

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300138

研究課題名（和文） 皮質脊髄投射回路形成における退行過程と増生過程

研究課題名（英文） Regressive and proliferative processes in the formation of cortico-spinal projection.

## 研究代表者

桜井 正樹 (SAKURAI MASAKI)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：30162340

研究成果の概要（和文）：皮質脊髄(CS)スライス共培養系におけるCS投射の腹側からのシナプス除去と軸索撤退に退縮、軸索自切、変性の3種類があり、様態が詳細に記載された。シナプス除去はシナプス後部のGluN2B-NMDA受容体に依存的であり、これはCa流入量の差ではなく、下流シグナル伝達系の差による。In vivoにおいて、C7単一髄節を支配するCS細胞がP7には運動関連皮質に広く分布しているがP56にはその密度が低下し、これは細胞死ではなく軸索除去によるものである。四肢筋を支配する運動ニューロンに限りP7においてはCS入力を直接受ける。

研究成果の概要（英文）：We developed corticospinal projection system in vitro using slice co-cultures of rodent sensorimotor cortex and spinal cord, where we found that corticospinal (CS) synapses are formed diffusely in the spinal gray matter until 7 DIV but those on the ventral side are eliminated later until 14 DIV in an NMDA receptor-dependent manner.

In the present studies: (1) We labeled CS axons with EYFP transfected with electroporation and studied axonal regression from ventral side on long-term live imaging. There were three types of regressive events: retraction, amputation (autototomy), and degeneration. We analyzed their character in detail. (2) We co-cultured slices obtained from GluN2B or GluN2A KO mice and wild type animals. The synapse elimination was not seen when GluN2B KO spinal cord was cocultured with wild type cortex, indicating that postsynaptic (not presynaptic) GluN2B (rather than GluN2A) is essentially involved in the synapse elimination. Furthermore, differential effect of 2B and 2A seems to be downstream signaling rather than the difference in amount of Ca entry. (3) We studied developmental change in distribution of CS cells projecting to a single segment, C7, by injecting almost entire half gray matter of C7 at P7 and P56. At P7, projecting cells are widely distributed through motor-related cortex and somatosensory cortices, which was dramatically decreased in density at P56. This reduction was not due to cell death but axon elimination. (4) We found direct cortico-motoneuronal synapses at P7 rat by recording CS-EPSC from identified motoneuron retrogradely labeled with CTB. Only motoneurons innervate distal limb muscles received direct CS synapses.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	8,500,000	2,550,000	11,050,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：皮質脊髄投射、シナプス形成、シナプス除去、NMDA 受容体、GluN2B

### 1. 研究開始当初の背景

皮質脊髄路は最長の投射路であり、また随意運動に必須の構造物である。これまで、皮質から脊髄灰白質に至る pathfinding については多くの研究が存在するが、灰白質進入後、シナプス形成に至る過程の研究は少ない。我々は大脳皮質と脊髄のスライスを共培養することにより、皮質脊髄シナプスを *in vitro* で再構築することに世界に先駆けて成功し、このシナプスが当初 (培養 7 日: 7 DIV) は脊髄全体に形成されるが、14 DIV までには腹側のシナプスは除去されること、このシナプス除去は活動 (NMDA 受容体) 依存的であることを示した。 *in vivo* ラットにおいても *in vitro* 同様、P7 までには脊髄全体にわたりシナプスが形成されるが、P10 までの間に腹外側のシナプスが除去されることを示した。NMDA 受容体の阻害剤 APV の適用時期を詳細に変えることにより、この活動依存的シナプス除去には 6-13 DIV に臨界期があることを示した。これは初の臨界期 *in vitro* モデル系である。

### 2. 研究の目的

皮質脊髄路シナプスの形成過程とそれに伴う可塑的变化の様態とそのメカニズムを探る。

### 3. 研究の方法

[スライス共培養]ラットまたはマウスの大脳感覚運動皮質と脊髄 (頸髄) からとったスライスを共培養し、両者間にシナプスを形成させる。

皮質脊髄線維の蛍光標識によるライブ観察: 胎生 14 日に EYFP 発現系プラスミドを脳室内注入し、*ex utero* 電気穿孔法で皮質 V 層細胞にトランスフェクションする。生後この脳から得たスライスを脊髄と共培養し、脊髄に投射する軸索が蛍光標識されその動態がライブ観察できる。

皮質脊髄シナプスの生理学的研究: 皮質深層を電気刺激し、ガラス管微小電極を脊髄内に格子状に刺入して fEPSP を記録し、また膜電位感受性色素によって光学的に記録することにより、シナプスの空間分布を調べる。またパッチ電極によるホールセル記録により単一細胞の EPSC を記録する。

### [In vivo 動物]

皮質脊髄細胞の逆行性標識: 頸髄灰白質に蛍光ビーズを注入し、皮質脊髄線維終末から取り込ませ、皮質脊髄細胞を逆行性に標識してその大脳皮質における分布を観察する。

運動ニューロンの逆行性標識と選択的ホールセル記録: 上肢筋と肢帯・体幹筋にコレラトキシン B を注入してそれぞれを支配する脊髄運動ニューロンを標識し、その頸髄から

