

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14844

研究課題名(和文)可塑的に再編された運動野興奮性・抑制性ネットワークの描出

研究課題名(英文)Remodeling of excitatory and inhibitory networks in the motor cortex

研究代表者

孫 在隣 (Sohn, Jaerin)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特任研究員

研究者番号：40780333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物は学習により環境に適応するが、その際中枢神経系では神経回路の再編成が行われている。大脳皮質運動野は動物の選択した行動を末梢に出力する領域であるが、その神経回路が運動学習によりどのように変化していくのかを形態学的に検証した。その結果、運動学習により運動野の興奮性シナプスの出現・消失はどちらも2倍程度に増え、活発な神経回路再編成が行われていた。さらに、皮質-皮質間連絡と視床-皮質連絡とは異なるシナプス新生動態が観察され、運動学習において皮質-皮質連絡と視床-皮質投射の異なる役割が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の学習における大脳皮質の役割を知るには、学習時に変化するニューロン同士の結合パターンを知る必要がある。本研究により形態学的解析を通じて運動学習中に起こる運動野神経回路の変化を網羅的に調べることが可能になった。光学顕微鏡による入出力の描写や、電子顕微鏡を用いた微細構造解析により、運動学習によるシナプス結合の時間的特異性が明らかとなった。これにより大脳皮質が果たす学習での役割の解明に一步前進することができた。

研究成果の概要(英文)：While motor learning affords novel motor skills to animals, neuronal circuit in the motor cortex is dynamically rearranged. We investigated this network remodeling morphologically, by observation in vivo of spine dynamics on dendrites in the motor cortex combined with characterization of presynaptic axon terminals. We revealed that motor learning enhanced spine dynamics, i.e. spine formation and elimination. In addition, temporal dynamics were different between corticocortical and thalamocortical synapses. Our findings suggest that corticocortical and thalamocortical pathways contribute differently to animal's motor skill acquisition.

研究分野：神経科学

キーワード：運動学習 運動野 シナプス可塑性 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

動物が巧緻な運動を行うには、中枢神経系において最適な運動制御が行われる必要がある。動物はその最適な運動制御を運動学習により獲得するが、その学習過程において中枢神経系では新しいニューロンのネットワークが再編される。第一次運動野 (primary motor cortex, M1) は大脳皮質からの最終的な運動指令の出力を担う領域であるが、運動学習は M1 においても神経回路の再編を引き起こすことが先行研究により示唆されている。しかしながら、どういった神経回路が新たに出現したのかについては現段階において不明である。

大脳皮質錐体細胞の樹状突起には無数の棘突起 (スパイン) と呼ばれる微小構造が存在し、主に興奮性のシナプス入力部位であることが知られている。スパインの可塑的形態変化 (出現・膨化・縮小・消失) はニューロン同士の結合変化を示唆する所見であり、細胞レベルでの学習・記憶の機序とされる。動物がある運動課題を学習する過程において、M1 の第 5 層錐体細胞 (L5Pyr) の apical dendrite で新たに出現するスパインへの入出力関係を知ることにより、運動学習に伴い再編された神経回路が紐解かれ、巧緻運動を行うための運動野神経回路が特定されることになると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、運動学習に伴い新生するスパインに、どのような由来からシナプス入力するのかについて同定し、運動学習における運動野での神経回路リモデリングの全容を読み解くことを目的とした。これまで運動学習に伴って出現したスパインを取り巻く神経回路が特定されてこなかったのは、2 光子励起顕微鏡による空間解像度の限界が一つの理由として挙げられる。2 光子励起顕微鏡観察で用いた脳をさらに薄切標本とし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した蛍光画像をさらに deconvolution 処理する方法により、高い空間分解能を実現することができると考えた。また、各シナプス前終末を網羅的に解析するためには、いくつものシナプス前・後マーカーを可視化する必要がある。薄切脳組織標本を作成することで、免疫組織化学が可能となり、少なくとも 4 つの異なる蛋白質・ペプチドの位置関係を同時に取得できる。このアプローチは、これまで困難であった神経回路網の可塑的变化を包括的に描出することを可能にした。

それらを踏まえ、本研究助成期間では、運動学習に伴って新生したスパインとその周辺の樹状突起・軸索の電子顕微鏡による微細構造解析から皮質由来・視床由来とで区別し、さらにそれら入力源の運動学習における役割をより細かく調べた。

3. 研究の方法

L5Pyr に蛍光蛋白質 (GFP) を発現する Thy1-eGFP-M 系統マウスに対し、前肢を用いた運動課題を与え、その学習を成功率の推移として評価した。同時に、M1 直上に頭蓋窓を設置し、GFP で標識された樹状突起 (脳表から 40 μm 深までに存在する apical tuft) を 2 光子顕微鏡で観察することで、スパイン動態を評価した。さらに、そのマウスを灌流固定し、薄切脳標本を作成した。その脳標本は 2 種類の処理を行なった。

