

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500359

研究課題名（和文）In vitro スライス培養系におけるシナプス除去とその分子メカニズム

研究課題名（英文）Synapse elimination and its molecular mechanisms of in vitro slice culture

研究代表者

大野 孝恵 (OHNO TAKAE)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：60508109

研究成果の概要（和文）：

我々はスライス培養による*in vitro*皮質脊髄投射系を用いて、発生初期に見られる皮質脊髄路シナプスの腹側からのシナプス除去過程について研究してきた。その中で、本過程がNMDA依存性で、臨界期critical periodを有することを示し、更にNMDA受容体サブユニットGluN2B (2B)の特異的関与とその責任部位が皮質 (pre)ではなく脊髄 (post)であることを明らかにした。本研究では、シナプス除去にかかわる更に下流の分子メカニズムを明らかにするため、2Bの選択的関与が2AとのCa流入量の違いのみでは説明できず2B受容体に直結する下流分子メカニズムの相違によるものであることを示唆した上で、2Bの代表的下流分子であるCaMKIIの遺伝子改変動物を用いて、シナプス除去に対するCaMKIIの関与を示した。また、野生型において臨界期の終了時期に一致して2Bから2Aへのシフトが起こることから臨界期の終了と2B発現量との関係に注目し、2B発現量の減少が臨界期の終了に重要な役割を果たしていることを確認し得た。

研究成果の概要（英文）：

We previously showed in *in vitro* slice co-cultures of mice cerebral cortex and spinal cord that corticospinal (CS) synapses, once formed throughout the spinal cord, were eliminated from the ventral side during development in an NMDAR-dependent manner. This synapse elimination was regulated selectively by GluN2B (2B) and had critical period. In this study we first investigated whether this differential effect of 2B and 2A is due to difference in the amount of Ca²⁺ entry between these two types of subunits or to signaling molecules downstream to Ca²⁺ entry thereafter showed the involvement of CaMKII on the CS synapse elimination by using genetically modified mice. We further tried to identify the mechanism that closes the critical period and found that 2B decline is essential for closing the period.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：皮質脊髄路、シナプス除去、GluN2B、GluN2A、CaMKII、臨界期

1. 研究開始当初の背景

皮質脊髄路は最長かつ線維数最大の皮質遠心路であるため、多くの神経疾患や外傷の座となり重篤な運動障害をもたらし得る。我々はこの系の重要性を考え、新生ラットの感覚運動皮質と脊髄のスライスを共培養して皮質脊髄路シナプスを *in vitro* で再構築することを試み、世界で初めて成功した

(Takuma et al. 2002)。この系を用いて、皮質脊髄路シナプスの発生初期に脊髄腹側からのシナプス除去があり、それが NMDA 受容体依存性であること (Ohno et al. 2004)、また培養 6-11 日目に臨界期が存在することを明らかにしたが (Ohno and Sakurai. 2005)、*in vivo* においても同様のシナプス除去過程が確認されている (Kamiyama et al 2006)。さらに、膜電位感受性色素を用いた光学的記録によるシナプス空間分布 (Maeda et al 2007)の結果、この系におけるシナプス除去が NMDA 受容体サブタイプである GluN2B 依存性である可能性が示唆されたことから、マウスによる共培養を導入し、2B 及び 2A KO マウス (*Grin2b*^{-/-}, *Grin2a*^{-/-})を用いて本系におけるシナプス可塑性に対する postsynaptic GluN2B の選択的関与を示した (Ohno et al 2010)。

NMDA 受容体サブユニットと発達期シナプス可塑性に関する研究では、2B とシナプス可塑性との関連を主張する論文 (Barth and Malenka. 2001; Ge et al. 2007)がある一方で、2A との関係性を主張する論文 (Philpot et al. 2007)や、両者との関連を否定する論文 (Lu et al. 2001)など様々な研究結果が発表され、今だ世界的な論争の的となっており、上記研究はこれらの論争に一石を投じることが出来たと考えている。

文献)

- 1) Takuma H, Sakurai M, Kanazawa I (2002) Neuroscience 109: 359-370
- 2) Ohno T, Maeda H, Sakurai M (2004) J Neurosci 24: 1377-1384

- 3) Ohno T and Sakurai M (2005) Neuroscience 132: 917-922
- 4) Kamiyama T, Yoshioka N, Sakurai M (2006) J Neurophysiol 95: 2304-2313
- 5) Maeda H, Ohno T, Sakurai M (2007) Neuroscience 150: 829-840
- 6) Barth AL, Malenka RC (2001) Nat Neurosci 4: 235-
- 7) Ge S, Yang C, Hsu K, Ming G, Song H (2007) Neuron 54: 559-566
- 8) Philpot BD, Cho KKA, Bear MF (2007) Neuron 53: 495-502
- 9) Lu HC, Gonzalez E, Crair MC (2001) Neuron 32: 619-6

2. 研究の目的

我々はスライス培養による *in vitro* 皮質脊髄投射系を用いて、発生初期に見られる皮質脊髄路シナプスの腹側からのシナプス除去過程について研究してきた。その中で、本過程が NMDA 依存性で、臨界期 critical period を有することを示し、更に NMDA 受容体サブユニット GluN2B の特異的関与 (2A でなく 2B) とその責任部位が皮質 (pre) ではなく脊髄 (post) であることを明らかにした。本研究では、シナプス除去にかかわる更に下流の分子メカニズムを明らかにするため、まずは 2B の選択的関与が 2A との Ca 流入量の違いによるのか、2B 受容体に直結する下流分子メカニズムの相違によるのかを検討した上で、薬理的スクリーニングにて陽性所見を得た CaMKII の遺伝子改変動物を用いて研究を進める。また、野生型においては臨界期の終了時期と一致して消失する 2B が臨界期終了後も発現し続ける 2A KO マウスを用いて、臨界期の終了が 2B から 2A へのシフトによっているのか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

I. シナプス除去に関わる signaling cascade のより下流の分子を明らかにする

- 1) GluN2B の選択的関与が 2A との Ca 流入量の違いによるのか、下流の分子メカニズムの相

違によるのかを明らかにするため、2Bと2AKOにおけるCa流入量を同レベルに合わせる操作(1もしくは2)を加えた上で、両者の間でシナプス除去に違いが生じるかを確認する。

操作1) 2AKOのNMDA電流を阻害剤を用いて下げる。

操作2) 2BKOのNMDA電流をMg濃度を下げることで上げる。

2) 薬物阻害実験で陽性所見を得ているCaMKIIの関与を確認するため、CaMKII α KIと野生型マウス由来の組織を用いて、皮質か脊髄どちらか一方のスライスをKOにするheterotypic co-cultureを作成し、CaMKII α がシナプス除去過程に必須なのかどうか確認する。

<シナプス除去の評価方法>

手法1) 膜電位感受性色素を用いた光学的記録optical imagingにてシナプス電位の変化をとらえ、その空間分布を観察する

手法2) exo utero electroporation法により大脳皮質深層ニューロンにEYFPを発現させたマウス由来の皮質スライスを作成し、脊髄をKOもしくは野生型にして共培養する。

II. 臨界期の終了が2Bから2Aへのシフトによっていることを明らかにする

1) 臨界期終了後も2Bの発現が続く2A KO由来の脊髄スライスを用いてco-cultureを作成し、臨界期の間培養液中にAPVを添加しておいて臨界期終了後にAPVを除去した場合にシナプス除去が生じるかどうかを観察し、野生型を用いた場合と比較する。

2) 2Bのシナプス膜上への発現を増強させる目的でmGluR5阻害剤(MTEP)もしくはproBDNFを培養液中に添加し、一度閉じた臨界期が再度開くのかどうかを確認する。