急性スライスを作成して、皮質脊髓路（後索腹側）を電気刺激する一方、蛍光標識により同定した運動ニューロンからホールセル記録を行い、皮質脊髓路からの入力を単シナプス性に受ける細胞があるかどうかをみる。

#### 4. 研究成果

##### <軸索の撤退様式>

皮質スライスV層の錐体細胞に EYFP 発現系プラスミドを遺伝子導入し、その脊髓内軸索を長期のライブイメージングにより観察したところ、軸索の撤退のあり方に、軸索が縮むように短縮する退縮 retraction (①)、これまでに報告のなかった、途中で切断して断端が残される軸索自切 amputation あるいは autaxotomy (②)、ある部分から遠位が数珠状構造をとりながら急速に消失していく変性 degeneration (③) の3種類があることを示し、各々の様態が詳細かつ定量的に調べられた。

##### <シナプス応答空間分布の発達変化>

膜電位感受性色素を用いて皮質脊髓シナプスの空間分布を調べ、それまでフィールドEPSPの空間分布から推定していた腹側からのシナプス除去を確認できた。また、シナプス除去の時期に一致して、皮質脊髓シナプスのNMDA受容体がNR2Bから2Aへ変化することが明らかになり、NR2B受容体のシナプス除去への選択的関与が示唆された。

##### <GluN2Bの選択的関与>

遺伝子改変動物を用いた研究を開始するため、C57BL/6マウスのスライス培養を開始し、ラットとほぼ同様の皮質脊髓シナプスの発達を示すことを確認した。

GluN2B ノックアウト (KO)マウス由来の脊髓スライスと野生型の皮質スライスの共培養(a)、野生型の脊髓スライスとGluN2B由来の皮質スライスの共培養(b)を行ったところ、(b)ではシナプス除去が生ずるが(a)では阻害された。また、GluN2A由来の脊髓と野生

型の皮質を共培養(c)すると、シナプス除去が生じた。このことから、シナプス除去はGluN2AではなくGluN2Bに、しかも皮質(presynaptic)側ではなく脊髓(postsynaptic)側のGluN2Bに依存していることが示された。なお、GluN2B・KOマウスの海馬では、2Bばかりでなく、2Aを含めてNMDA電流が発現していないとの報告があるが、皮質脊髓シナプスのNMDA電流を調べると2Aと考えられる減衰の早い電流がrobustに発現しており、上記GluN2B・KOマウスでの結果がNMDA電流の欠如である可能性は否定された。また2A・KOマウスでのNMDA電流(主として2B成分)を部分ブロックして2B・KOマウスのレベルに落とすAPVの濃度で培養を行ってもシナプス除去が生ずることが示され、2B/2Aのdifferentialな結果が流入Ca量の差によるものではなく、Caの下流にあるシグナル系の違いによることが示唆された。薬理実験からこのシグナル系の中、CaMKIIが必須の関与をしていることも示唆されている。

##### <単一髄節(C7)投射皮質脊髓路細胞の皮質内分布の発達変化>

7日齢(P7)の第七頸髄灰白質からの逆行性標識では、運動関連皮質のほぼ全体が標識されるという驚くべき事実が見出された。一方P21における逆行性標識では標識される細胞分布は限局していたが、細胞密度を計測すると、P7の分布が全体に低下していることが示唆された。この事実はこれまで信じられてきた運動野の体部位局在的な構成に疑問を投げ掛けるものである。また、この間の逆行性標識細胞の減少が細胞死によるものか、C7への軸索側枝の除去によるものかをみるため、P7で逆行性標識し、P35で固定する実験を行った。すると、標識される細胞の数・分布はP7標識→P21固定と殆ど変わらず、P7やP21間の減少が細胞死ではなく、軸索側枝の除去であることが示唆された。

<皮質脊髄路—運動ニューロン間直接シナプス結合>

げっ歯類成体では皮質脊髄路と運動ニューロン間には直接のシナプス結合はないとする見解が主流である。しかし、我々は P7 においては方法に示した標識法で同定した運動ニューロンから皮質脊髄路刺激による単シナプス性の EPSC を記録した。興味深いことに四肢筋を支配する細胞のみから記録され、体幹筋、肢帯筋支配の細胞からは記録されなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Ohno T, Maeda H, Murabe N, Kamiyama T, Yoshioka N, Mishina M, Sakurai M: Specific involvement of GluN2B-containing NMDA receptors in developmental elimination of corticospinal synapses. Proc Natl Acad Sci USA; 107(34):15252-7, 2010. (査読有)
- ② Yoshioka N, Murabe N, Sakurai M: corticospinal axons in in vitro slice cocultures: Retraction, amputation, and degeneration. J Comp Neurol 513: 164-172, 2009. (査読有)
- ③ 桜井正樹: 錐体路の発達. Ann Review 神経 2009 : 22-34, 2009. (査読無)
- ④ 桜井正樹: 小脳の正常機能とその異常、Clinical Neuroscience, 27:21-23, 2009. (査読無)
- ⑤ Maeda H, Ohno T, Sakurai M: Optical and electrophysiological recordings of corticospinal synaptic activity in in vitro slice co-cultures. Neuroscience 150: 829-840, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

- ① Ohno T, Meda H, Murabe N, Kamiyama T, Yoshioka N, Mishina M, Sakurai M: Differential effect of GluN2B vs. GluN2A KO in corticospinal synapse elimination during development. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Nov. 14, 2010
- ② Murabe N, Kamiyama T, Sakurai M: Inclusive labeling of the corticospinal neurons innervating a single cervical segment with EYFP by way of exo utero electroporation: quantitative analysis of their terminals in the spinal gray matter during development. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Nov. 14, 2010
- ③ Ohno da H, Murabe N, Kamiyama T, Yoshioka N, Mishina M, Sakurai M: Differential effect of GluN2B KO vs. GluN2A KO in corticospinal synapse elimination during development: Difference in the amount of Ca entry or its down stream signaling mechanism? 33<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Sept 3, 2010
- ④ Maeda H, Hukuda S, Murabe N, Sakurai M: Rat motor neurons receive direct corticospinal synapses in an early postnatal period. 33<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Sept 3, 2010
- ⑤ Kamiyama T, Kameda H, Sakurai M:

- Distribution of corticospinal neurons innervating the single spinal segment of C7 in adult and early postnatal period: Retrograde labeling studies with fluorescent beads. 33<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Sept 4, 2010
- ⑥ Murabe N, Kamiyama T, Sakurai M: Inclusive labeling of the total innervating areas of corticospinal neurons with EYFP by way of exo utero electroporation for quantitative analysis of their terminals in the spinal gray matter during development. 33<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Sept 4, 2010
- ⑦ Kamiyama T, Murabe N, Sakurai M: Retrograde labeling of corticospinal neurons innervating the spinal gray of C7 using fluorescent beads. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, Oct. 20, 2009
- ⑧ Maeda H, Sakurai M: Morphological and electro-physiological studies of the corticoceptive spinal neurons in the early postnatal period. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, Oct. 20, 2009
- ⑨ Ohno T, Maeda H, Murabe N, Kamiyama T, Yoshioka N, Mishina M, Sakurai M: GluR $\epsilon$ 2(NR2B)-containing NMDA receptors are specifically involved in the corticospinal synapse elimination during development. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, Oct. 20, 2009
- ⑩ Maeda H, Yanagawa U, Kawaguti Y, Sakurai M: Morphological study of the corticoceptive spinal neurons in the early postnatal period. The 32<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 17, 2009
- ⑪ Kamiyama T, Murabe N, Sakurai M: Retrograde labeling of corticospinal neurons innervating the spinal gray of C7 using fluorescent beads (Retrobeads<sup>TM</sup>). The 32<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 17, 2009
- ⑫ Ohno T, Maeda H, Murabe N, Kamiyama T, Yoshioka N, Mishina M, Sakurai M: GluR  $\epsilon$  2(NR2B) is specifically involved in the corticospinal synapse elimination during development. The 32<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16, 2009
- ⑬ Yoshioka N, Murabe N, Sakurai M: Retrograde movement of synapto-physin-positive puncta along corticospinal axons during development. The 32<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sept 16, 2009
- ⑭ Kamiyama T, Sakurai M: The corticospinal projection patterns into

the spinal gray matter in the rat. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington D.C., Nov.11, 2008

- ⑮ Yoshioka N, Murabe N, Sakurai M: Developmental rapid degeneration, retraction, and amputation in rat corticospinal axons: characterization using stage top recording system for time-lapse confocal imaging on in vitro slice coculture. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington D.C., Nov.11, 2008

- ⑯ Kamiyama T, Sakurai M: The pattern and main direction of axonal branching in developing corticospinal axon. The 31<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo, June 7, 2008

- ⑰ Maeda H, Sakurai M: Electrophysiological and morphological studies of the early corticoceptive spinal neurons. The 31<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo, June 7, 2008

- ⑱ Yoshioka N, Murabe N, Sakurai M: Quantitative analysis of axonal regressions during development in the rat corticospinal slice coculture. The 31<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo, June 7, 2008

- ⑲ 大野孝恵, 吉岡昇, 三品昌美, 桜井正樹 : マウス皮質脊髄シナプスのGluR  $\epsilon$  2(2B)

依的発達. 2008年5月16日、第49回日本神経学会総会 (横浜)

- ⑳ 前田仁士, 桜井正樹 : 皮質脊髄路シナプス後細胞の発達期における機能と形態研究. 2008年5月16日、第49回日本神経学会総会 (横浜)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

桜井 正樹 (SAKURAI MASAKI)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号 : 30162340

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :