

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18985

研究課題名(和文) 網様体コリン作動性介在ニューロンによる運動ニューロン調節機構の形態学的解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of modulation of motor activity by reticular cholinergic interneurons

研究代表者

松井 利康 (Matsui, Toshiyasu)

岡山理科大学・獣医学部・准教授

研究者番号：90531343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳幹の大細胞性網様体に分布するコリン作動性介在ニューロンは、口腔顔面領域の筋を支配する運動ニューロンに投射する。この介在ニューロンは運動ニューロンの活動性を調節すると考えられているが、その細胞形態および介在ニューロンと他の脳領域との神経連絡には不明な点が多い。本研究では、逆行性または順行性トレーサ(Fluorogoldまたはbiotinylated dextran amine)を用いて、齧歯類の脳における網様体コリン作動性ニューロンの神経連絡を解析した。また生後発生期の口腔顔面筋支配の運動神経核において、コリン作動性介在ニューロンがつくる大型神経終末のコリン作動性神経マーカーの発現を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が研究対象とするコリン作動性介在ニューロンは、運動ニューロンの活動調節に機能することが知られており、その入力筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウスにおいて運動ニューロンの機能低下を代償する可能性が報告されている。ALSは口腔顔面筋の機能低下と、それに伴う摂食・嚥下障害なども引き起こすことから、本研究により脳幹網様体のコリン作動性介在ニューロンの機能が明らかにされれば、障害された口腔顔面筋の運動機能を賦活化する機構が解明されると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cholinergic interneurons in the magnocellular reticular formation of the brainstem project to motor neurons innervating oro-facial muscles. While this interneuron is considered to modulate the neural activity of oro-facial motor neurons, its morphology and neural connection with other brain regions remain poorly understood. In the present study, the connection of reticular cholinergic interneurons was examined in the rodent brain using retrograde or anterograde tracer (Fluorogold or biotinylated dextran-amine). We also investigated the expression of cholinergic markers on large synaptic buttons, that derive from reticular cholinergic interneurons, in oro-facial motor nuclei during postnatal development.

研究分野：組織形態学、神経解剖学

キーワード：網様体 脳幹 コリン作動性ニューロン 介在ニューロン 運動ニューロン

1. 研究開始当初の背景

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、大型のコリン作動性終末 C-terminal が接している。C-terminal から放出されるアセチルコリンはシナプス後部の M2 ムスカリン性受容体を介して、運動ニューロンの発火頻度を増加させる。脊髄ではコリン作動性介在ニューロン Partition cell が脊髄 X 層および VII 層に分布しており、前角運動ニューロンに C-terminal を投射している起始細胞である。申請者らは、コリン作動性ニューロンを特異的に標識するウイルストレーサーを用いて Partition cell の形態学的特徴を解析し、その細胞局在と樹状突起分枝などに基づいて 3 群に分類できることを明らかにしてきた。

コリン作動性神経終末 C-terminal は脊髄前角に加えて、口腔顔面筋を支配する脳神経運動核にも存在する。これら脳神経運動核（舌下神経核、疑核、顔面神経核、三叉神経運動核）に分布する C-terminal の起始細胞は、脳幹の大細胞性網様体に分布するコリン作動性介在ニューロンであることが知られている。そのため、プレモーターニューロンでもある網様体コリン作動性介在ニューロンは、脳神経運動核運動ニューロンの活動調節を介して、口腔顔面筋の協調運動に関与すると考えられる。一方で、これまでの研究から脳幹網様体のコリン作動性介在ニューロンは脊髄の Partition cell と遺伝子マーカーの発現を異にしており、両者の細胞性質の相違性が示されている。このことは脊髄のコリン作動性介在ニューロンに関する知見を、そのまま脳幹網様体に外挿できないことを示唆する。そのため、口腔顔面筋の運動制御機構における C-terminal の機能を明らかにするためには、脳幹網様体のコリン作動性介在ニューロンにおいて細胞形態とその神経連絡を解析することが必要と考えられる。

2. 研究の目的

咀嚼・嚥下・発声など口腔顔面領域の複雑な運動は、それらの筋を支配する運動ニューロンの協調活動によって制御される。口腔顔面筋を支配する脳神経運動核には、C-terminal と呼ばれるコリン作動性神経終末が存在し、運動ニューロンと興奮性シナプスを形成している。研究代表者はこれまでの研究により、脳幹網様体に分布するコリン作動性介在ニューロンが口腔顔面筋を支配する運動核に両側性かつ同時投射することを明らかにし、運動ニューロンの協調活動に関与する可能性を見いだした。しかしながら、網様体コリン作動性介在ニューロンと感覚性／運動性などのネットワークとの神経連絡や情報伝達機構は不明である。そこで本研究では下記の項目について解析し、コリン作動性介在ニューロンを介した口腔顔面筋の運動調節機構を形態学的側面から解明することを目指す。

(1) 脳幹網様体コリン作動性介在ニューロンと他ニューロンとの神経連絡：

トレーサー実験による神経連絡の決定、コリン作動性介在ニューロンに対する神経伝達にはたらく伝達物質の同定

(2) 脳幹網様体コリン作動性介在ニューロンの形態特徴：

コリン作動性ニューロン特異的標識法による介在ニューロンの神経突起の可視化、脳神経運動核における C-terminal の成熟過程の解明

3. 研究の方法

(1) 脳幹網様体コリン作動性介在ニューロンと他ニューロンとの神経連絡の解析

①網様体に投射する脳領域の逆行性トレーサーを用いた探索

脳幹の C-terminal 起始細胞であ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。そこで、大細胞性網様体に投射するニューロンの脳における分布を検討するため、神経終末部から細胞体に向かって輸送される逆行性トレーサー（Fluoro-Gold）を網様体に注入し、逆行性標識細胞が位置する神経領域を決定する。

②網様体へと投射するニューロンの順行性トレーサーによる軸索・神経終末の標識

計画①では、逆行性トレーサーを注入した領域に投射するニューロンの局在は決定できるが、それらニューロンが注入領域のコリン作動性介在ニューロンと直接連絡するのかわからない。そこで逆行性標識ニューロンが観察された脳領域に、細胞体より軸索終末に向かって輸送される順行性トレーサー（BDA）を注入し、それら脳領域のニューロンの順行性標識された神経終末が網様体のコリン作動性介在ニューロンとシナプスをつくるのかを確認する。

(2) 脳幹網様体コリン作動性介在ニューロンの細胞形態解析

①コリン作動性ニューロン特異的標識法による形態解析

Cre/lox 誘導性ウイルスベクターは、Cre 発現細胞においてのみ膜移行シグナル付加 GFP（myr-GFP または pal-GFP）を発現する発現ベクターである。これらのベクターをコリン作動性ニューロン特異的 Cre 発現マウス（ChAT-Cre マウス）の脳幹網様体に注入し、連続切片を用いて GFP 標識された神経突起を再構築することで、コリン作動性介在ニューロンの細胞形態の全体像を解析する。

②脳幹の運動神経核におけるコリン作動性神経終末 C-terminal の成熟過程とシナプス機能分子発現の経時的変化の解析

マウスの脊髄腹角運動ニューロンに接する C-terminal は、幼若マウスの歩行開始時期に同期して成熟することが知られている。一方で、哺乳・嚥下といった出生直後から機能す

る口腔顔面筋支配の運動神経核に分布する C-terminal の機能的成熟過程は不明である。そこで口腔顔面筋運動ニューロンに注入する C-terminal の機能的意義を検証する目的で、発生期における C-terminal の形態成熟とコリン作動性シナプス機能分子の発現変化を明らかにする。

4. 研究成果

(1) -①網様体に投射する脳領域の逆行性トレーサーを用いた探索

脳幹網様体に存在するコリン作動性介在ニューロン (C-terminal 起始細胞) と神経連絡をもつ脳領域を明らかにする目的で、逆行性トレーサー (Fluorogold) を延髄の大細胞性網様体に注入し、逆行性標識ニューロンの分布を検討した (図1)。逆行性標識ニューロンの観察に用いた標本の隣接切片にはニッスル染色を行い、脳アトラスにしたがって神経核の境界を決めることで、標識ニューロンが位置する神経核を同定した。脊髄および脳幹では、逆行性標識されたニューロンは、脊髄後角、三叉神経脊髄路核、孤束核、最後野、小細胞性赤核、中脳中心灰白質、結合腕傍核、縫線核など様々な神経核で観察された。また網様体では、トレーサーを注入した延髄尾側部近くでは小細胞性網様体に標識ニューロンが多く分布したのに対して、延髄吻側部から中脳では外側巨大細胞傍網様核、外背側被蓋核など中間網様体に標識ニューロンが観察された。間脳より吻側レベルにおいては、逆行性標識ニューロンは扁桃体中心核、不確帯核、側坐核、視床下部などに分布するとともに、皮質では体性感覚野、体性運動野、帯状回のそれぞれ V 層において対側優位に観察された。これらの脳領域は、口腔顔面筋の運動制御に関与する神経核にも投射することが報告されており、コリン作動性介在ニューロンが存在する大細胞性網様体に対する直接投射も含めた運動調節経路が存在する可能性が示唆された。