<2B発現量増加の評価方法>

手法1) Western blottingによる蛋白定量

手法2) whole cell 記録によるNMDA-EPSCの

2B成分の定量

4. 研究成果

I-1). GluN2Bの選択的関与が2AとのCa流入量の違いだけでは説明出来ないことを、以下の結果から確認し得た

2Bと2AKOにおけるCa流入量を同レベルに合わせて両者のシナプス除去を比較したところ、2A及び2BKO間の解離が明らかでなくなった。

I-2). 本系におけるシナプス除去が、2Bの下流にあると考えられるCaMKII依存性であることを以下の結果から確認し得た

野生型とKI由来の組織を用いて、皮質か脊髄どちらか一方のスライスをKIにするheterotypic co-cultureを作成し、膜電位感受性色素を用いた光学的記録にてシナプスの分布を観察したところ、脊髄側にKIを用いた場合にのみシナプス除去が阻害された。

II. 臨界期の終了が2Bから2Aへのシフト(2Bの減少)によっていることが、以下の結果から強く示唆された

臨界期の間培養液中にAPVを添加しておいて臨界期終了後にAPVを除去したところ、野生型由来の脊髄ではもはやシナプス除去が生じないのに対して、2AKOの場合にはシナプス除去が観察された。

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1件)

1) Takae Ohno, Hitoshi Maeda, Naoyuki Murabe, Tsutomu Kamiyama, Noboru Yoshioka, Masayoshi Mishina, and Masaki Sakurai. Specific involvement of GluR ϵ 2 (NR2B)-containing NMDA receptors in the developmental elimination of corticospinal synapses *Proc Natl Acad Sci USA* (2010), 107:15252-15257.

[学会発表] (計6件)

- ①M. Isowaki, T. Ohno, N. Isoo, N. Murabe, H. Maeda, S. Fukuda, N. Yoshioka, M. Mishina, M. Sakurai
Decline of GluN2B is crucially important for closing the critical period in corticospinal plasticity
Society for Neuroscience 2012, New Orleans Convention Center, 2012年10月14日
- ②大野孝恵、磯脇睦美、磯尾紀子、村部直之、前田仁士、福田諭、三品昌美、桜井正樹
臨界期は操作出来るのか?、第35回日本神経科学大会
名古屋国際会議場、2012年09月18日
- ③T. Ohno, N. Isoo, N. Murabe, H. Maeda, S. Fukuda, N. Yoshioka, M. Mishina, M. Sakurai
Developmental decline of 2B subunit containing NMDA receptor is essential for closing the critical period plasticity window in mouse corticospinal synapse elimination
Society for Neuroscience 2011, Washington DC Convention Center, 2011年11月13日
- ④大野孝恵、磯脇睦美、磯尾紀子、村部直之、前田仁士、福田諭、吉岡昇、三品昌美、桜井正樹
NMDA受容体サブユニットは皮質脊髄路シナプス除去の臨界期終了に必須の役割を果たしている
第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月16日
- ⑤T. Ohno, H. Maeda, N. Murabe, T. Kamiyama, N. Yoshioka, M. Mishina, M. Sakurai.
Differential effect of GluN2B KO vs. GluN2A KO in corticospinal synapse elimination during development
Society for Neuroscience 2010, San Diego Convention Center, 2010年11月14日
- ⑥大野孝恵、前田仁士、村部直之、上山勉、吉岡昇、三品昌美、桜井正樹
発達期皮質脊髄路シナプス除去に対するGluN2B及び2Aノックアウトの影響: Ca²⁺流入量の違いか下流のシグナル伝達メカニズムの違いか?
第33回日本神経科学大会、神戸国際会議場、2010年9月2日

[図書] (計1件)

- ①大野孝恵
皮質脊髄路シナプス除去の分子メカニズム
ブレインサイエンスレビュー2013
2013 発行、クバプロ出版、pp. 27-44

[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

大野 孝恵 (OHNO TAKAE)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号: 60508109

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: