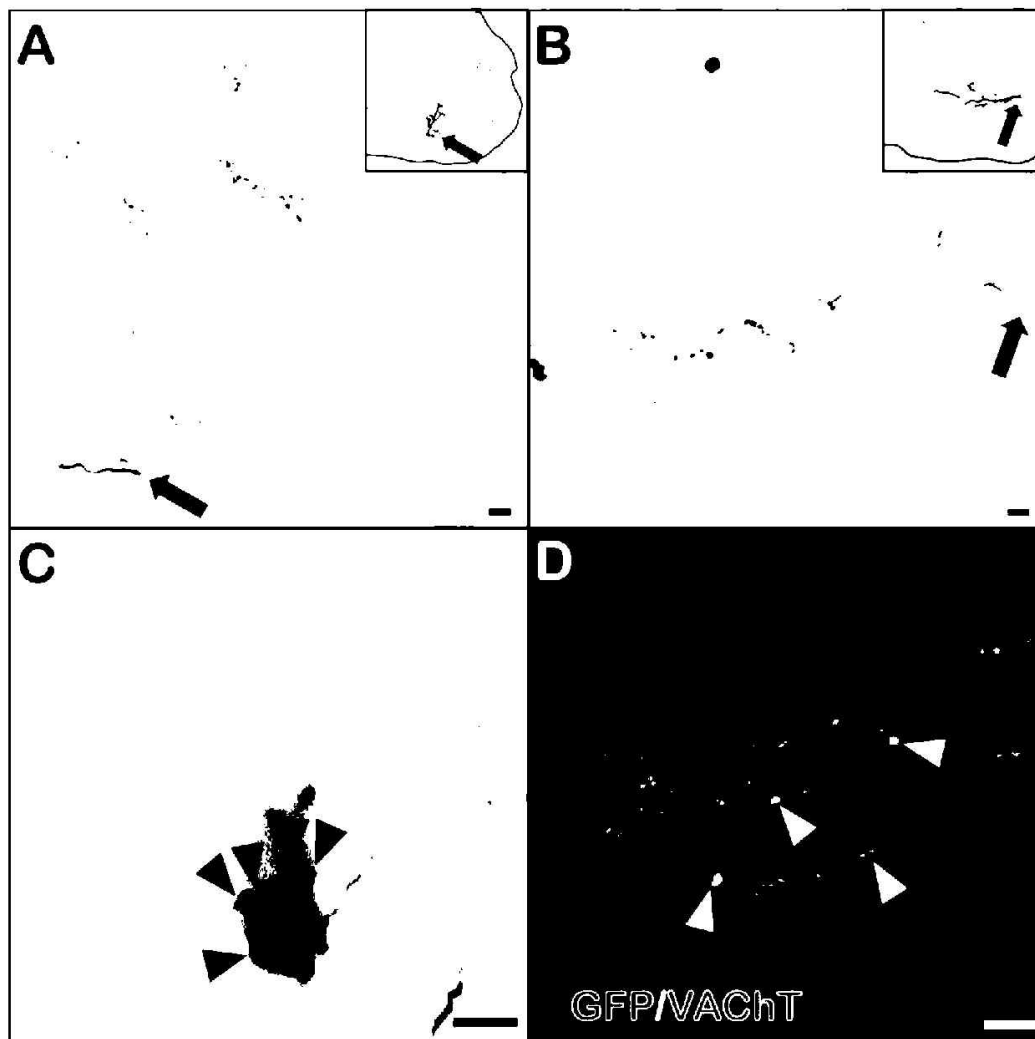


图 4-7.

図 4-7. ウイルスベクターにより可視化された C-terminal.

Partition cell と大型神経終末が同時に可視化される例があり, これらの大型神経終末を伴う軸索は, しばしば白質から灰白質内へと投射していた (図 4-7 A,B). 注入側と同側で, 注入中心から離れた髄節に神経終末を認める例 (図 4-7 A. 差し込み図は, 顕微鏡写真の切片の全景を示す. 赤矢印は, 白質を走行してきた軸索が, 灰白質へ侵入する箇所を示す) や, 注入側と対側で, 注入中心近傍の髄節に神経終末を認める例 (図 4-7 B) を認めた.

また, この神経終末が運動ニューロン上に接する像も見られた (図 4-7 C, 赤矢印は運動ニューロン上の大型神経終末を示す).

Partition cell と大型神経終末を同時に認めた例の一部を用いて, コリン作動性神経終末のマーカーである VACHT と, GFP との二重染色を行った. その結果, GFP と VACHT が二重陽性となる神経終末 (図 4-7 D, 白三角) が確認された.

Scale bar= 20 μ m.

GFP, green fluorescent protein; VACHT, vesicular acetylcholine transporter.

