

## 空間解析による中枢神経系の機能的構造の解明

## Spatial Pattern Analysis of the Functional Organization of the Brain

神野 尚三

Shozo Jinno

<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院基礎医学部門神経形態学分野

**要旨** Ramón y Cajal が、ニューロンの形態と機能に密接な関係があることを示唆して以来、脳の構造についての古典的な解剖学的研究が、現代の神経科学の礎を築いてきたことに異論の余地はないであろう。しかし、従来の解剖学的知見自体からは、脳の機能的構造を規定しているメカニズムについて知ることが困難であったことも事実である。このため我々は、空間解析による新たな解剖学的研究の確立に取り組んできた。空間解析とは、構造の背景にある規則を見いだすための数理的手法のことであり、生態学分野では、樹木などの分布パターンの形成メカニズムを明らかにするために、幅広く用いられている。我々は、海馬のグリアについての空間解析を行い、ミクログリアにドメイン構造が存在することや、アストロサイトとミクログリアの間に誘引作用があることを発見した。本稿では、空間解析がもたらす神経解剖学の新たな可能性について考察する。

キーワード：空間解析, 点過程, 神経解剖学, ミクログリア, アストロサイト

## 1. はじめに

中枢神経系の主たる細胞は、ニューロンとグリアである。それらは基本的な構成要素として、複雑で階層的な脳の構造に関与している。Ramón y Cajal が、ニューロンの形態と機能に密接な関係があることを示唆して以来<sup>1)</sup>、脳の構造はその機能と密接な関連があると考えられ、多くの定性的、定量的な解剖学的研究がなされてきた。このような研究によって得られた脳の機能的構造についての知見は、分子レベルからシステムレベルに至る、あらゆる神経科学研究の基盤となるべきものである。しかし、従来の解剖学的研究自体からは、脳の構造を規定しているメカニズムについて知ることが困難であったこともまた事実であろう。

このため我々は、空間解析の手法を利用する新たな解剖学的研究の確立に取り組んできた。生態学分野では、樹木などの分布パターンを統計学的に定量し、その背景にあるメカニズムを明らかにするために、空間解析の手法が幅広く用いられている。本稿では、空間解析について概説し、我々が行った海馬のグリアの空間解析の例を紹介する。

## 2. 中枢神経系における空間解析

## 2.1 空間解析とは何か？

何かの分布を解析しようとするならば、その最初のステップは、定性的に観察することである。これにより、分布に偏

りがあるように思われたり、規則性が見つかるように思われることがある。しかしながら、このような判断は概して主観的なものであり、思い込みに過ぎない場合も珍しくない。このため、さらなる研究には定量的な検証が必要になる。

空間解析とは、対象の分布や現象の背景にある規則を見いだすための数理的手法のことである<sup>2)</sup>。空間解析で重要なパラメータは、分布密度と分布パターンである。神経解剖学分野では、多くの研究によってニューロンやシナプスなどの分布密度が調べられてきた。我々も、各種の GABA 作動性ニューロンの分布密度について、ステレオロジー定量解析を行ってきた<sup>3)</sup>。分布パターンとは、対象間の相互の距離によって決まる分布の特徴のことであるが、分布密度に比べて研究例が少ない。一般的には次の3つのカテゴリーに分けられている(図 1A-C)。

- (1) 集中分布 (aggregated) : 特定の場所に集中して存在するもの
- (2) 一様分布 (uniform) : 一定の距離をおいて、均一に分布するもの
- (3) ランダム分布 (random) : 分布に規則性がないもの

これらの分布パターンは、以下のようなメカニズムの存在を示唆している:対象間の誘引作用(集中分布),反発作用(一様分布),そのいづれもない(ランダム分布)。また,2種類の対象が同じ領域に存在している場合にも,両者の分布相関によって,分布パターンはやはり3つのカテゴリーに分けられる(図 1D-F)。

- (4) 同所的分布 (sympatric) : 特定の場所に集中して存在するもの
- (5) 独立分布 (independent) : 相互の関係が認められないもの

<sup>1</sup> 〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1  
TEL: 092-642-6053; FAX: 092-642-6059  
E-mail: sjnno@med.kyushu-u.ac.jp  
2008年7月29日受付

