

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300141

研究課題名(和文)皮質脊髄路シナプスの形成・可塑性・臨界期とそのメカニズム

研究課題名(英文)Development, plasticity, and its critical period of the corticospinal synapses

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円、(間接経費) 3,240,000円

研究成果の概要(和文)：我々は皮質脊髄シナプスはその発達過程において一旦脊髄全体に形成されるがその後、腹外側からNMDA受容体依存的に除去され、これが7-12 DIVに臨界期を有することをin vitro皮質脊髄スライス共培養系を用いて示してきた。本研究で、臨界期の終了は発達に伴いNMDA受容体が2B型から2A型優位にシフトすることで決定され、2B発現を操作することにより臨界期を操作可能であることを示した。またin vivoにおいて成体齧歯類では直接皮質脊髄シナプスを受けない運動ニューロンが遠位筋支配群に限っては幼若期にこれを受けているおり、この系が今後in vivoにおける細胞レベルでの研究標的となることを示した。

研究成果の概要(英文)：We found corticospinal (CS) synapses were formed at first diffusely in the spinal gray matter, but later, the ventral part was eliminated in an NMDA receptor dependent manner. We showed there was critical period (7-12 DIV) in this activity-dependent developmental plasticity. In the present studies we revealed that the ending of this critical period is determined by the developmental shift of dominant NMDA receptor subtype, from 2B to 2A. Moreover, the manipulation which elevated 2B subtype prolonged the critical period. Furthermore, we showed in vivo rodents that CS axons made direct synaptic contact with spinal motoneurons innervating distal forelimb muscles, although rodent motoneurons are known to receive no direct synapses from CS axons. These CS-motoneuron synapses might be eliminated during development. This would be an excellent in vivo target for studies of the developmental plasticity at the cellular and molecular level.

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 シナプス除去 神経回路発達 NR2B型NMDA受容体 臨界期

### 1. 研究開始当初の背景

我々は齧歯類の脳感覚運動皮質と脊髄(頸髄)のスライス共培養系を用いて皮質脊髄(corticospinal, CS)路を *in vitro* で再構築することに世界に先駆けて成功し、この系を用いてCS投射、CSシナプスの形成発達を研究してきた。これまでの研究から培養後4日(4 DIV)頃にシナプス形成が始まり7 DIVでは脊髄灰白質全体にシナプスが形成されるが、このうち腹側部分のシナプスが12-14 DIVまでに軸索と共に除去されること、このシナプス除去はNMDA受容体(NMDAR)依存性の可塑的变化であることを示した。更にこのシナプス除去はおよそ7-12 DIVに臨界期を有し、この間にシナプス除去をNMDAR阻害剤でブロックしておく、その後阻害剤を除いてももはや除去は起こらないことが分かった。また類似した腹(外)側からのシナプス除去が *in vivo* の齧歯類においても生後2-3週で生ずることが認められた。

NMDARはNR1, NR2のサブユニットから構成され、NR1は共通であるが、NR2にはA, Bの二つの主要なサブユニットが存在し(他にC, Dがある)、一般に生後間もない頃は2Bサブユニット型が優位であるが、発達と共に2Aが優位となる場合が多いことが知られている。

### 2. 研究の目的

本研究では *in vitro* スライス培養系と *in vivo* 動物の研究を平行して行い、相互の特質を補完的に利用して研究を進めることを目指している。

*In vitro* においては上記発達期可塑性の臨界期が終了するメカニズムを明らかにすることを目的とする。我々は脊髄発達期におけるNMDARの2B型から2A型へのシフトであるとの仮説をたて、これを2Aノックアウト(KO)マウスや他の薬理学的手法をもちいてテストする。

一方、*in vivo* においては脊髄腹外側(層)にある運動ニューロンは成体齧歯類においてはCSシナプスを直接受けていないとされており、これがCSシナプス除去の主要な対象の一つである可能性が高い。この可能性を検討する。また、皮質-脊髄間の領域間投射関係とその発達による変化を順/逆行性標識法等を用いて明らかにする。

### 3. 研究の方法

CS軸索の選択的刺激および軸索数の定量的評価のためにChR2-EYFP発現系をアデノ随伴ウイルス(AAV)に組み込み *in vivo* ではP0で皮質注入し、*in vitro* では培養開始時(脊髄共培養前)に皮質スライスにウイルス液を滴下した。