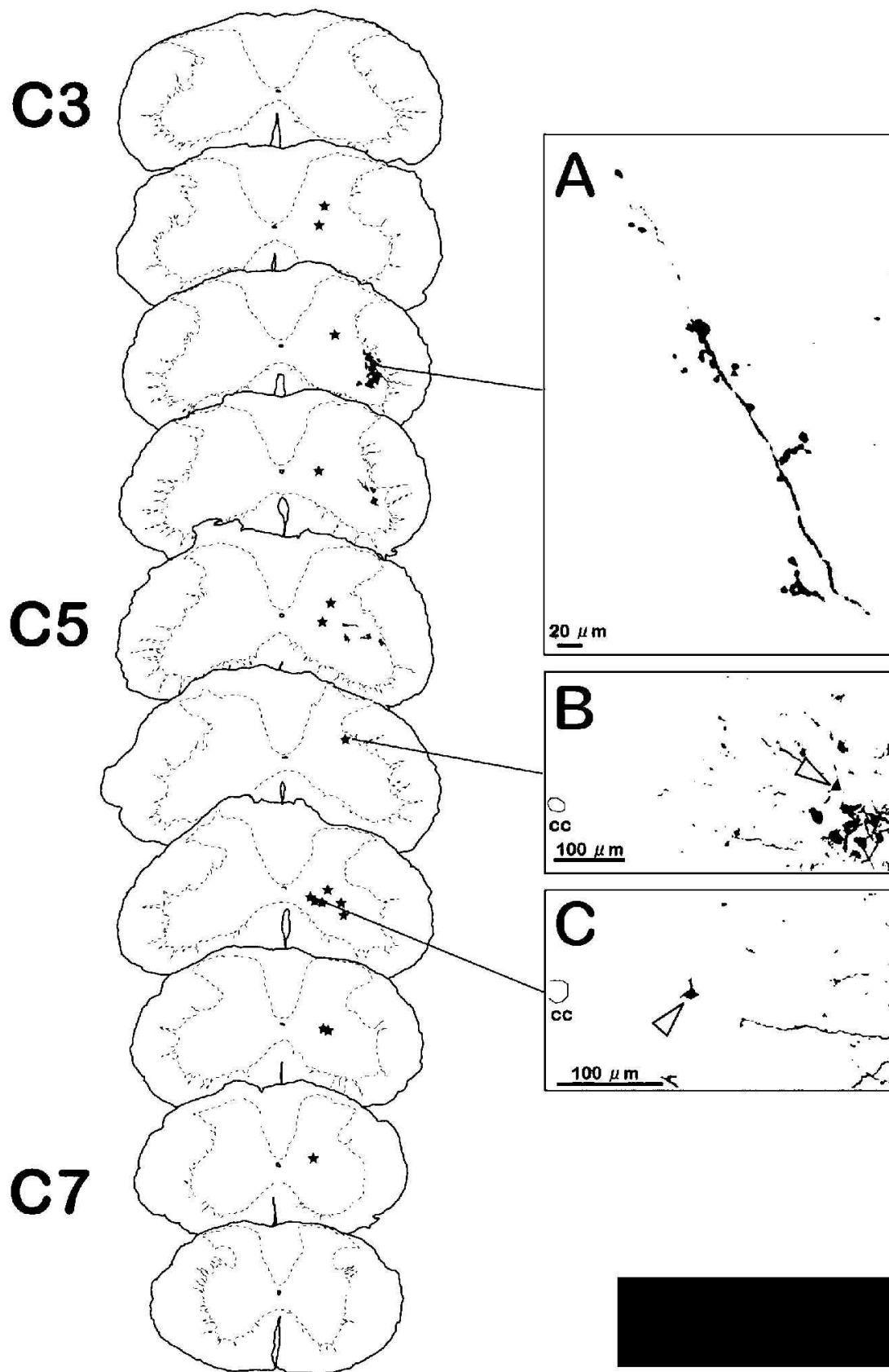


図 4-8. M622 の全切片染色結果.

Partition cell と, C-terminal を同時に認める M619 において, シグナルが確認できる範囲の全シリーズの切片を, 抗 GFP 抗体を用いて染色した. 図の左側のイラストは, 染色の結果標識された, partition cell (青い星型で示す), C-terminal およびそれを送る軸索 (赤色で示す), 運動ニューロン (黄色で示す) の位置をプロットしたものである. Partition cell が確認できる切片の近傍で, 軸索に連なるコリン作動性の大型終末, 即ち C-terminal を認めた (図の右, A). この個体において確認できた partition cell は, lateral group (図の右, B の黄色三角で示す) および intermediate group (図の右, C の黄色三角で示す) のみであった. なお, 図 C の白矢印は, intermediate group の partition cell の特徴である, 水平方向に伸びる樹状突起を示している.

C, cervical segment; cc, central canal.

標識された partition cell の分類								
	M	IM	L	M+IM	M+L	IM+L	All	合計
Partition cell と C-terminal が標識された例数	1	6	0	1	0	3	3	14
Partition cell のみ 標識された例数	0	3	0	0	0	0	1	4
C-terminal のみ標識 された例数	—	—	—	—	—	—	—	8
								26

表 4-1. Partition cell もしくは C-terminal が可視化された例の検討.

Partition cell もしくは C-terminal が可視化された例は、合計して 26 例あった. Partition cell と C-terminal との可視化の確認には、1 個体につき 4 シリーズ作成した連続切片のうち、1 シリーズのみを用いた. Partition cell と C-terminal が同時に可視化された例は 14 例あり、そのうちの 9 例では medial group 以外の partition cell と C-terminal が可視化されていた (intermediate group の partition cell と C-terminal=6 例, intermediate + lateral group の partition cell と C-terminal=3 例). Partition cell のみ可視化されたのは 4 例, C-terminal のみ可視化されたのは 8 例であった.

M= medial group of partition cell, IM= intermediate group of partition cell, L= lateral group of partition cell, All= all three groups of partition cells.

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご助力、ご鞭撻をいただいた皆様に感謝を申し上げます。

防衛医科大学校解剖学講座の教授 小林靖先生には、私を解剖学教室に温かく受け入れていただき以来、終始、親身なご指導およびご鞭撻を賜りました。助教 松井利康先生には、基礎から研究手技の手ほどきをしていただき、研究生生活を通じて熱心にご指導を賜り、公私にわたる相談に乗っていただきました。小林先生と、松井先生のご鞭撻なしには、本研究の成立は考えられません。准教授 濱田剛先生、講師 西井清雅先生からは折に触れ、研究に関する的確なアドバイスをいただきました。技術員の渡辺まゆみさんからは、多大な技術的補佐をいただきました。また、同時期に大学院生として在籍されていた灰塚嘉典先生（現杏林大学解剖学教室）には、後輩として大きな刺激を受けました。防衛医科大学校解剖学講座の皆様に、深甚な謝意を捧げます。

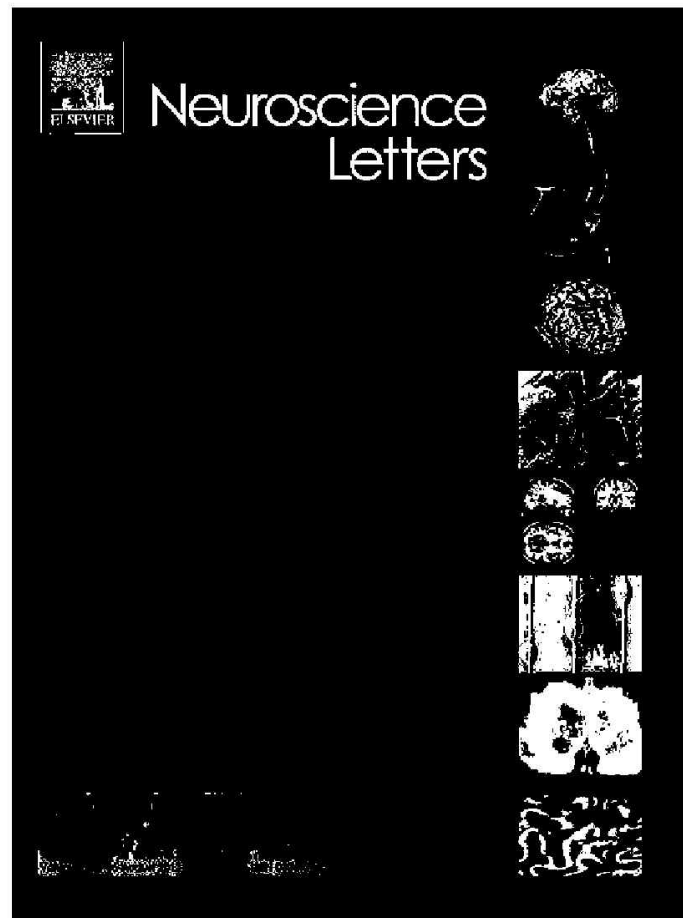
基礎講座での研究に従事することを認めて下さった、防衛医科大学校内科学 3 講座の諸先生方には、心より感謝申し上げます。元准教授 鎌倉恵子先生（現東京工科大学）をはじめ、現准教授の海田賢一先生、教授 木村文彦先生ならびに池脇克則先生、そして内科学 3 講座神経部門の先生方には、なかなかほかどらない研究を温かく見守っていただきました。