(6) 排他的分布 (exclusive) : 異種の対象に対して排除しあうもの

このような分布パターンを統計学的に解析する手法に点過程解析がある。点過程とは、確率的な不確かさに基づいて点が分布している場合の分布規則のことである<sup>4)</sup>。点過程解析では、領域内に分布する点の位置情報から空間統計量を計算し、完全ランダム分布 complete spatial randomness (CSR) 仮説によって計算される期待値との比較を行う。これにより、点の分布がランダムな場合と比べて集中しているか、一様であるかなどについての統計学的な検定が可能になる。点過程解析で使用される統計関数の詳細については多くの専門書があるので<sup>2,5)</sup>、本稿では割愛し、概略を述べるにとどめる。

最も古典的な点過程解析は最近隣距離 nearest neighbor distance を調べるものであろう (図 2A)。これは、各点について最も近い他点までの平均距離を計算し、ランダムなパターン (CSR) による期待値と比較し、有意な差があるかどうかを検討するものである。平均距離が期待値より有意に小さければ、点は集中分布しているという結論になり、逆に大きければ一様分布しているという結論が得られる。しかし、最近隣距離による点過程解析には、識別されない分布パター

ンが存在するなど (図 2B, C)、幾つかの問題がある。このため現在では、ある点から一定の距離  $r$  に存在する点の密度に基づく点過程解析が行われるようになってきている (図 3)。代表的な統計関数として、以下の三種類が挙げられる。

- (1) 二体相関関数 pair correlation function,  $g(r)$ : 任意の点について、距離  $r$  上に存在する他点の密度を計算したもの。ランダム分布では 1, 集中分布では 1 より大きな値、一様分布では 1 より小さな値 (最低が 0) となる。
- (2) Ripley の K 関数,  $K(r)$ : 二体相関関数を極座標で積分し、任意の点から距離  $r$  以内に存在する他点の密度としたもの。二次関数であるために、結果がやや分かりにくい。
- (3) L 関数,  $L(r)$ : 点の個数や密度による影響を取り除くため、K 関数を標準化し、一次関数としたもの。ランダム分布では 0, 集中分布では正の値、一様分布では負の値となる。

## 2.2 定常性と等方性

点過程解析を行う際に注意すべきこととして、定常性 stationary と等方性 isotropy が挙げられる。定常性とは、位置の普遍性のことであり、分布規則が領域内のどの区域にあるかに関わらず一定であることである。また、等方性とは、分布規則が方向に依存しないことである。すなわち、定常性

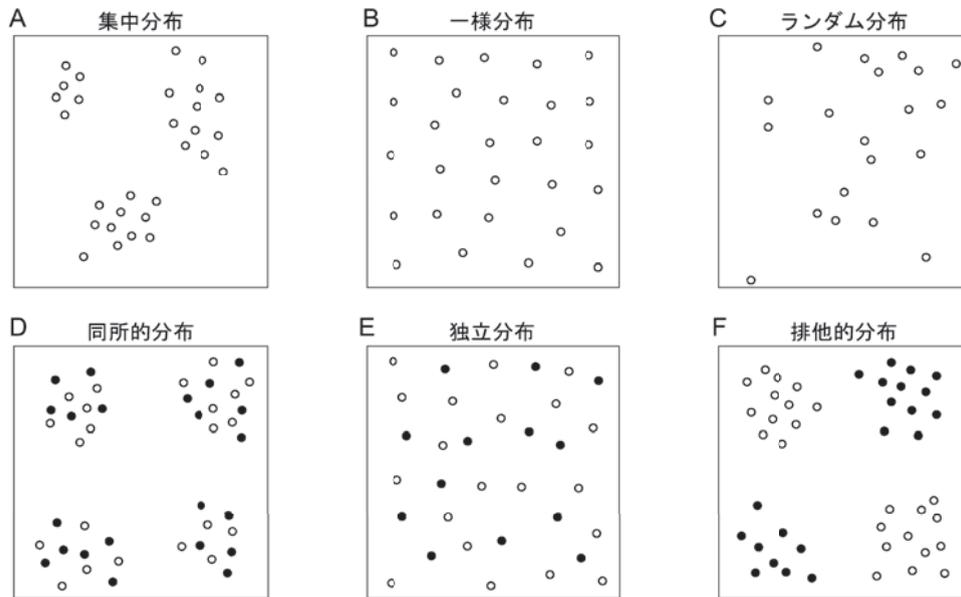


図 1 空間分布パターンの例.

