

氏 名 任 翔 壘

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2169 号

学位授与の日付 2020 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Layer 1 Projection Diversity of Layer 5 Pyramidal Cells in  
the Frontal Cortex

論文審査委員 主 査 教授 南部 篤  
教授 川口 泰雄  
教授 吉村 由美子  
准教授 山下 貴之  
名古屋大学環境医学研究所

(Form 3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Im, Sanghun

Title Layer 1 Projection Diversity of Layer 5 Pyramidal Cells in the Frontal Cortex

Behavioral expression and sensory perception require top-down projections from the higher-order areas of frontal cortex to layer 1 (L1) of primary motor and various sensory areas. Within the rodent frontal cortical areas, the secondary motor cortex (M2) has layer 5 (L5) pyramidal cells (PCs) projecting to L1 of diverse neocortical areas. L5 of M2 houses two major PC subtypes: corticopontine (CPn) cells projecting to the pons and intratelencephalic (IT) cells projecting to the contralateral cortex. Both subtypes include PCs that project to other cortical areas, but it remains unclear whether the L1 innervation patterns are differentiated between L5 PC subtypes. Since L1 houses GABAergic interneurons as well as the apical dendrites of PCs, L5 PCs probably make synaptic connections with these elements. L1 GABAergic cells fall into three classes based on differences in firing pattern, axonal distribution and molecular expression. Therefore, L5 CPn and IT cells may connect differently with L1 GABA cell subtypes.

To elucidate L5 to L1 connection properties, which are the key components of the top-down pathway, I investigated the axon distribution of both M2-L5 PC subtypes in L1 and how it innervates L1 GABA cell subtypes. For selective fluorescent labeling and optogenetic stimulation of L5 pyramidal cell subtypes, I expressed Cre recombinase (Cre) in CPn cells by injecting retrograde AAV virus into the pons and introduced a transgenic mouse line expressing Cre selectively in L5 IT cells (Tlx3-Cre PL56 mouse).

To compare the innervation patterns of CPn and IT cells locally within M2, in the primary motor cortex (M1) and primary sensory cortex (S1), Synaptophysin-tagged EGFP was used to fluorescently label the axon terminals. The terminal boutons of CPn

cells were found more in L1 than layer 2/3 (L2/3) for each cortical area, whereas those of IT cells were quantitatively similar between L1 and L2/3 in M2, but more abundant in L1 for M1 and S1. These suggest that regarding L1 innervation, M2 L5 IT cells have preference for certain cortical areas.

Some L5 IT cells express ER 81 (ETS translocation variant 1), a transcription factor found in cortex. ER81 was expressed in a portion of IT cells projecting to M1 or S1. However, when retrograde tracers were introduced from the axon terminal in L1 of M1 or S1, almost all of the M2-L5 IT cells were positive for ER81. Furthermore, ER81 was expressed in most of L5 IT cells that project to distant areas such as the distal cortex.

Based on these observations, I reasoned that the L1 innervation preference of L5 IT cells is linked to the distal area projection. To investigate this point further, I analyzed the cortical area and layer distributions of axons from individual M2-L5 pyramidal cells found in the MouseLight database of Janelia Research Campus. L1 innervation was diverse in the IT subtype. IT cells with higher innervation to L1 sent more axons to the distal areas than IT cells with lower innervation. Both apical and basal dendrite lengths of the IT cells correlated with the L1 innervation preferences. These findings suggest that L5 IT cells with more abundant L1 innervation have longer dendrites, more axons in the distal cortical areas and higher probability of ER81 expression.

L1 has three subtypes of GABA cells with different physiological characteristics as follows: spike afterdepolarization (ADP cells); spike induction following slowly developing ramp depolarization (late spiking (LS) cells); without ADP and LS (non-ADP/non-LS cells). These physiological subtypes also differed morphologically. Light stimulation of L5 CPn or IT cell axons induced monosynaptic excitation in three L1 subtypes. Input intensities were compared by simultaneous recordings from two cells of different subtypes. EPSC charges induced by L5 IT cell stimulation were similar

among the three subtypes. On the other hand, those by CPn cell simulation differed between the postsynaptic subtypes: non-ADP/non-LS cells were the most common, followed by LS cells.