ウイルスの取り扱いあたって、P2 施設の使用を快諾いただいた防衛医科大学校国際感染症学講座の教授 宮平靖先生ならびに助教 小野岳史先生には心より御礼を申し上げます。

共同研究者である石川県立看護大学健康科学講座 准教授 中田隆博先生には、ウイルスペクターや抗体を供与いただき、また、学会発表時には熱心にご指導を賜りました。ウイルスペクターを作成いただいた古川敬世さんにも、深く感謝申し上げます。

最後に、いつも近くで私を励ましてくれた妻と、息子に感謝します。ありがとう。

本研究に命を捧げてくれた、多くの動物たちの御霊のご冥福をお祈りいたします。

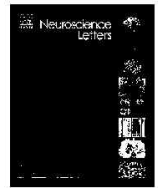


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



C-terminals in the mouse branchiomotor nuclei originate from the magnocellular reticular formation



Toshiyasu Matsui^{a,1}, Yu Hongo^{a,b,1}, Yoshinori Haizuka^c, Kenichi Kaida^b, George Matsumura^c, Donna M. Martin^d, Yasushi Kobayashi^{a,*}

^a Department of Anatomy and Neurobiology, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

^b Third Department of Internal Medicine, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

^c Department of Anatomy, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan

^d Department of Pediatrics, Human Genetics, and the Cellular and Molecular Biology Program, The University of Michigan, Ann Arbor, MI 48019-5652, USA

h i g h l i g h t s

- C-terminals in branchiomotor nuclei originate from brainstem cholinergic neurons.
- These C-terminal origins include both *Pitx2*-positive and *Pitx2*-negative populations.
- C-terminals show simultaneous bilateral projections to branchiomotor nuclei.
- C-terminals may function in the modulation of synchronized orofacial behaviors.

a r t i c l e i n f o

Article history:

Received 2 February 2013

Received in revised form 13 May 2013

Accepted 31 May 2013

Keywords:

C-terminals

Branchiomotor neurons

Cholinergic neurons

Reticular formation

Brainstem

a b s t r a c t

Large cholinergic synaptic boutons called “C-terminals” contact motoneurons and regulate their excitability. C-terminals in the spinal somatic motor nuclei originate from cholinergic interneurons in laminae VII and X that express a transcription factor *Pitx2*. Cranial motor nuclei contain another type of motoneuron: branchiomotor neurons. Although branchiomotor neurons receive abundant C-terminal projections, the neural source of these C-terminals remains unknown. In the present study, we first examined whether cholinergic neurons express *Pitx2* in the reticular formation of the adult mouse brainstem, as in the spinal cord. Although *Pitx2*-positive cholinergic neurons were observed in the magnocellular reticular formation and region around the central canal in the caudal medulla, none was present more rostrally in the brainstem tegmentum. We next explored the origin of C-terminals in the branchiomotor nuclei by using biotinylated dextran amine (BDA). BDA injections into the magnocellular reticular formation of the medulla and pons resulted in the labeling of numerous C-terminals in the branchiomotor nuclei: the ambiguous, facial, and trigeminal motor nuclei. Our results revealed that the origins of C-terminals in the branchiomotor nuclei are cholinergic neurons in the magnocellular reticular formation not only in the caudal medulla, but also at more rostral levels of the brainstem, which lacks *Pitx2*-positive neurons.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: Vm, trigeminal motor nucleus; VSpC, caudal part of spinal trigeminal nucleus; VSpI, interpolar part of spinal trigeminal nucleus; VSpO, oral part of spinal trigeminal nucleus; VII, facial nucleus; VII, facial nerve; Xd, dorsal motor nucleus of vagus nerve; XII, nucleus of the accessory nerve; XII, hypoglossal nucleus; Amb, ambiguous nucleus; AP, area postrema; cc, central canal; Cu, cuneate nucleus; Gi, gigantocellular reticular nucleus; Gr, gracile nucleus; IO, inferior olive; IRt, intermediate reticular nucleus; LPT, lateral paraventricular nucleus; LRt, lateral reticular nucleus; MdD, dorsal part of the medullary reticular nucleus; MdV, ventral part of the medullary reticular nucleus; PCrT, parvocellular reticular nucleus; PnC, caudal part of pontine reticular nucleus; Pr, prepositus nucleus; py, pyramidal tract; pyx, pyramidal decussation; RF, reticular formation; SO, superior olive; Sol, nucleus of the solitary tract; VeM, medial vestibular nucleus; VeSp, spinal vestibular nucleus.

* Corresponding author at: Department of Anatomy and Neurobiology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan.

Tel.: +81 4 2995 1478; fax: +81 4 2995 5183.

E-mail address: yasushi@ndmc.ac.jp (Y. Kobayashi).

¹ These authors contributed equally to this study.

1. Introduction

The somata and proximal dendrites of motoneurons are contacted by large cholinergic synaptic terminals [1–4,12,17]. Those terminals have very thin membrane-bound structures—termed subsurface cistern—in the postsynaptic structure, and were hence named “C-terminals (or C-boutons)” after the cisterns. The muscarinic m2 receptors are closely aligned with C-terminals on the postsynaptic motoneurons [9], and activation of the m2 receptors increases motoneuron excitability [16]. The genetic deletion of functional C-terminals causes impairment of the gastrocnemius muscle activation in a swimming task [26]. These physiological and behavioral studies indicate that C-terminal inputs into spinal motoneurons play a key role in the modulation of locomotor behavior. Spinal C-terminals originate from cholinergic interneurons located in Rexed laminae VII and X [16,21,26]. Pitx2, a homeodomain transcription factor, is essential for left-right asymmetry and normal development of eye, tooth, pituitary, heart and muscle, and required for neuronal migration and differentiation in the hypothalamus and midbrain [10,15,24]. In the spinal cord, Pitx2 also labels the subtype of cholinergic interneuron called partition cells, which give rise to C-terminals [5,26].

