

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06528

研究課題名(和文) 発達に伴う皮質運動ニューロン連関の可塑性変化 -運動ニューロンは学習するのか? -

研究課題名(英文) Developmental change in synaptic plasticity of corticomotoneuronal direct connections: Do motoneurons learn?

研究代表者

大野 孝恵 (Ohno, Takae)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：60508109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：皮質-運動ニューロン直接結合の結合頻度と結合強度の継時変化をまとめると、生後1Wまでに形成された直接結合は、2Wでプラトーに達しシナプス除去が始まり、3W以降には消失する事がわかり、この結果を英文誌に投稿した(Neuroscience, 2021)。このシナプス除去過程は、paired pulse ratioが変化した事からpreに変化が生じているが、miniture EPSCの振幅には変化が見られずpostの関与は見られなかった。また、GluN2Bを運動ニューロンから選択的にノックアウトすると、シナプス除去が部分的に阻害され、本シナプス除去過程にはGluN2Bが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織の低酸素化を最大限遅らせ、迅速に脊髄を取り出す独自の手法にて頸髄急性スライスを作成することで、世界的にも困難とされてきた生後3週以降の脊髄運動ニューロンからのホールセル記録を可能にしたことは、運動ニューロンの研究に大きく貢献できるものと考えられる。また、皮質脊髄路シナプス除去過程ではpresynapseに変化が生じているもpostの関与は明らかでなく、NMDA受容体サブユニットの1つであるGluN2Bを運動ニューロンから選択的にノックアウトすると、シナプス除去が部分的に阻害された事から、本過程にはGluN2Bが関与しており、遺伝的要因に加え、活動依存的な影響も受けていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The developmental time course of the positive ratio and the synaptic strength of cortico-motoneuronal direct connections showed that the direct connections were formed by 1W after birth, reached a plateau at 2W, and then the elimination began and disappeared after 3W. The results were submitted to an English journal (Neuroscience, 2021). This process of synapse removal was accompanied by the change in the pre-synaptic state due to a change in the paired pulse ratio, but there was no change in the amplitude of the miniture EPSCs, indicating that the post-synaptic state was not involved in the process. Selective knockout of GluN2B from motoneurons partially inhibited synaptic removal, suggesting that GluN2B is involved in this synaptic removal process.

研究分野：神経科学

キーワード：運動ニューロン 皮質運動ニューロン直接結合 シナプス除去 光遺伝学的刺激法 ホールセル記録

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質運動野から脊髄運動ニューロンへの直接結合は高等霊長類にのみ存在すると考えられ、上肢の巧緻運動に関与していると示唆されてきた。近年、我々の研究室が、従来直接結合は無いと考えられていた齧歯類にもその幼若期には皮質脊髄路軸索と前腕筋支配の運動ニューロンとの間に直接結合が存在することを証明したのをかわきりに¹⁾²⁾、その直接結合は発達に伴い消失する等の報告が相次ぎ、注目を集めている³⁾。

脊髄運動ニューロンは筋肉の運動を制御している細胞群であり、比較的古くからその特徴的な形により同定されているが、低酸素状態に弱い上に大型で樹状突起が長いためにスライス作成時に傷害を受けやすく、生後2週以降のホールセル記録による電気生理学的研究は世界的に見てもほとんどなされていない。そのような実験上の難しさから、上記直接結合の存在する正確な期間を決定するには至っておらず、また直接結合に関与する分子メカニズムなど未だ説明すべき不明な点が多く残されている。一方、中枢神経系の様々な系における発達過程のシナプス除去メカニズムとして、活動依存的因子と遺伝学的に規定された原因分子の両者が注目されるようになり、それらの分子探索が世界的に進められている。本系においても、大脳皮質感覚運動野と頸髄のスライスを共培養する独自の *in vitro* 皮質脊髄投射モデルを用いた当研究室の研究により、皮質脊髄路シナプスの少なくとも一部はシナプス後細胞の GluN2B (NMDA 受容体サブタイプ) 依存的なシナプス除去を示すという結果を得ていることや⁴⁾⁵⁾⁶⁾、一過性皮質脊髄直接結合のシナプス除去に対する *Sema6D-PlexA1* の関与が形態学的に示されていることから³⁾、シナプス除去過程における活動依存的または遺伝的分子メカニズムの関与の検討も重要な課題である。この度我々は、組織の低酸素化を最大限遅らせ、迅速に脊髄を取り出す独自の手法にて頸髄急性スライスを作成することで、生後3週以降の脊髄運動ニューロンからのホールセル記録を可能にしたことにより、大脳皮質錐体細胞と頸髄運動ニューロン間の直接結合の有無をシナプス形成時から継時的に確認できるのみならず、シナプスが一旦形成され除去にいたる過程のシナプス活動の変化を詳細に観察することが可能になった。