(1) ATUM-SEM 法による電子顕微鏡 3 次元微細構造解析

1% glutaraldehyde + 4% paraformaldehyde + 0.2% picric acid による固定を行った後、脳表面をスライス (100 μm 厚程度) した。光学・電子顕微鏡相関解析のため、はじめに DAPI (細胞核染色) とトマトレクチン (血管壁染色) による染色後、共焦点顕微鏡による撮影を行なった。2 光子顕微鏡で生体観察した樹状突起の電顕画像上での位置特定のため、それら細胞核や血管をランドマークとした。その後、1.5% potassium ferrocyanide や 2% osmium tetroxide などにより電子顕微鏡観察用に組織処理し、automated tape collecting ultramicrotome (ATUM) による超薄切切片作成・回収を行なった。これを走査型電子顕微鏡 (SEM) 上で確認することで、細胞核や血管壁の位置関係から目的の樹状突起を同定し、それを電子顕微鏡連続画像解析ソフト (VAST Lite) で 3 次元再構築した。さらに、その新生シナプスを形成するスパイン・軸索終末の微細構造を解析した。

(2) Post hoc 免疫組織化学と共焦点顕微鏡観察

4% paraformaldehyde + 0.2% picric acid による固定を行った後、30 μm 厚に薄切標本を作成した。その脳標本を用い、GFP、vesicular glutamate transporter (VGluT)、Homer1 に対する免疫組織化学を行なった。2 光子顕微鏡で観察した樹状突起を同定し、その樹状突起スパインに入力するシナプス入力を皮質由来・視床由来と区別することが可能となった。共焦点顕微鏡による撮像を行なった後、deconvolution 処理を行い、微細構造観察を行なった。さらにその同定されたシナプス入力源を chemogenetics を用いて活動制御し、運動学習やスパイン動態の評価を行なった。

4. 研究成果

(1) ATUM-SEM 法による電子顕微鏡 3 次元微細構造解析

8 日間のトレーニング中に出現した新生スパインとそれに入力するシナプス前終末を解析した。出現してから 8 日以内である新生スパイン (new spine) と、8 日以上経過した安定スパイン (stable spine) とでは、 $0.054 \pm 0.03 \mu\text{m}^3$ (mean \pm SD, new spine, $n = 11$) vs. $0.144 \pm 0.09 \mu\text{m}^3$ (stable spine, $n = 57$) と大きく異なっており、そこに入力する軸索終末様構造 (bouton) の大きさもそれに正の相関を示すものであった ($0.089 \pm 0.09 \mu\text{m}^3$, new bouton; $0.291 \pm 0.20 \mu\text{m}^3$, stable bouton) 。これは新生シナプスは非常に幼若であることを示す所見であった。一方で、出現してから 4 日以内のスパイン (nascent spine) と 4~8 日経過したスパイン (persistent spine) とで比較してもそれらに有意な差はみられなかった。

さらに新生スパインに入力する軸索が、その近傍のスパインに入力するかどうかについても検証した。結果、それら 11 個の新生スパインのうち、同一樹状突起にシナプスをもう一つ形成するもの (= clustering) は見当たらなかった。これまで、新生スパインは近接するスパインと clustering を形成すると考えられてきたが、電子顕微鏡での観察がなされてきておらず、その証拠がなかった。本研究はその仮説を否定する根拠の一つとなるものであった。

(2) Post hoc 免疫組織化学と共焦点顕微鏡観察

新生スパインへの入力源を、VGluT1 (皮質軸索) と VGluT2 (視床軸索) とで弁別して検証したところ、新生スパインへの入力は多くが VGluT1 陽性軸索からのものであることが判明した。これは、運動学習中に起こるシナプスの可塑的变化は皮質-皮質間連絡が主であり、運動野での学習はこの皮質-皮質間連絡が多く形成されることが重要であることが示唆される所見であった。

実際に、この皮質-皮質間連絡を遮断する実験をおこなった。M1 へ投射する第 2 次運動野 (M2) 細胞に hM4D(Gi) を発現させ、clozapine N-oxide (CNO) を腹腔内注射にて全身投与を行うと、M1 に投射する M2 細胞を選択的に抑制することができる。この M2 細胞抑制下に運動学習を行わせたところ、hM4D(Gi) を発現させないで CNO のみを投与するコントロール群と比較して有意に学習が阻害されることがわかった。同時にこの抑制下でスパイン動態の観察も行ったところ、M1 でのスパイン新生がコントロールと比較して有意に少ないこともわかった。さらに、CNO を直接 M1 に投与する M2 M1 経路選択的な抑制を行なっても、同様の結果が得られた。以上のことから、皮質-皮質間連絡を抑制することで新生スパインの形成が阻害され、さらに運動学習も遅滞することが裏付けられた。

これらの結果から、運動学習時における運動野で神経回路リモデリングの動態を描写することができた。この結果は現在投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueta Yoshifumi, Sohn Jaerin, Agahari Fransiscus Adrian, Im Sanghun, Hirai Yasuharu, Miyata Mariko, Kawaguchi Yasuo	4. 巻 122
2. 論文標題 Ipsi- and contralateral corticocortical projection-dependent subcircuits in layer 2 of the rat frontal cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1461 ~ 1472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00333.2019	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 Hioki Hiroyuki, Sohn Jaerin, Nakamura Hisashi, Okamoto Shinichiro, Hwang Jungwon, Ishida Yoko, Takahashi Megumu, Kameda Hiroshi	4. 巻 1695
2. 論文標題 Preferential inputs from cholecystokinin-positive neurons to the somatic compartment of parvalbumin-expressing neurons in the mouse primary somatosensory cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 18 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.05.029	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 Kubota Yoshiyuki, Sohn Jaerin, Kawaguchi Yasuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Large Volume Electron Microscopy and Neural Microcircuit Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2018.00098	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 Okamoto Shinichiro, Sohn Jaerin, Tanaka Takuma, Takahashi Megumu, Ishida Yoko, Yamauchi Kenta, Koike Masato, Fujiyama Fumino, Hioki Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Overlapping Projections of Neighboring Direct and Indirect Pathway Neostriatal Neurons to Globus Pallidus External Segment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101409 ~ 101409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101409	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 Okamoto Shinichiro, Yamauchi Kenta, Sohn Jaerin, Takahashi Megumu, Ishida Yoko, Furuta Takahiro, Koike Masato, Fujiyama Fumino, Hioki Hiroyuki	4. 巻 2
2. 論文標題 Exclusive labeling of direct and indirect pathway neurons in the mouse neostriatum by an adeno-associated virus vector with Cre/lox system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100230 ~ 100230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2020.100230	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kuramoto E, Kawaguchi Y.
2. 発表標題 Thalamo-cortical synaptic network in motor cortex analyzed with large volume electron microscopy.
3. 学会等名 2019 Gordon Research Conference, Dendrites: Molecules, Structure and Function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sohn J, Kubota Y, Kawaguchi Y.
2. 発表標題 Corticocortical and thalamocortical remodeling in the cortical microcircuit during motor learning.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sohn J, Kubota Y, Kawaguchi Y.
2. 発表標題 Circuit remodeling in the motor cortex during motor learning.
3. 学会等名 49th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kuramoto E, Kawaguchi Y.
2. 発表標題 Thalamo-cortical synaptic network in motor cortex analyzed with large volume electron microscopy.
3. 学会等名 49th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sohn J, Kubota Y, Kawaguchi Y.
2. 発表標題 Network plastic changes in the primary motor cortex as the basis of a new motor skill acquisition.
3. 学会等名 The 9th Okazaki-Tuebingen-Beijing Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kuramoto E, Kawaguchi Y.
2. 発表標題 Thalamo-cortical synaptic network in motor cortex analyzed with large volume electron microscopy.
3. 学会等名 The Eighth International Neural Microcircuit Conference-Synaptic Specificity to Circuit Dynamics- (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sohn J, Youssef M, Hatada S, Kawaguchi Y, Kubota Y.
2. 発表標題 Input-dependent spine dynamics in motor cortex during motor learning.
3. 学会等名 The Eighth International Neural Microcircuit Conference-Synaptic Specificity to Circuit Dynamics- (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kuramoto E, Kawaguchi Y.
2. 発表標題 Thalamo-cortical synaptic network in motor cortex analyzed with large volume electron microscopy.
3. 学会等名 ABiS Symposium Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Suzuki M, Hatada S, Youssef M, Larkum ME, Kawaguchi Y.
2. 発表標題 Network plastic changes in the primary motor cortex as the basis of a new motor skill acquisition.
3. 学会等名 2020 Gordon Research Conference, Thalamocortical Interactions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 孫在隣、窪田芳之、川口泰雄
2. 発表標題 皮質-皮質間連絡・視床-皮質投射の入力依存的な運動学習時回路動態
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kawaguchi Y
2. 発表標題 A carbon nanotube tape for serial-section electron microscopy of brain ultrastructure
3. 学会等名 第8回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kuramoto E, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Thalamo-cortical target analysis in cortical motor cortex using large volume electron microscopy
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kubota Y, Sohn J, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Large volume electron microscopy and neural microcircuit analysis
3. 学会等名 9th FAOPS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 孫 在隣, Mohammed Youssef, 川口 泰雄, 窪田 芳之
2. 発表標題 皮質-皮質間連絡・視床-皮質投射の入力依存的な運動学習時回路動態
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 窪田 芳之, 孫 在隣, 倉本 恵梨子, ヨーゼフ モハメド, 日置 寛之, 川口 泰雄
2. 発表標題 大容量電顕データセットを使った視床-大脳皮質神経終末のシナプスターゲット解析
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 孫 在隣, 川口 泰雄, 窪田 芳之
2. 発表標題 運動学習時の皮質-皮質間連絡・視床-皮質投射の神経回路再編成
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2021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

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		
ドイツ	Charite Universitätsmedizin Berlin	Humboldt University of Berlin	