In the brain, C-terminals are present in some cranial motor nuclei [9,17,25]. The cranial motor nuclei that innervate skeletal muscles are categorized into 2 groups based on their differentiation: branchiomotor (trigeminal motor (Vm), facial (VII_m), and ambiguous (Amb) nuclei) and somatic motor (oculomotor, trochlear, abducens, and hypoglossal (XII_m) nuclei) nuclei [20]. We have previously identified the origin of C-terminals in the rat XII_m, which is the rostral extension of spinal motor columns [8]—the motoneurons in the XII_m receive C-terminal projections from neurons in the reticular formation (RF) near the target. Although the origin, and some functions, of C-terminals in the somatic motor nuclei have emerged, those in the branchiomotor nuclei have not yet been determined. Some studies using retrograde tracing have revealed that the brainstem RF contains cholinergic interneurons with direct projections to the branchiomotor nuclei [6,7,22]. These findings suggest that C-terminals in the branchiomotor nuclei may originate from a population of cholinergic premotor neurons in the RF.

In this study, our aim was to identify C-terminal origins in the mouse branchiomotor nuclei. We first investigated Pitx2 expression in cholinergic neurons in the brainstem RF to determine C-terminal projection candidates. Whereas cholinergic neurons in the RF of the caudal medulla were positive for Pitx2, no Pitx2 expression was detected in the rostral portion of the RF, which has been shown previously to contain premotor neurons [6,7,22]. We next performed anterograde tracing experiments to confirm whether these cholinergic neurons gave rise to C-terminals. Our results show that C-terminals on branchiomotor neurons originate from the magnocellular reticular formation not only in the caudal medulla, but also at more rostral levels of the brainstem, which lacks Pitx2-positive neurons.

2. Materials and methods

Adult male and female ICR (SLC, Shizuoka, Japan) and ICR-C57BL/6J mixed-background mice weighing 25–40 g were used for in situ hybridization (n=3) and anterograde tract-tracing study (n=21). All procedures performed on animals were approved by the Animal Care and Use Committee of the National Defense Medical College.

2.1. In situ hybridization

An RNA probe corresponding to the 3' UTR of Pitx2 was used for in situ hybridization [14]. Mice were deeply anesthetized using chloral hydrate (600 mg/kg) and perfused transcardially by using Bouin's solution. The brains were removed and embedded in paraffin.

Tissue sections (8 μ m thickness) were deparaffinized, and pre-treated with 0.2 M HCl. After washes, the sections were digested with 20 μ g/ml proteinase K and post-fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) before treatment with 0.2% glycine. The sections were pre-hybridized and then hybridized with a Dig-labeled probe for 14 h at 70 °C. Unbound probes were washed with 1 $\times$ and 0.1 $\times$ saline–sodium citrate buffer. The signals were detected using anti-Dig alkaline phosphatase-conjugated antibody (1:500 dilution; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and NBT/BCIP.

To compare the distribution between the Pitx2-positive and cholinergic neurons, the adjacent sections were subjected to immunohistochemical analysis against choline acetyltransferase (ChAT) (1:200; Merck Millipore, Billerica, MA). The distribution of Pitx2- and ChAT-positive cells was plotted using adjacent 3 sections in the same series. Images showing co-distribution of Pitx2 and ChAT in single neurons were produced by overlaying images of the adjacent sections by using Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

2.2. Anterograde tract-tracing combined with immunohistochemical analyses

The animals were anesthetized using chloral hydrate (500 mg/kg) and placed in a stereotaxic apparatus (Narishige, Tokyo, Japan). Biotinylated dextran amine (BDA) (3000 MW; Molecular Probes, Eugene, OR) was used as an anterograde tracer. Unilateral injections of 10% BDA in distilled water were made iontophoretically through a glass micropipette by using a positive current pulse for 20 min (4 μ A, 8 s on/8 s off). The stereotaxic coordinates were determined using a mouse brain atlas by Paxinos and Franklin [18].

After a 7-day survival period, the mice were deeply anesthetized and perfused transcardially with 4% PFA in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). The brains were cryoprotected in 20% glycerin in PB and frozen on dry ice. Serial frozen sections 10 μ m thick were cut coronally using a sliding microtome (HM440E Carl Zeiss, Jena, Germany) and separated into 4 series. For anterograde axonal labeling, free-floating sections of one series were incubated with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) solution (3 drops per 10 ml TBS; Vector, Burlingame, CA) overnight at 4 °C and developed with diaminobenzidine-nickel solution. Sections were mounted on gelatin-coated slides and counterstained with thionin for cytoarchitectonic identification.

To elucidate whether the BDA-labeled terminals in the motor nuclei were cholinergic, one series of sections were processed both for BDA and immunofluorescence staining for vesicular acetylcholine transporter (VACHT). In brief, the sections were blocked with 5% normal donkey serum in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.5) containing 0.5% Triton-X, and incubated in goat anti-VACHT antibody (1:1600; Merck Millipore, Billerica, MA). Then the sections were washed with TBS and incubated in Cy3-conjugated anti-goat IgG (1:400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and Cy2-conjugated streptavidin (1:600; Jackson ImmunoResearch) for BDA detection. After washing, the sections were mounted and cover slipped with DPX. Fluorescence images were acquired with a confocal microscope (LSM 510; Carl Zeiss, Jena, Germany). We identified putative C-terminals based on cholinergic specificity (VACHT immunoreactivity), size (length ranging from 3 to 7 μ m) and proximity to the motoneurons. In a series of double immunolabeled

sections, we typically observed Vm on 5 sections, VIIIm on 6 sections, Amb on 10 sections, and XIIm on 11 sections, respectively. The number of C-terminals was counted on the all sections which include each motor nucleus using the confocal images.