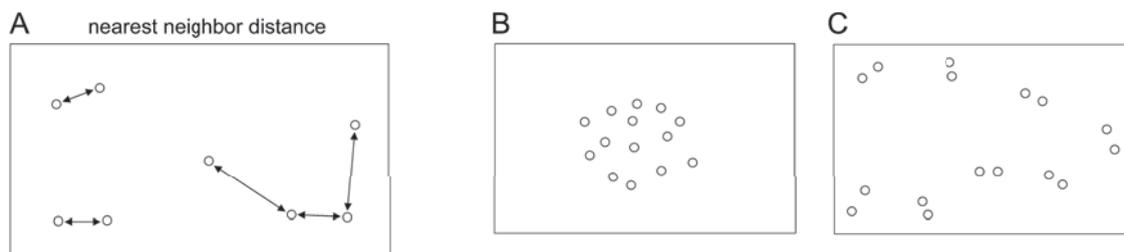


図 2 最近隣距離法の模式図。(A) 計算の基本操作。一つの点に注目し、全ての他点との組み合わせについて距離を計算し、最も短い組み合わせを求める。(B, C) 最近隣距離法ではいずれも集中分布となり、識別できない例。

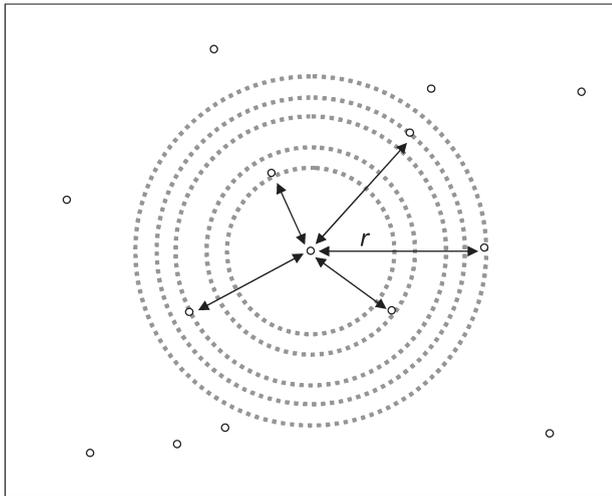


図3 二体相関関数による計算操作. 一つの点に注目し, 全ての他点との組み合わせについて距離を測定し, 任意の距離 $r$ での組み合わせ数をカウントする. この操作を全ての点について行う.

と等方性の両方を満たすということは, 領域内の環境が均一であることを意味している. 本来, 点過程解析は定常性と等方性を前提として成立している. 非定常性, 異方性などが認められた場合, 適切なサンプリングを行い, 均一な領域について解析することが必要になる.

### 2.3 神経解剖学への応用

中枢神経系において, ニューロンやグリア, シナプスなど, 各種の構成要素の分布が組織によって異なることは良く知られている. しかしながら, 網膜におけるアマクリン細胞の2次元的な分布パターンについての報告<sup>6)</sup>などを除いて, 中枢神経系での分布パターンの研究はそれほど行われてこなかった. その原因の一つは, 中枢神経系の3次元的な構造にあると考えられる. 神経解剖学の研究は, 切片を使用して行われる場合が殆どだが, 2次元的な切片だけを使用して空間解析を行ったとしても, 3次元的な脳におけるその意義は限定されたものとなる. また, 脳内の環境は均一でない. すなわち, 定常性等方性に乏しい. しかし, 3次元的な切片を使用し, 定常性, 等方性を確保できる領域において空間解析を行えば, これまで知られてこなかった脳の構造を規定しているメカニズムについて知ることが出来るはずである. また, 免疫蛍光多重染色などを組み合わせると, 複数の構成要素の分布相関によって, 未知の相互作用が見出されることも考えられる. さらに, 構造を規定している機能分子の新たな同定に繋がることも期待できる. 空間解析は神経解剖学に新たな可能性をもたらすものである.

## 3. 海馬におけるミクログリアとアストロサイトの空間分布パターンの解明<sup>7)</sup>

### 3.1 背景

中枢神経系では, ニューロンは主として情報処理を司り, グリアはその支持や栄養に関わると考えられてきた. しかし

近年の研究により, グリアの有する多様な機能が次々に明らかにされ, その機能に注目が集まっている. アストロサイト astrocyte はグリアの一種であり, 中枢神経系におけるホメオスタシスの維持に主要な役割を果たしている. アストロサイトから放出される神経栄養因子が, シナプスの形成や維持, 情報伝達の制御に関与していること, ニューロンの分化や再生の制御に関与していることなどから, 分子生物学的な研究が盛んに進められている. その一方で我々は, 形態学的な研究により, アストロサイトが排他的に固有の領域を支配し(ドメイン構造), ニューロンの栄養や支持に関与している可能性を明らかにした<sup>8)</sup>. アストロサイトのドメイン構造は, 新たな機能的構造として注目され<sup>9)</sup>, ニューロンの樹状突起の形態や, スパイン密度に影響していることも報告されている<sup>10)</sup>.

ミクログリア microglia は中枢神経系に存在する免疫担当細胞であり, 脳の保護に不可欠な役割を果たしている<sup>11)</sup>. 従来は, 正常脳組織でのミクログリアは静止状態にあり, 有害刺激によって初めて活性化され, 形態学的, 機能的に変化すると考えられてきた. しかし, 近年の二光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた研究により, 静止していると思われていた正常脳組織のミクログリアが, 活発に突起を進展・収縮させて, 局所環境のモニタリングを行っている可能性が示された<sup>12)</sup>. このことは, ミクログリアもアストロサイトと同様に固有の領域を支配し, ドメイン構造を有する可能性を示唆している. このため我々は, 空間解析によってミクログリアの分布パターンを明らかにすることを計画した. また, アストロサイトの分布との相互作用についても検討を行った.

### 3.2 実験方法

オスの成熟マウス (C57BL/6J, 22–25 g, 8–11 w) を灌流固定し, 海馬の連続切片 (50  $\mu\text{m}$ ) を作製した. ミクログリアの神経化学的マーカーとして ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) を, アストロサイトのマーカーとして S100 $\beta$  を使用した. ミクログリアの空間分布密度を解析するために, ABC-DAB 法により標本作製し, オプティカルダイセクター法<sup>3)</sup>に基づく定量を行った. ミクログリアとアストロサイトの分布パターンの解析には, Iba1 と S100 $\beta$  に対する免疫蛍光二重染色標本作製した. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて, 海馬 CA1 領域における光学切片のスタックを取り込み, 画像解析ソフトウェア ImageJ により, 細胞体の3次元座標データを取得した. 本研究では, 統計関数として二体相関関数と L 関数を選択した. 統計量の計算は, Ulm 大学 Schmidt 教授 (Ulm, Germany) の協力を得て, GeoStock library<sup>13)</sup> により行った.

### 3.3 結果と考察

海馬において, ミクログリア, アストロサイトはいずれも散在性に分布していた (図 4A–C). また, 一部でミクログリアとアストロサイトの細胞体同士の接触が認められた (図 4D). Iba1 に対する免疫染色によって, ミクログリアの突起は, ほぼ末端まで (bulbous ending など) 可視化されて

いることが確認された (図 4E). ミクログリアの細胞体の分布密度は、領域や層に関わらずほぼ一様であったが、CA1 と CA3 の網状分子層の密度は、他の層 (上昇層、錐体細胞層、放線層など) よりも有意に高かった。

海馬 CA1 領域におけるミクログリアとアストロサイトの分布を図 5 に示す。定性的には、層によるミクログリアの分布の差は明らかではなかった (図 5A)。その一方で、既報の通り<sup>8)</sup>、アストロサイトは網状分子層に明らかに多く分布していた (図 5B)。ミクログリアとアストロサイトの細胞体