This study revealed that L5 corticocortical pyramidal cells consisted of three groups: CPn cells projecting to the upper L1 of the proximal cortical area; a subpopulation of IT cells with weak L1 innervation and projection to the proximal area; another subpopulation of IT cells with strong L1 innervation and projection to both proximal and distal areas. Connection strength to L1 GABA cells differs between CPn and IT cells. IT cells uniformly excite three L1 subtypes. On the other hand, CPn cells more strongly excite non-ADP/non-LS cells that inhibit the upper part of L1, where the thalamocortical and CPn cell axons are distributed densely. Thus, L5 corticocortical cell subtypes show different connection selectivity in projections to L1, an important pathway of top-down functions.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 任 翔壘Title  
論文題目 Layer 1 Projection Diversity of Layer 5 Pyramidal Cells in the Frontal Cortex

行動発現や感覚認知において、高次領野の前頭皮質から1次運動野(M1)、感覚系領野の表層(1層)へのトップダウン信号により、行動選択や感覚刺激応答の調節等が行われると考えられている。げっ歯類前頭皮質の中では2次運動野(M2)の5層錐体細胞が様々な皮質領野の1層へ軸索を投射することが知られている。5層錐体細胞は橋核に投射する橋核投射(CPn: corticopontine)細胞と、対側皮質に投射する終脳内投射(IT: intratelencephalic)細胞に大別される。両グループとも皮質1層に軸索を送るが、両者の1層投射様式が異なるかについては未解明である。さらにIT細胞は発火様式、樹状突起の形態、発現分子などに多様性があるので、1層投射様式も多様である可能性がある。また1層にはGABA作動性神経細胞が存在し複数のサブタイプに分類されるが、5層錐体細胞からのシナプス結合については報告されていない。本研究では、皮質間トップダウン投射を担う前頭皮質5層から1層への経路を理解するために、CPn細胞とIT細胞の1層における軸索分布と1層GABA細胞サブタイプへの興奮性出力の違いを調べた。

まずCPn細胞とIT細胞からの軸索分布をM2局所、M1、1次体性感覚野(S1)で比較した。M2のCPn細胞の軸索はどの領野でも1層に多く分布していた。一方、IT細胞はM2で1層ばかりでなく2、3層にも分布するのに対して、M1やS1では1層に多く分布していた。これらのことからIT細胞には投射皮質が異なるサブタイプが存在する可能性が示唆された。

次にIT細胞のサブタイプにより1層への投射様式が異なるかを調べるため、IT細胞を分類する分子マーカーとして転写因子ER81を用いて、ER81発現の有無とIT細胞の皮質間投射および1層投射の関連を調べた。M2からM1もしくはS1へ投射するIT細胞では、約6割がER81陽性であった。そのうち1層に限局して投射する細胞については、約9割がER81陽性を示した。更にCPn細胞の投射が少ない遠隔皮質に投射するIT細胞の約9割がER81を発現していた。このようにER81発現の有無により、IT細胞軸索の1層指向性と遠隔投射の差異がみられた。この細胞タイプ特異的な軸索投射の観察結果を補強する目的で、Janelia Research Campusの全脳軸索再構築データベースを用い解析した。その結果、IT細胞は1層指向性に多様性を持ち、遺伝子発現や遠隔皮質への投射様式、樹状突起の形態と関連することが示唆された。

最後に、皮質局所の5層錐体細胞と1層GABA細胞との結合回路を調べた。1層にあるGABA細胞は、スパイクの後にafterdepolarization(ADP)を持つ細胞(ADP細胞)、緩徐に増大する脱分極後に発火が起きる細胞(late-spiking [LS]細胞)、両者以外の

細胞（non-ADP/non-LS 細胞）の 3 つのサブタイプに分類することができる。IT 細胞が 1 層 GABA 細胞へ一様に出力するのに対して、CPn 細胞は主に 1 層上部に軸索を伸ばす non-ADP/non-LS 細胞を興奮させるような選択的な回路を形成していた。

以上の結果から、前頭皮質 5 層の錐体細胞には、1 層投射様式・投射領野が異なる 3 つの細胞群があることがわかった。CPn 細胞は M1 や S1 などの近接皮質の 1 層上部に投射するのに対して、IT 細胞には 1 層投射指向性が強く遠隔皮質まで投射するグループと、1 層投射が弱く近接皮質までしか投射しないグループがあった。1 層に投射する CPn 細胞と IT 細胞では、1 層 GABA 細胞へのシナプス結合様式も異なっていた。

本出願者は、皮質間投射をする 2 種類の 5 層錐体細胞サブタイプが 5 層内のシナプス結合だけでなく、1 層への投射・シナプス結合も異なることを明らかにした。この 5 層から 1 層への投射はトップダウン機能を担う重要な経路であり、動物の行動選択や感覚刺激応答の調節等に関わる脳機能を調べる上で重要な知見である。以上の結果から、本研究は学位論文として十分な内容を有しているものと、審査委員会において全員一致で判断した。

---

（備考）

1. 用紙の大きさは、日本工業規格（JIS）A4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字（英文の場合は 80 文字）、1 ページあたり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者（申請者）が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in English, and each page shall have 40 lines.
3. The top, bottom, and right margins must be 2 cm and the left one must be 2.5 cm.
4. Single spacing is required between the title and the text.
5. There must be no page numbers.
6. If the applicant is conferred a doctoral degree, this paper will be published on the SOKENDAI Repository.