3. Results

3.1. Cholinergic neurons and Pitx2 expression

We first investigated Pitx2 expression to confirm whether presumptive C-terminal origins in the RF have similar genetic characteristics as those in the spinal cord (Fig. 1). At the level of the pyramidal decussation, Pitx2⁺ neurons were present around the central canal and the IRt (Fig. 1A and B – left). At the caudal level of the XIIm, Pitx2⁺ neurons were also located laterally in the IRt and in the MdV, and their number decreased rostrally (Fig. 1C and D – left). In contrast, no Pitx2 expression was found in the RF neurons more rostrally than the middle of the XIIm (bregma – 7.56).

We next determined whether Pitx2⁺ neurons in the caudal medulla were cholinergic by comparing the distribution of Pitx2⁺ and ChAT⁺ positive neurons. Fig. 1A and C shows the locations of Pitx2⁺ (black dots) and ChAT⁺ (green dots) neurons at 2 different

rostro-caudal levels. In the adjacent sections processed for ChAT immunohistochemical analysis (Fig. 1B and D – center), ChAT⁺ neurons were observed, consistent with the results of a previous study [11]. Merging the images showed that ChAT⁺ neurons overlapped the distribution of Pitx2⁺ neurons around the central canal and the IRt in the caudal medulla (Fig. 1B – right). A comparative observation between adjacent sections indicated few Pitx2⁺ neurons clearly labeled with ChAT on the other half of cells (Fig. 1E and F). Colocalization of Pitx2 and ChAT were not found at more rostral levels, although neurons expressing these 2 markers were closely situated (Fig. 1D – right). In contrast with the disappearance of Pitx2⁺ neurons in the RF of the rostral medulla, pons, and midbrain, ChAT⁺ neurons were present in the magnocellular RF of the IRt, Gi, and LPGi (Fig. 1G–J).

3.2. Identification of the C-terminal origins projecting to the branchiomotor nuclei

In order to identify whether cholinergic neurons in the RF were origins of the C-terminals in the branchiomotor nuclei, we used anterograde tracing in combination with immunohistochemical analyses for VAcHt. Cholinergic neurons in the laterodorsal

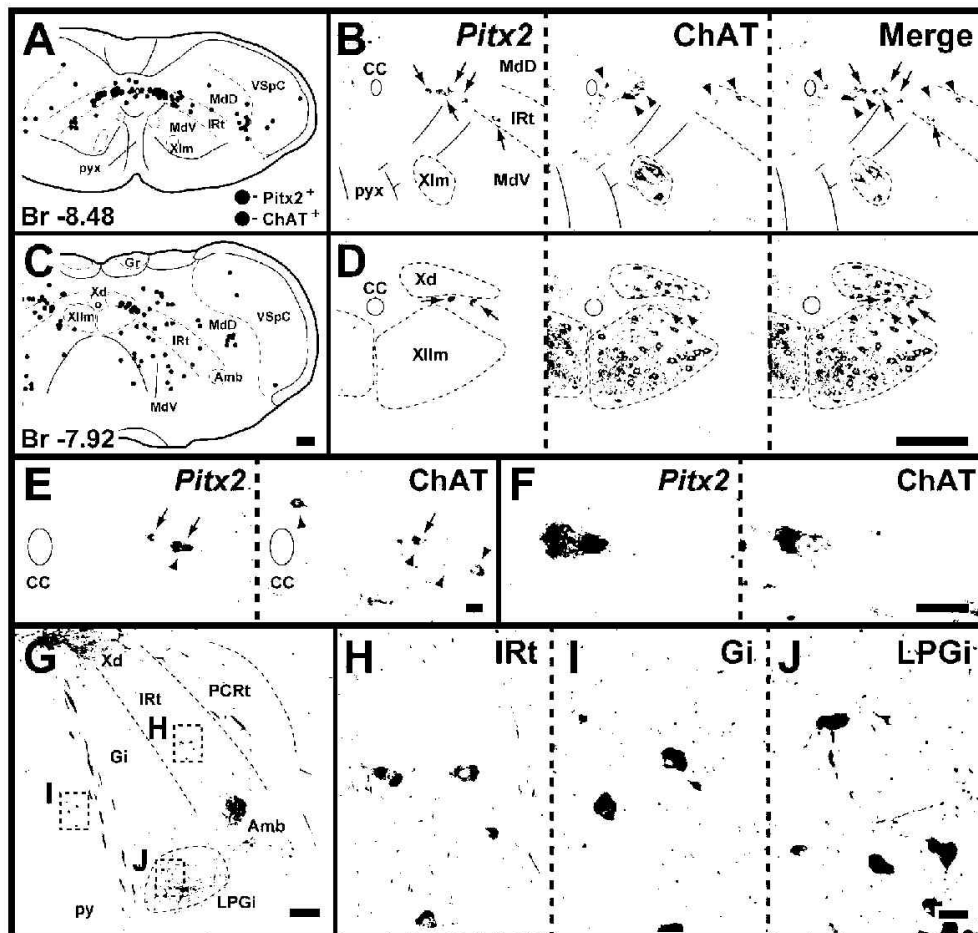


Fig. 1. Distribution of Pitx2⁺ and ChAT⁺ positive neurons in the magnocellular reticular formation. (A and C) Line-drawings show the locations of Pitx2⁺ and ChAT⁺ neurons as black and green dots, respectively. (B and D) Images from adjacent sections following Pitx2 in situ hybridization (left) and choline acetyltransferase (ChAT) immunohistochemistry (center) were merged (right). The positions of Pitx2⁺ neurons (arrows) overlapped with cholinergic neurons (arrowheads) in the intermediate reticular nucleus (IRt) and region around the central canal (cc). (E and F) On a comparison of adjacent sections, a Pitx2⁺ neuron also exhibited ChAT immunoreaction. (G–J) ChAT single-positive neurons were present in the magnocellular reticular formation such as the IRt (H), the gigantocellular reticular nucleus (Gi; I), and the lateral paragigantocellular nucleus (LPGi; J). The Pitx2⁺ neuron disappeared in regions more rostral than the middle level of the hypoglossal nucleus (C and D). Scale bar: (A–D and G) 200 μ m, (E, F, and H–J) 20 μ m.

Table 1
Injection sites and number of double-labeled terminals, putative C-terminals, in each motor nucleus.