同士の接触は、CA1 の全域で認められた (図 5C)。

点過程解析の結果を図 6 に示す。ミクログリアやアストロサイトの分布密度の違いから、定常性を考慮し、CA1 の網状分子層と、放線層など他の層で分けて解析を行っている。二体相関関数  $g(r)$  により、ミクログリア、アストロサイトのいずれも一様分布の傾向を示すことが明らかになった (図 6A, B)。ミクログリアは網状分子層で  $r=38 \mu\text{m}$  の有意な一様分布、それ以外の層では  $r=42 \mu\text{m}$  の有意な一様分布を示した (有意確率 90%)。アストロサイトは網状分子層で  $r=14 \mu\text{m}$ 、

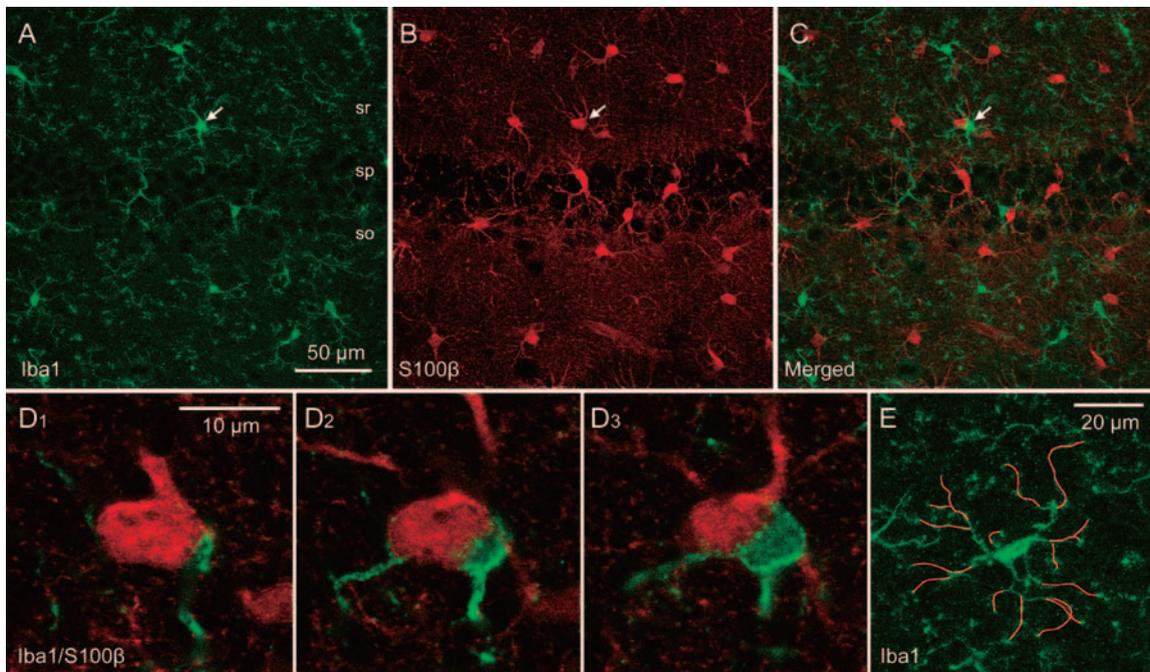


図 4 マウス海馬 CA1 における Iba1 と S100β に対する免疫蛍光二重染色。(A-C) Iba1 によって同定されるミクログリアと S100β によって同定されるアストロサイトの細胞体にコンタクトが認められるものを矢印で示す。(D) A-C の矢印で示したコンタクトの高倍像。共焦点レーザー顕微鏡による連続光学切片像。(E) Iba1 により、ミクログリアの突起は、ほぼ末端まで可視化できる。赤線は、共焦点レーザー顕微鏡から得られた投影像に基づく突起のトレースを示している。本研究では、トレースされた突起に外接する円により、ミクログリアの半径を近似的に計算している。so, stratum oriens 上昇層; sp, stratum pyramidale 錐体細胞層; sr, stratum radiatum 放線層。(文献 7 から許可を得て改変)

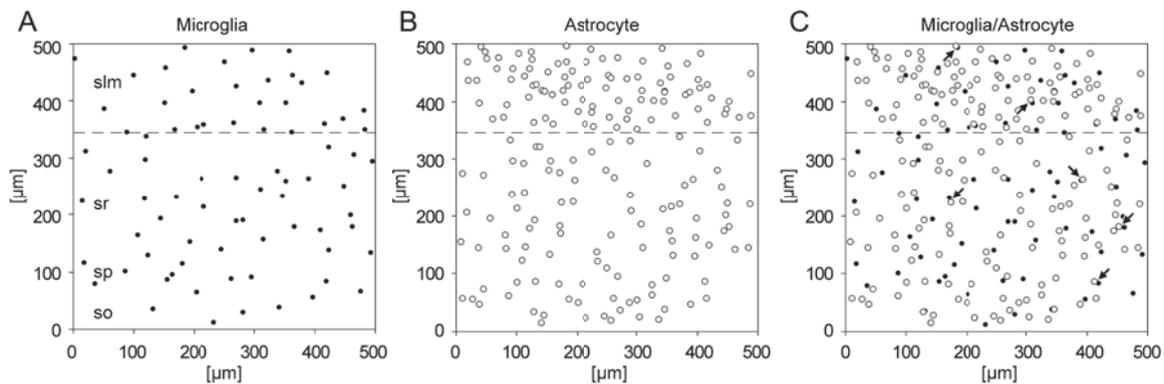


図 5 海馬 CA1 におけるミクログリアとアストロサイトの分布。図は共焦点レーザー顕微鏡のスタックのプロジェクトン像に基づいている。矢印アストロサイトとミクログリアの細胞体のコンタクトが確認されたものを示す。slm, stratum lacunosum-moleculare 網状分子層; so, stratum oriens 上昇層; sp, stratum pyramidale 錐体細胞層; sr, stratum radiatum 放線層。(文献 7 から許可を得て改変)