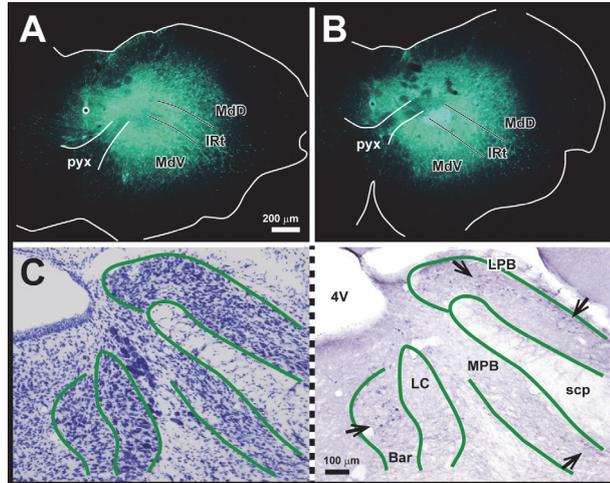


図1 脳幹網様体に対する Fluorogold 注入と逆行性標識ニューロン

A, B: C-terminal 起始細胞が存在する脳幹の大細胞性網様体 (IRt, MdV) に注入中心が位置した個体例。C: 橋では結合腕傍核 (LPB, MPB) やバリントン氏核 (Bar) などに標識ニューロン (矢印) が存在した。

(1) -②網様体へと投射するニューロンの順行性トレーサーによる軸索・神経終末の標識
上記の逆行性トレーシングにより、標識ニューロンが扁桃体中心核に存在したため、順行性トレーサーを用いて扁桃体と延髄網様体との神経連絡を解析した。扁桃体は情動行動の制御に重要な役割をもつ神経核であり、威嚇など攻撃行動では口腔顔面筋の運動ニューロンを動員する必要があることから、網様体のプレモーターニューロンと直接連絡をもつ可能性を予想して実験を行った。扁桃体中心核に順行性トレーサーが注入された個体では、標識された軸索と神経終末の投射が分界条床核などで豊富に見られ、先行研究との一致性から注入範囲が適切であることが確認できた。続いて脳幹を観察したところ、標識軸索および神経終末は中脳水道周囲灰白質外側部、後赤核領域、脚橋被蓋核、結合腕傍核、青斑核、淡蒼縫線核、孤束核などに分布したが、延髄大細胞性網様体への投射は少なかった。この結果は、扁桃体中心核と延髄網様体との神経連絡は扁桃体からの直接の投射より、脳幹の複数の神経核で中継されてから、網様体のコリン作動性介在ニューロンに伝達される可能性を示唆している。

(2) -①コリン作動性ニューロン特異的標識法による形態解析

これまでの研究で使用していた膜移行シグナル付加 GFP (myrGFP) 発現アデノウイルスベクターは、ニューロンの樹状突起を精細に可視化できる一方で、軸索や神経終末の可視化を苦手としていた。また一部のベクターでは、GFP の十分な発現量を得る目的で注入後に長期の生存期間をとると、ベクター感染に起因すると思われるニューロン変性が見られることがあった。そこで、ベクターが発現した GFP の軸索および神経終末への効率的な移行を得る目的で、膜移行シグナル付加 GFP とシナプス局在分子融合 GFP との間をバイシストロニック発現用配列 T2A で連結した発現系を作製した。またベクターに使用するウイルスについても、アデノウイルスより細胞毒性が低いとされアデノ随伴ウイルスに変更した。

(2) -②脳幹の運動神経核における C-terminal の成熟過程

口腔顔面筋領域の筋は哺乳など出生直後から活動する必要があるため、それらの筋を支配する運動ニューロンに対する入力、すなわち網様体介在ニューロンからの神経終末 C-terminal も早期に成熟することが予想される。そこで、口腔顔面筋運動核の生後発達におけるコリン作動性シナプス機能分子の発現変化を免疫組織化学で検討した (図2)。鰓弓性運動神経核 (三叉神経

運動核、顔面神経核および疑核)と舌下神経核の C-terminal において、コリンアセチルトランスフェラーゼ、小胞性アセチルコリントランスポーターの発現を解析したところ、出生直後よりも生後4日齢で強い発現が見られた。また同一の運動神経核の中でも、C-terminal における機能分子の発現変化が運動ニューロンごとに異なることが明らかになった。

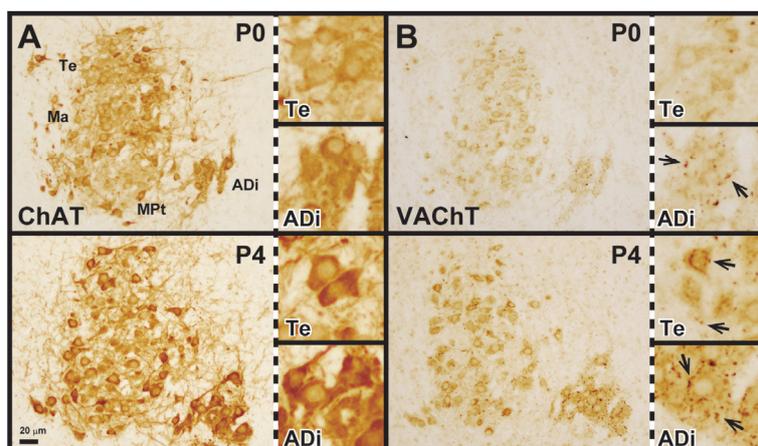


図2 三叉神経運動核の生後発達におけるコリン作動性神経マーカーの発現

A: コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の運動ニューロンにおける発現は生後0日齢 (P0) から4日齢 (P4) にかけて増加した。

B: 小胞性アセチルコリントランスポーター (VACHT) で標識される C-terminal (矢印) は、顎二腹筋前腹支配の運動ニューロン (ADi) に隣接して、他筋支配の運動ニューロン (Te: 側頭筋) よりも早期に観察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① Niwa K, Mizutani K, Matsui T, Kurioka T, Matsunobu T, Kawauchi S, Satoh Y, Sato S, Shiotani A, Kobayashi Y. Pathophysiology of the inner ear after blast injury caused by laser-induced shock wave. *Scientific Reports* 6; 31754: 1–10. 2016. 査読有
DOI: 10.1038/srep31754
- ② Matsui T, Nakata T, Kobayashi Y. Distribution of Organic cation transporter 2 (OCT2) in monoaminergic and cholinergic axon terminals of the mouse brain. *Neuroscience Letters* 663: 118–124. 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2016.09.025
- ③ 田中久美子, 松井利康, 小林靖. シリケンイモリ (*Cynops ensicauda*) の嗅球における糖鎖分布の組織化学的同定. *防衛医科大学校雑誌* 42: 119–129. 2017. 査読有
DOI: なし
- ④ Matsui T, Tanaka K, Kobayashi Y. Heterogeneous expression of glycoconjugates in the primary olfactory center of the Japanese sword-tailed newt. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 47: 28–37. 2018. 査読有
DOI: 10.1111/ahel.12320
- ⑤ 松井利康, 小林靖. 網様体の比較解剖学と脊髄からの連続性. *Clinical Neuroscience* 35: 654–656. 2018. 査読無, 依頼有
DOI: なし
- ⑥ Matsui T, Kobayashi Y. Glycoconjugate expression in the olfactory bulb of the premetamorphic larva of the Japanese sword-tailed newt (*Cynops ensicauda*). *Journal of Veterinary Medical Science* 80: 836–841. 2018. 査読有
DOI: 10.1292/jvms.17-0679
- ⑦ 松井利康, 小林靖. 有機カチオントランスポーター. *Clinical Neuroscience* 36: 663–665. 2018. 査読無, 依頼有
DOI: なし

[学会発表] (計1件)

- ① 松井利康, 中田隆博, 本郷悠, 小林靖. マウス脊髄後根神経節ニューロンにおける有機カチオントランスポーターOCT2の発現とその化学的分類. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017年3月(長崎).

[その他]

ホームページ (研究内容の紹介): <http://www.vet.ous.ac.jp/seminar/keitaigaku/matsui/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。