Mouse#	Injection site		Vm		Vllm		Amb		Xllm		Total
	Core	Halo ^a	Ipsi ^b	Cont ^c	Ipsi	Cont	Ipsi	Cont	Ipsi	Cont	
427	SubC, PnC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
426	SubC	PnC	–	–	–	–	–	–	–	–	–
428	PnC	lRt	–	–	–	–	–	–	–	–	–
429	lRt, PnC	–	1	6	–	–	–	–	–	–	7
583	LPGi, Vllm	lRt, Gi	60	18	93	–	18	1	12	1	203
584	LPGi, Vllm	lRt, Gi	5	4	9	1	1	2	9	8	39
416	lRt	Gi, PCrt, Sol, VeM	3	–	4	–	–	–	2	–	9
469	lRt	Gi, PCrt, Sol, VeM	5	1	15	1	–	–	6	–	28
468	Sol	lRt, PCrt, VSpO	–	–	4	–	–	1	–	–	5
418	lRt, VeM	Gi, PCrt, Sol, VeSp	3	1	1	1	–	–	8	1	15
467	lRt, Gi	PCrt	5	1	4	1	–	4	1	3	19
466	lRt	Gi, PCrt, Sol, VeM	–	5	–	–	–	–	4	5	14
495	lRt, Gi	PCrt, VeM	–	2	6	–	–	–	–	–	8
496	lRt	Gi, PCrt, Sol, VSpI	2	2	1	1	–	–	–	1	7
497	lRt, Gi	PCrt, VeM	2	–	–	–	–	–	2	–	4
580	MdV	lRt	–	22	–	–	2	3	15	18	60
581	MdV	lRt	10	–	–	–	–	–	–	–	10
579	MdV, lO	lRt	12	–	–	12	1	–	5	12	42
570	lRt, MdV	MdD, Cu	12	51	192	190	–	–	159	43	647
568	lRt, MdV	MdD, Sol, Cu, Xd, Xllm	227	263	107	212	5	1	165	174	1154
569	lRt, MdV, MdD	Cu	69	24	1	27	1	–	4	7	133

For anterograde tracing, we injected BDA into the brainstem reticular formation. Eighteen injections resulted in BDA-labeled C-terminals in the trigeminal motor (Vm), facial (Vllm), ambiguous (Amb), and hypoglossal (Xllm) nuclei.

^a Halo: adjacent areas where the tracer might be taken up and cause anterograde labeling.

^b Ipsi: ipsilateral side of injection.

^c Cont: contralateral side.

and pedunclopontine tegmental nuclei were excluded from the injections, as the results of our previous study revealed that BDA injections into these nuclei label only small-size terminals in the rat motor nuclei [8].

Table 1 shows the BDA injection sites and the number of double-labeled terminals with BDA and VAcHT in each motor nucleus. Eighteen injections resulted in BDA labeling of large cholinergic terminals, putative C-terminals, in the Vm, Vllm, Amb, and Xllm. Schematic drawings and photomicrographs of the representative injection sites are shown in Fig. 2A–F.

In 3 experimental cases (M568–570), the injections involved the regions containing Ptx2⁺ cholinergic neurons at the level of the pyramidal decussation. In M568, which had an injection centered on the lRt and MdV (Fig. 2F), BDA labeling was detected on both small and large terminals in the Xllm, Amb, Vllm, and Vm (Fig. 2G). To assess whether BDA-labeled large terminals were cholinergic, we performed a double-labeling for BDA and VAcHT (Fig. 2H). BDA-labeled terminals overlapped with VAcHT on the large cholinergic terminals that contacted the somata and proximal dendrites of the motoneurons, indicating anterograde labeling of C-terminals. In the motor nuclei, we identified a total of 1154 double-labeled terminals on both the ipsilateral (43.7% of the total labeled terminals) and contralateral (56.3%) sides. In the Vllm, labeled C-terminals were distributed predominantly in the intermediate subnucleus. In the remaining 2 mice (M569 and M570), we also found anterogradely labeled C-terminal nuclei among the Xllm, Amb, Vllm, and Vm.

In 13 experimental cases, the injections involved the lRt, MdV and Gi between –7.8 and –5.4 mm rostrocaudally. In these cases, double-labeling was detected on 4–60 terminals per case in 1 to 4 nuclei of the Xllm, Amb, Vllm, and Vm. In M467, the injection was centered on the lRt and Gi at the level rostral to the Xllm (Fig. 2D) and 19 double-labeled terminals (I: 52.6% C: 47.4%) were identified in the bilateral Xllm, Vllm, and Vm and in the contralateral Amb. Although a small number of labeled C-terminals were revealed in this case, they were all found in the Xllm, Amb, Vllm, and Vm. This result suggests the existence of C-terminal origins that project throughout some of the branchiomotor nuclei and the Xllm. In M580, the injection involved the MdV with some spread into the

lRt at the level of Xllm (Fig. 2E). A total of 60 C-terminals (I: 28.3% C: 71.7%) were labeled with a contralateral predominance in the Xllm, Amb, and Vm. In M429, which had a BDA injection centered on the lRt and PnC in the pons (Fig. 2A), 7 double-labeled terminals were found only in the Vm (I: 14.3% C: 85.7%). M468 also showed double-labeling of terminals, probably due to tracer spread into the lRt.

In 2 experimental cases (M583, 584), the injections involved the LPGi and Vllm. In these cases, the terminals in the ipsilateral medial subnuclei of Vllm were excluded from the counts, because these terminals were located within the injection sites and masked by very dense labeling. In M583 (Fig. 2B), 203 double-labeled terminals (I: 79.6% C: 20.4%) were found in the bilateral Xllm, Amb, and Vm and in the ipsilateral Vllm. In another case (M584), 39 labeled C-terminals were observed in the bilateral Xllm, Amb, Vllm, and Vm.

In 3 cases (M426–428), BDA injections were administered into the suboculomotor nucleus (SubC) and the caudal part of the pontine reticular nucleus (PnC), which are the rostral extensions of the lRt and Gi, respectively. These cases showed no BDA labeling on C-terminals, whereas BDA-labeled axons and small terminals were found in the branchiomotor nuclei.

4. Discussion

Branchiomotor neurons play an important role in intricate orofacial motor behaviors, such as mastication, deglutition, suckling, and phonation. In the present study, we have demonstrated that C-terminals in the branchiomotor nuclei originate from cholinergic interneurons in the magnocellular RF of the medulla and pons in the mouse. Our findings suggest that excitability of neurons that control orofacial behaviors may be modulated by these interneurons that provide excitatory input to motoneurons via C-terminal synapses.