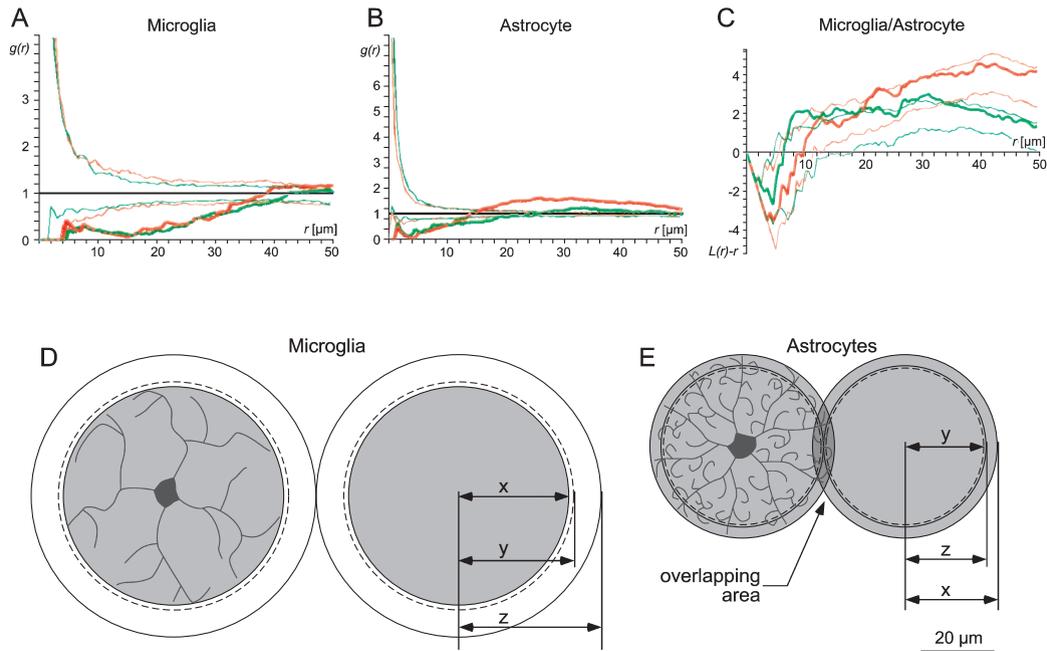


図6 ミクログリアとアストロサイトの空間解析のまとめ. (A, B) 二体相関関数で表現したミクログリア (A) とアストロサイト (B) の分布パターン. 太線が実際のデータ, 細線はCSRに基づく90%信頼区間を示す. (C) L関数で表現したミクログリアとアストロサイトの分布相関. 赤線は網状分子層, 緑線はその他の層のデータを示す. (D, E) ドメイン構造の模式図.  $x$ は突起のトレースによる領域の半径.  $y$ は分布密度から計算される領域の半径.  $z$ は点過程解析から計算される領域の半径を示す. (文献7から許可を得て改変)

他の層では  $r=24\ \mu\text{m}$  の一様分布であった. 次に, L関数  $L(r)$  を用いてアストロサイトとミクログリアの分布相関を解析したところ, 網状分子層では概ね独立であったが, その他の層では,  $r\leq 34\ \mu\text{m}$  で同所的 (同90%) な傾向が認められ, 両者に誘引作用が存在することが示唆された (図6C).

放線層のミクログリアの突起をトレースして得られた大きさと ( $r=32.1\ \mu\text{m}$ ; 図4Eを参照), 点過程解析から得られた結果 ( $r=42\ \mu\text{m}$ ) から, ミクログリアのドメイン構造が明らかになった (図6D). アストロサイトのドメイン構造とは異なり (図6E), ミクログリアのドメイン構造には, 隣接するミクログリアの突起が重複する領域はなく, 逆に, 突起の分布しない領域が広がっていた. これらから, ミクログリアのドメイン構造の形成には, 突起の contact inhibition ではなく, 何らかの液性因子が関与していることが示唆された.

#### 4. おわりに

現代の神経科学では, 分子生物学的な手法がメインストリームになっており, 学習や記憶, 精神疾患などに関連がある遺伝子が次々に報告され, 分子レベルの研究が急速に進んでいる. それに比べ, 中枢神経系の機能的構造についての研究はあまり進展していない. このことは将来, 脳研究の発展の妨げとなる可能性がある. 本稿で述べてきたように, 空間解析の手法を神経解剖学に応用することによって, 脳の構成要素の分布を規定しているメカニズムについて, 多くの知見が得られる. これにより, 中枢神経系の機能的構造の解明が飛躍的に進むものと期待される.

#### 謝 辞

本研究の遂行ならびに本稿の執筆にあたり, 貴重な助言を賜った九州大学小坂俊夫教授に心より感謝申し上げます.

#### 文 献

- 1) Ramón, Y.C.: Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et es Vertebres. Malonie, Paris, 1911
- 2) Diggle, P.J.: Statistical analysis of spatial point patterns, Oxford University Press, 2003
- 3) Jinno, S. and Kosaka, T.: *Neurosci. Res.*, **56**, 229–245 (2006)
- 4) 島谷健一郎: 日本生態学会誌, **51**, 87–106 (2001)
- 5) Fortin, M.J. and Dale, M.: Spatial analysis: a guide for ecologists, Cambridge University Press, 2005
- 6) Diggle P.J.: *J. Neurosci. Methods.*, **18**, 115–125 (1986)
- 7) Jinno, S., Fleischer, F., Eckel, S., Schmidt, V. and Kosaka, T.: *Glia*, **55**, 1334–1347 (2007)
- 8) Ogata, K. and Kosaka, T.: *Neuroscience*, **113**, 221–233 (2002)
- 9) Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z. and Ellisman, M.H.: *J. Neurosci.*, **22**, 183–192 (2002)
- 10) Oberheim, N.A., Tian, G.F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B. and Nedergaard, M.: *J. Neurosci.*, **28**, 3264–3276 (2008)
- 11) Aloisi, F.: *Glia*, **36**, 165–179 (2001)
- 12) Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F.: *Science*, **308**, 1314–1318 (2005)
- 13) Mayer, J., Schmidt, V. and Schweiggert, F.: *Simul. Modelling Practice Theory*, **12**, 307–326 (2004)