2. 研究の目的

我々の研究室では、齧歯類にもその幼若期には大脳皮質と運動ニューロンとの間に直接結合が存在することを電気生理学的に示したが、その直接結合が発達に伴いどの時期に消失するのか、またどのようなメカニズムに基づいてシナプス除去が生じるのかなど未だ説明すべき不明な点が多く残されている。

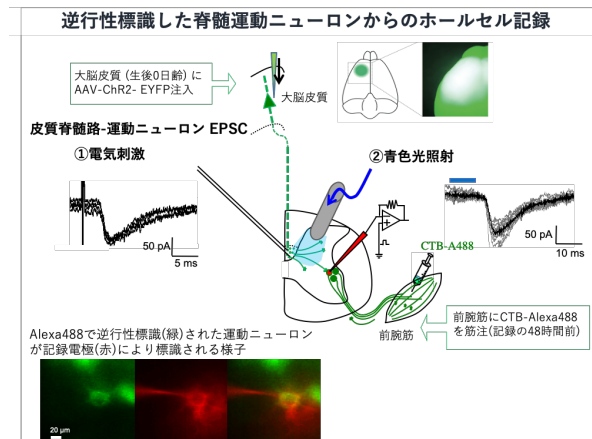
この度我々は今まで困難とされてきた成体マウスでの脊髄運動ニューロンからのホールセル記録に成功し、直接結合が消失する過程に生じるシナプスの機能変化を詳細に評価することが可能になった。これによりシナプス除去の継時的変化のみならず、シナプス除去への関与が示唆される GluN2B を運動ニューロン選択的にノックアウトした際の除去過程への影響も解析が可能になった。また、遺伝的分子メカニズムを念頭に *Sema6D* をノックアウトした場合の影響も観察可能であり、皮質運動ニューロン直接結合の除去メカニズムの詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

まず始めに、幼若期に見られる皮質-運動ニューロン直接結合に関して、前腕筋支配運動ニューロン以外の運動ニューロンにも皮質からの直接結合があるのか、その場合直接結合を受ける脊髄運動ニューロンの中で支配筋により入力頻度に差があるのかどうかを確認する。そのため、

前腕筋(遠位筋)以外の手内筋、上腕筋(近位筋)、胸筋、傍脊柱筋(体幹筋)各々に CTB-Alexa488 を筋注し、CTB(+)細胞より皮質-運動ニューロン EPSC を記録して、その結合頻度を比較した。

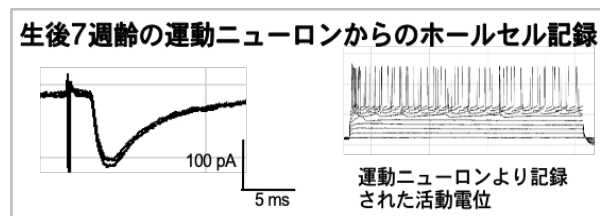
その上で、前腕筋支配運動ニューロンに注目し、野生型マウスの前腕筋支配運動ニューロンより皮質脊髄路軸索-運動ニューロン EPSC を継時的に記録することで、大脳皮質から運動ニューロンへの直接結合が生後何日齢から出現し何日齢で消失するのかを決定した。刺激は光遺伝学的刺激と電気刺激の両者で行い、光刺激の場合、生後 0 日齢(P0)の左大脳皮質に AAV-ChR2-EYFP を、P7 の右前腕筋に CTB-Alexa488 を注入し、P14 以降の頸髄スライスで CTB(+)細胞より EPSC を、電気刺激の場合は、筋注をおこなった 48 時間以降に CTB(+)細胞より EPSC を記録した。