Our data on Ptx2 expression show both similarities and differences between C-terminal origins in the caudal medulla and those in the spinal cord. C-terminals in the spinal cord originate from a cluster of cholinergic interneurons in Rexed laminae VII and X [16,21,26]. These neurons are identified as a small Ptx2-positive

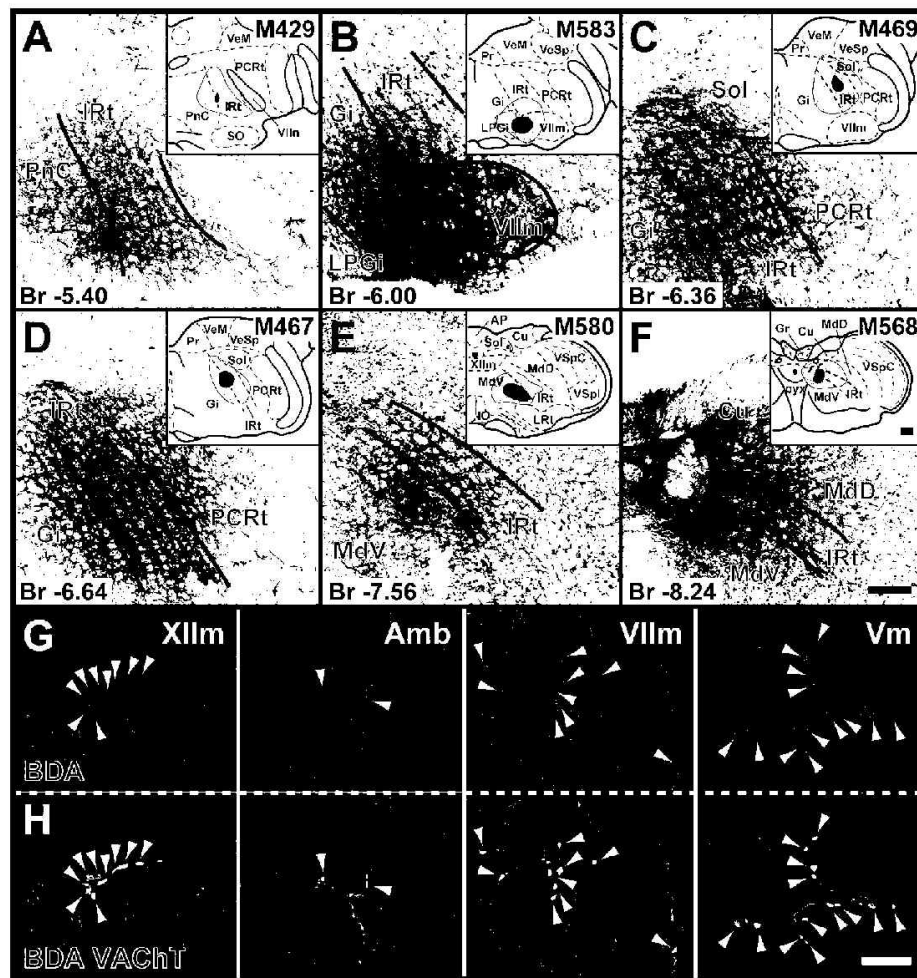


Fig. 2. C-terminals originated from cholinergic neurons located in the magnocellular reticular formation. (A–F) Schematic drawings (insets) and photomicrographs show representative locations of BDA injection sites in the magnocellular reticular formation. Dark green and light green areas indicate the core and halo of injection sites, respectively. (G and H) In M568 (F), BDA-labeled large terminals (arrowheads in C) were detected bilaterally in the hypoglossal (XIIIm), ambiguous (Amb), facial (VIIIm), and trigeminal motor (VIm) nuclei. Immunostaining with BDA (green) and VACHT (red) resulted in double-labeling (yellow; arrowheads in H) of the large cholinergic terminals in the motoneurons putative C-terminals. Scale bar: (A–F) 200 μ m, (G and H) 20 μ m.

neuronal subset of the VO population, and they are distributed close to the central canal and along the rostrocaudal axis of the spinal cord [5,26]. Our present data revealed the presence of a *Pitx2*⁺ population in the magnocellular RF of the caudal medulla, a similar distribution to the spinal population. This result suggests that *Pitx2*⁺ cholinergic neurons in the caudal medulla may belong to the equivalent subset in the spinal cord. Our BDA injections also showed that the magnocellular RF of the caudal medulla, which contained both *Pitx2*⁺ and *Pitx2*[−] cholinergic neurons, was a source of C-terminals in the brainstem motor nuclei. Together, in the caudal medulla, both *Pitx2*⁺ and *Pitx2*[−] cholinergic neurons are likely to be C-terminal origins.

We did not find *Pitx2* expression in C-terminal origins that were located at more rostral levels of the brainstem RF. In the developing hindbrain, *Pitx2*[−] neuronal populations in ventral rhombomere 1 differentiate into GABAergic neurons [23]. At more rostral levels in the midbrain, *Pitx2*⁺ populations contribute to GABAergic neurons in the superior colliculus and glutamatergic neurons in the tegmentum [15,24]. These observations suggest that a transmitter phenotype of *Pitx2*⁺ neurons may depend on the rostrocaudal and dorsoventral axes of the neural tube. Thus, in the brainstem more rostral to the XIIIm, we were not able to subclassify cholinergic interneurons on the basis of *Pitx2* expression.

The results of this anterograde tracing study show that cholinergic neurons in the magnocellular RF are origins of C-terminals in the branchiomotor nuclei and XIIIm. We found that BDA injections centered in the magnocellular RF generally labeled bilateral C-terminals in multiple orofacial motor nuclei. This labeling suggests that C-terminal origins have bilateral and simultaneous connections to motoneurons in multiple orofacial motor nuclei. In fact, case M467 (Fig. 2D), in which the tracer was taken up only by a small number of cholinergic neurons, showed C-terminal labeling in the bilateral XIIIm, VIIIm, and VIm as well as in the contralateral Amb. Our results are in agreement with previous retrograde double-labeling studies showing dual projections to VIm and VIIIm, to VIm and XIIIm, or to VIIIm and XIIIm [13,19,22]. In the spinal cord, cholinergic partition cells that are known as the origin of C-terminals show a strong preference for establishing synaptic connections with functionally equivalent or related motoneuron pools bilaterally [21]. Bilateral and simultaneous projection of C-terminals therefore may be involved in symmetric coactivation of the orofacial muscles. Although our results indicate that C-terminals projecting into the branchiomotor nuclei have to work in a coordinated manner, their precise nature has not been established within each motor nucleus. Further studies are needed to clarify preferential C-terminal connections with functionally segregated motoneurons in a nucleus,

allowing more insight into the C-terminal function in modulating motor neuronal behavior including orofacial actions.

Conflict of interest

None of the authors have any conflicts of interest associated with this study.

Acknowledgements

We wish to thank Ms. Mayumi Watanabe and Mr. Akira Kashima for their excellent assistance in histological processing. This work was supported by the intramural funds from the National Defense Medical College to T.M. and Y.K., and the NIH Grants R01 NS054784 and DC009410 to D.M.M.

References

- [1] D. Bodian, An electron-microscopic study of the monkey spinal cord. I. Fine structure of normal motor column. II. Effects of retrograde chromatolysis. III. Cytologic effects of mild and virulent poliovirus infection, *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 114 (1964) 13–119.
- [2] S. Conradi, Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the adult cat, *Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum* 332 (1969) 5–48.
- [3] S. Conradi, S. Skoglund, Observations on the ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the cat during postnatal development, *Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum* 333 (1969) 5–52.
- [4] M.S. Davidoff, A.P. Irintchev, Acetylcholinesterase activity and type C synapses in the hypoglossal, facial and spinal-cord motor nuclei of rats. An electron-microscope study, *Histochemistry* 84 (1986) 515–524.
- [5] A. Enjin, N. Rabe, S.T. Nakanishi, A. Vallstedt, H. Gezelius, F. Memic, M. Lind, T. Ihalt, W.G. Tourtellotte, C. Bruder, G. Bichele, P.J. Whelan, K. Kullander, Identification of novel spinal cholinergic genetic subtypes disclose Chodl and Ptx2 as markers for fast motor neurons and partition cells, *Journal of Comparative Neurology* 518 (2010) 2284–2304.
- [6] P. Fort, P.H. Luppi, K. Sakai, D. Salvetti, M. Jouvet, Nucleof origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat trigeminal motor nucleus: a double-labeling study with cholera-toxin as a retrograde tracer, *Journal of Comparative Neurology* 301 (1990) 262–275.
- [7] P. Fort, K. Sakai, P.H. Luppi, D. Salvetti, M. Jouvet, Monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat facial nucleus as evidenced by a double immunostaining method with unconjugated cholera toxin as a retrograde tracer, *Journal of Comparative Neurology* 283 (1989) 285–302.
- [8] Y. Haizuka, T. Matsui, G. Matsumura, Y. Kobayashi, Origin of C-terminals in the rat hypoglossal nucleus, *Journal of the Kyorin Medical Society* 40 (2009) 51–65.
- [9] J. Hallström, A.I. Oliveira, B. Maister, S. Gullheim, Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2, *Journal of Comparative Neurology* 460 (2003) 476–486.
- [10] T.A. Ihalt, E.V. Semina, Current molecular understanding of Axenfeld-Rieger syndrome, *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7 (2006) 1–17.
- [11] B.E. Jones, Immunohistochemical study of choline acetyltransferase-immunoreactive processes and cells innervating the pontomedullary reticular formation in the rat, *Journal of Comparative Neurology* 295 (1990) 485–514.
- [12] W. Li, P.A. Ochalski, S. Brimijoin, L.M. Jordan, J.L. Nagy, C-terminals on motoneurons: electron microscope localization of cholinergic markers in adult rats and antibody-induced depletion in neonates, *Neuroscience* 65 (1995) 879–891.
- [13] Y.Q. Li, M. Takada, N. Mizuno, Premotor neurons projecting simultaneously to two orofacial motor nuclei by sending their branched axons. A study with a fluorescent retrograde double-labeling technique in the rat, *Neuroscience Letters* 152 (1993) 29–32.
- [14] D.M. Martin, J.M. Skidmore, S.E. Fox, P.J. Gago, S.A. Camper, Ptx2 distinguishes subtypes of terminally differentiated neurons in the developing mouse neuroepithelium, *Developmental Biology* 252 (2002) 84–99.
- [15] D.M. Martin, J.M. Skidmore, S.T. Philips, C. Vieira, P.J. Gago, B.G. Condie, Y. Raphael, S. Martinez, S.A. Camper, Ptx2 is required for normal development of neurons in the mouse subthalamic nucleus and midbrain, *Developmental Biology* 237 (2001) 93–108.
- [16] C.B. Miles, R. Hartley, A.J. Todd, R.M. Brownstone, Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007) 2448–2453.
- [17] J.L. Nagy, T. Yamamoto, L.M. Jordan, Evidence for the cholinergic nature of C-terminals associated with subsurface cisterns in alpha-motoneurons of rat, *Synapse* 15 (1993) 17–32.
- [18] G. Paxinos, K.B.J. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2001.
- [19] A.S. Popratiloff, M. Streppel, A. Gruart, O. Guntinas-Lichius, D.N. Angelov, E. Stennert, J.M. Delgado-Garcia, W.F. Neiss, Hypoglossal and reticular interneurons involved in oro-facial coordination in the rat, *Journal of Comparative Neurology* 433 (2001) 364–379.
- [20] S.T. Ranson, S.J. Clark, *The Anatomy of the Nervous System: Its Development and Function*, 10th ed., Saunders, Philadelphia, 1959.
- [21] A.E. Stepien, M. Tripodi, S. Arber, Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells, *Neuron* 68 (2010) 456–472.
- [22] J.B. Travers, J.E. Yoo, R. Chandran, K. Herman, S.P. Travers, Neurotransmitter phenotypes of intermediate zone reticular formation projections to the motor trigeminal and hypoglossal nuclei in the rat, *Journal of Comparative Neurology* 488 (2005) 28–47.
- [23] M.R. Waite, K. Skaggs, P. Kaviany, J.M. Skidmore, F. Causeur, J.F. Martin, D.M. Martin, Distinct populations of GABAergic neurons in mouse rhombomere 1 express but do not require the homeodomain transcription factor Ptx2, *Molecular and Cellular Neurosciences* 49 (2012) 32–43.
- [24] M.R. Waite, J.M. Skidmore, A.C. Dilli, J.F. Martin, D.M. Martin, GABAergic and glutamatergic identities of developing midbrain Ptx2 neurons, *Developmental Dynamics* 240 (2011) 333–346.
- [25] T. Yamamoto, E.I. Hertzberg, J.L. Nagy, Subsurface cisterns in alpha-motoneurons of the rat and cat: immunohistochemical detection with antibodies against connexin32, *Synapse* 8 (1991) 119–136.
- [26] L. Zagoraiou, T. Akay, J.F. Martin, R.M. Brownstone, T.M. Jessell, G.B. Miles, A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity, *Neuron* 64 (2009) 645–662.