(*in vitro*) 生後0-1日齢(P0-1)のマウスの脳感覚運動皮質と頸髄から厚さ約

300-400  $\mu\text{m}$  のスライスを作成し、これらを併置して気相-液層境界面において培養する。臨界期中にはNMDAR阻害剤APVを培養液中に添加してシナプス除去を阻害しておき、臨界期相当期間終了(12 DIV)後にこれを除去して、軸索撤退、シナプス除去が生ずるかをみることにより臨界期終了の有無をみた。軸索の撤退はChR2-YFPで蛍光標識された軸索数をカウントすること、電気刺激またはChR2発現CS軸索を光刺激して電位感受性色素によりEPSPの空間分布を評価した。シナプスにおける2Bの発現は脊髄ニューロンからのホールセル記録によるシナプス電流中の2B要素(2B特異的阻害剤に感受性のある部分)の測定、培養脊髄から得たシナプス膜画分のウェスタンブロットにより評価した。

(*in vivo*) 前肢諸筋群に蛍光コレラ毒素B(CTB)を注入し、運動ニューロンを逆行性に標識して、脊髄スライス作成後、標識運動ニューロンよりホールセル記録を行った。また後索に刺激電極を挿入してCS線維を刺激するか、または前述の光遺伝学的手法により選択的にCS線維を刺激した。

### 4. 研究成果

#### 1) 臨界期の終了はNMDA受容体の2B 2Aシフトによっている

NMDA受容体の2B成分はホールセル記録、ウェスタンブロットの両結果ともに10-14 DIVに急落し、臨界期の終了とほぼ一致してシフトすることを示唆していた。

2A KOマウスでは2Aが2Bに置き換わることができないため、NMDARは2Bによって占められる状態が持続する。2A KOマウス由来の脊髄を皮質と共培養しておく、臨界期相当期間が終了後もシナプス除去が生じる。また、シナプスにおける2B発現を増大させるといわれているproBDNF、spermineを臨界期終了前から投与しておく、12 DIV後もシナプス除去が生じる。このことから2Bが臨界期終了時に急落すること、しかし一定量以上存在すれば条件では、臨界期は終了しないこと、が示され臨界期終了が2B 2Aのシフトによることが示された。

#### 2) 臨界期終了における抑制系発達の関与

視覚皮質における眼優位性シフトの可塑性臨界期決定においては抑制系の発達と興奮抑制バランスの変化が重要であることが示唆されている。我々の系の臨界期形成における抑制系発達の関与を調べるため、10 DIV頃より脊髄特にその腹側において主要な抑制性伝達物質であるglycineの阻害剤strychnineを適応しておく、臨界期が延長することが観察された。臨界期相当時期終了後の2B電流自体は対照と有意な変化がないが、strychnine存在下での2B(NMDA)チャンネルを介して流入するCaをCaイメージジ

グで評価すると臨界期中のそれと比肩する高いレベルであった。前述の結果と併せ、臨界期の終了は2B 2A シフトによって決定されるが、抑制系の発達もこれを修飾する重要な因子であることが示唆された。

### 3) 幼若期においては皮質脊髄路が運動ニューロンに直接シナプスを形成している

CS 軸索の注意深い電気刺激、光遺伝学的手法を用いた選択的 CS 刺激とホールセル記録を用いて、P12 くらいまでは、一部の運動ニューロンに対しては CS 軸索が単シナプス接続をしていることが電気生理学的に示された。共焦点顕微鏡を用いた形態学的な観察からもこれを支持する結果がえられた。興味深いことに、この単シナプス接続が示されたのは前肢の遠位筋支配運動ニューロンに限られており、肢体筋、胸筋などを支配するものには全くみられなかった。この機能的意義の解明は今後の課題であるが、霊長類においても CS 軸索の単シナプス接続は四肢遠位筋支配運動ニューロンが主たる標的であることから示唆に富む結果である。また、これまで CS シナプス除去において特定のシナプス後細胞が同定できなかったことが細胞レベルでの研究の桎梏となっていたが、運動ニューロンがその有力な候補であることが示され今後の研究に大きな突破口となることが期待される。

### 4) 支配筋ごとの運動ニューロン樹状突起の空間パターン解析

上記 3) の実験においてホールセル記録した運動ニューロンに Neurobiotin を注入し、支配筋ごとにその樹状突起の形態を NeuroLucida を用いて解析した。突起の空間的分布を星状細胞的かそれから偏った分布をしているかを定量化に評価する方法を開発し、従来一般的に星状細胞と考えられてきた運動ニューロンがかなり星状から偏倚した形態をしていることが分かった。胸筋など体幹筋支配のものなどは双極性の形態を示し、特にその傾向が強かった。

### 5) 頸髄でみられた大規模な皮質脊髄シナプス除去は腰髄では起きていない

シナプス終末からのみ選択的に取り込まれる蛍光ビーズ Retrobeads による逆行性標識、また皮質細胞への DsRed、synaptophysin-EYFP 発現系の *ex utero* 電気穿孔法を用いた導入による順行性標識の結果から、頸髄にみられる大規模な軸索-シナプス除去は腰髄においてはほとんどあるいは全く生じていないことが示された。この差が上肢(特に遠位筋)/下肢の運動制御系の形成の差異にどう関与しているかは今後の興味ある課題である。

## 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 3 件)

磯尾紀子, 桜井正樹: 小脳症候とその生理学的機構  
神経内科, 78(6), 674-682, (2013)

吉岡 昇, 村部直之, 桜井正樹: in vitro スライス培養系での神経軸索の退行  
日本神経回路学会誌, 20, 19-22, (2013)

Kobayashi S, Momose T, Sakurai M, Kanazawa I: Postanoxic Akinesia with Bilateral Pallidal Lesions.  
Internal Medicine :51, 2449-2451 (2012)

[学会発表](計 12 件)

北米神経科学会(SFN)での発表を中心とし、国内学会での発表で内容的に重複するものは省略。

Ohno T, Isoo N, Isowaki M, Murabe N, Fukuda S, Mishina M, Sakurai M: Manipulating "critical period" by controlling synaptic GluN2B expression  
43<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Nov 9-13, 2013

Murabe N, Sakurai M: Quantitative analysis of corticospinal axon terminals in the cervical enlargement of the mouse during development  
43<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Nov 9-13, 2013

Fukuda S, Maeda H, Yoshioka N, Murabe N, Kameda H, Sakurai M: Morphological study on dendritic arborization pattern of motoneurons: Diversity among pools innervating different types of muscles  
43<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Nov 9-13, 2013

Yoshioka N, Isoo N, Murabe N, Kameda H, Takahashi I, Sakurai M: Slow, stable, and long-distance retrograde movement of synaptophysin-positive puncta along axons in corticospinal slice coculture  
43<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Nov 9-13, 2013

Isowaki M, Ohno T, Isoo N, Maeda H, Kobayashi T, Mishina M, Sakurai M: Decline of GluN2B is crucially important  
Electrophysiological and optical recording study.

42<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Oct 14, 2012

Isoo N, Ohno T, Isowaki M, Murabe N, Mishina M, Sakurai M: Closure of critical period in developmental corticospinal plasticity is regulated by synaptic expression levels of GluN2B-NMDA receptors: Biochemical and live imaging study. 42<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Oct 14, 2012

Fukuda S, Maeda H, Murabe N, Kameda H, Sakurai M: Motor neurons receive direct monosynaptic connection from cortico-spinal tract in the rat during early postnatal period. 42<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Oct 15, 2012

Maeda H, Fukuda S, Murabe N, Kameda H, Sakurai M: Direct evidence of monosynaptic connection of cortico-spinal axons with forelimb innervating motor neurons: an optogenetic study. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sep 18-21, 2012

Yoshioka N, Kameda H, Takahashi I, Isoo N, Murabe N, Sakurai M: Formation and movement of synaptophysin-positive varicosities along developing cortical axons. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sep 18-21, 2012

Murabe N, Sakurai M: Postnatal development of corticospinal axons projecting to the spinal gray matter. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Nagoya, Sep 18-21, 2012

Kamiyama T, Kameda H, Murabe N, Sakurai M: Distribution of corticospinal neurons innervating the spinal segment of C7 and L4 in adult and early postnatal period: Retrograde double-labeling studies with fluorescent beads. 41<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, WASHINGTON, DC, Nov 12-16, 2011

Ohno T, Isoo N, Murabe N, Maeda H, Fukuda S, Yoshioka N, Mishina M, Sakurai M: Developmental decline of 2B

subunit containing NMDA receptor is essential for closing the critical period plasticity window in mouse corticospinal synapse elimination.

41<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington, DC, Nov 12-16, 2011

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 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  
吉岡 昇 (Yoshioka Noboru)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号: 20365985

磯尾 紀子 (Isoo Noriko)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号: 90548330

福田 諭 (Fukuda Satoshi)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号: 50425641