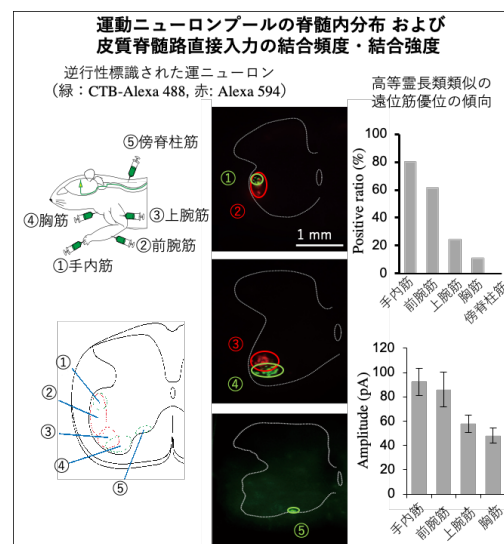
次に、本シナプス除去過程に活動依存的あるいは遺伝的分子メカニズムが関与している可能性を考え、まずは Grin2B-flox マウス(崎村建司教授(新潟大学)より分与)の前腕筋に AAV-CRE-RFP を筋注し前腕筋支配運動ニューロンに CRE を発現させる事で RFP(+)運動ニューロン選択的に 2B をノックアウトし、シナプス除去にどう影響するのかを観察した。また、Sema6D ノックアウトマウス(熊ノ郷淳教授(大阪大学)より分与)を用いて同様にシナプス除去に対する影響を観察した。そして最後に、paired pulse 刺激実験とストロンチウムを用いた quantal study を組み合わせて観察することにより、本系におけるシナプス除去過程に対する pre と postsynaptic site の関与を確認した。

4. 研究成果

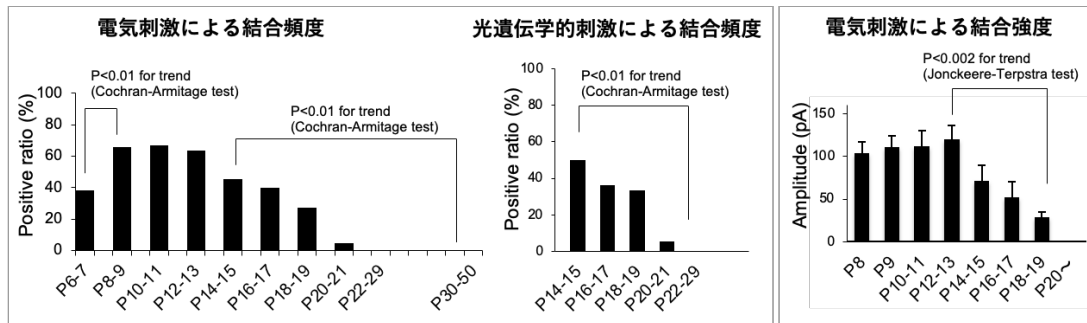
本研究では、独自の急性スライス作製法にて、生後7週の脊髄スライスでも運動ニューロンからのホールセル記録を可能にし、シナプス反応(右図左)と、自発的な活動電位(右図右)を記録し得た。



成体マウスでの脊髄ホールセル記録トライアル中に、前腕筋支配運動ニューロン以外の運動ニューロンへの皮質からの直接結合の有無を観察した結果、手内筋、上腕筋、胸筋支配の運動ニューロンにも皮質からの直接結合が存在することを確認した。また、それらの結合頻度及び結合強度には、遠位筋優位のグラデーションがあり、これは、高等霊長類で見られるとされているグラデーションと類似するものであった。

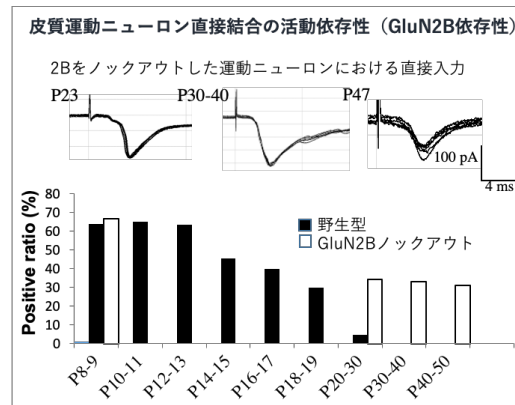


電気刺激及び光遺伝学的刺激による皮質-運動ニューロン直接結合の結合頻度（陽性率）と、電気刺激による結合強度（振幅）の経時変化をグラフにまとめたところ、生後1週齢にかけて形成された直接結合は、生後2週齢にかけてプラトーに達し、以降シナプス除去が始まり、生後3週齢以降には消失することがわかり、英文誌に投稿した（Neuroscience 478: 89-99, 2021）。



このシナプス除去過程をpaired pulse 刺激実験とストロンチウムを用いたquantal studyを組み合わせ観察したところ、paired pulse 刺激による二発目の振幅の一発目の振幅に対する減少率が変化していったことからpresynapseに変化が生じていることが示唆されたが、miniture EPSCの振幅には変化が見られずpostの関与はとらえられなかった。

また、NMDA受容体サブユニットの1つであるGluN2Bを運動ニューロンから選択的にノックアウトすると、皮質脊髄路-運動ニューロン直接結合のシナプス除去が部分的に阻害されたことから、本シナプス除去過程にはGluN2Bが関与しており、遺伝的要因に加え、活動依存的な影響も受けていることが示唆された。



【参考文献】

- 1) Fukuda S et al (2016) J Physiol 594: 189-205
- 2) Murabe N et al (2018) Scientific Reports: 8: 16536
- 3) Gu Z et al. (2017) Science 357:400-404
- 4) Ohno T et al (2004) J Neurosci 24: 1377-1384
- 5) Ohno T et al (2010) PNAS 107: 15252-15257
- 6) Ohno T et al (2016) Scientific Reports: 6:34196

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohno T, Fukuda S, Murabe N, Niido M, Sakurai M	4. 巻 478
2. 論文標題 Transient direct corticomotoneuronal connections during development in rodents, an electrophysiological study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 89-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2021.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大野孝恵	4. 巻 824
2. 論文標題 発達期マウスにおける一過性皮質脊髄運動ニューロン直接結合：その除去メカニズムと個体・系統発生的意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 女医界	6. 最初と最後の頁 79-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda S, Maeda H, Sakurai M	4. 巻 4;10(1)
2. 論文標題 Reevaluation of motoneuron morphology: diversity and regularity among motoneurons innervating different arm muscles along a proximal-distal axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-69662-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 大野孝恵	4. 巻 824
2. 論文標題 発達期マウスにおける一過性皮質脊髄運動ニューロン直接結合：その除去メカニズムと個体・系統発生的意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 女医界	6. 最初と最後の頁 79-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 新戸瑞穂、福田諭、大野孝恵、桜井正樹	4. 巻 41
2. 論文標題 幼若期齧歯類において形成される皮質脊髄軸索-上肢運動ニューロン間直接シナプスは高等霊長類に類似した分布を示す	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 帝京医学雑誌	6. 最初と最後の頁 137-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takae Ohno
2. 発表標題 Involvement of GluN2B-containing NMDA receptors in the elimination of cortico-motoneuronal synapses during development
3. 学会等名 Society for Neuroscience, Chicago, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野孝恵
2. 発表標題 Developmental synapse elimination in cortico-motoneuronal synapse
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野孝恵
2. 発表標題 The elimination of cortico-motoneuronal synapses during development: involvement of GluN2B containing NMDA receptor
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野孝恵
2. 発表標題 Regression and its time course of transient cortico-motoneuronal direct connections during development in mice
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田諭
2. 発表標題 Motoneurons may show a spectrum of arborization pattern depending on the distal-proximal axis of their innervating muscles
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takae Ohno, Satoshi Fukuda, Naoyuki Murabe, Hiroaki Mizukami, Keiya Ozawa, Toshihiro Hayashi, Masaki Sakurai
2. 発表標題 Temporal profile of transient corticomotoneuronal direct connection in the rodent
3. 学会等名 北米神経科学学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takae Ohno, Satoshi Fukuda, Naoyuki Murabe, Hiroaki Mizukami, Keiya Ozawa, Toshihiro Hayashi, Masaki Sakurai
2. 発表標題 Temporal profile of developmental change in corticomotoneuronal direct connection in rodents
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	福田 諭 (Fukuda Satoshi) (50425641)	帝京大学・医学部・助教 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------