

平成22年6月1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20800047

研究課題名（和文）発達期皮質脊髄路シナプスの活動依存的除去と NMDA 受容体サブタイプ

研究課題名（英文）Activity-dependent elimination of corticospinal synapses and NMDA receptor subtype

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）：

in vitro 皮質脊髄投射系に GluN2B( $\epsilon$ 2)及び 2A( $\epsilon$ 1)ノックアウトマウス( $grin2b^{-/-}$ ,  $2a^{-/-}$ )を導入し、発生初期に見られる脊髄腹側からのシナプス除去過程が、2B 特異的かつ脊髄側の 2B に依存している事を明らかにし得た。その後シナプス除去の分子メカニズムを明らかにするために進めている薬理的スクリーニング(阻害実験)で、上記過程が 2B の下流にあると考えられる CaMKII 依存性であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

By using both GluN2B( $\epsilon$ 2)and 2A( $\epsilon$ 1) knockout mice for the in vitro corticospinal projection system, we concluded that that GluN2B in the spinal cord is selectively involved in the CS synapse elimination. We also found that this elimination process is CaMKII-dependent by pharmacological screening

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,090,000 | 327,000 | 1,417,000 |
| 2009年度 | 960,000   | 288,000 | 1,248,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,050,000 | 615,000 | 2,665,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：(1) corticospinal synapse (2) knockout mice (3) GluN2B (GluR $\epsilon$ 2/NR2B) (4) GluN2A (GluR $\epsilon$ 1/NR2A) (5) heterotypic co-culture (6) exo utero electroporation

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。我々の研究室で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、薬物実験及び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 NR2B 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、これを実現した上で、NR2B KO マウスを用いて研究を続けている。

NMDA 受容体は NR1 と NR2 の 2 つのサブユニットによって構成されており、NR2 の主要なサブユニットに NR2A と 2B とがある。脊髄では NR1-NR2B 型は発達初期に多く、カルシウムの流入量が NR1-NR2A 型に比べ多いことから発達期の可塑性に関与していることが示唆されているが、近年 2A と 2B ではカルシウムの流入量の違いだけでなく、それに続くシグナリングメカニズムの違いがあることが明らかになってきた。また 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、NR2B 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、NR2A 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、世界的な論争の的となっており、本研究はこれらの論争

に一石を投じることが出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

今までに、*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 受容体依存性で、臨界期 critical period を有することが示され、更に NMDA 受容体サブユニット GluR2 (NR2B) 依存性であることが薬物実験より示唆された。本研究では、NR2B 及び 2A ノックアウトマウス (KO) を導入することで、発達期におけるシナプス可塑性 (シナプス除去) に対する NR2B の特異的関与 (2A でなく 2B) を確認し、その責任部位が皮質側なのか脊髄側なのか両方なのかを明らかにしていく。また、シナプス除去にかかわる分子メカニズムの解明に向けて、薬理学的スクリーニング (阻害実験) を行う。

## 3. 研究の方法

(1) まず初めに、発達早期のシナプス除去過程が NR2B 依存性であることを確認し、その責任部位が皮質側なのか脊髄側なのか両方なのかを明らかにするため、NR2B KO と野生型マウス由来の組織を用いて共培養を行い、電気生理学的手法、光学的手法、組織学的手法、および蛍光標識した軸索のライブ観察を用いて評価する (後述の手法 1-4 参照)。次に、NR2A にも依存しているのか否かを明らかにするため、NR2A KO 由来のスライス実験を NR2B KO と同様の方法で行う。

手法 1) 皮質深層を電気刺激し脊髄灰白質よりフィールドシナプス後電位 (field EPSP) を記録し、その空間分布を確認する。

手法 2) 膜電位感受性色素を用いた光学的記録にてシナプス電位の変化をとらえ、シナプスの空間分布を確認する。

手法 3) バイオサイチンを用いて皮質脊髄投射繊維を順行性標識し、軸索終末の分布を確認する。

手法 4) *Exo utero electroporation* にて作製した皮質ニューロンが蛍光を発するマウス由来の皮質スライスを用いることにより、皮質脊髄投射線維の軸索終末の動向を生きたままで追跡する。

(2) 次に、シナプス除去に関わる signaling cascade 下流の分子を明らかにする。

① 手はじめに、以下の阻害剤を用いて、シナプス除去に対する阻害効果を、手法 1 の field EPSP にてスクリーニングを行う。

Protein kinase A 阻害剤 (H-89, KT-5720),

Protein kinase C 阻害剤 (chelerythrine),

MAP kinase 阻害剤 (U-0120, PD-98059),

CaM kinase II 阻害剤 (KT-62),

Calcineurin 阻害剤 (FK-507),

Phospholipase C 阻害剤 (U-73122),

NO synthase 阻害剤 (L-NAME)

② 阻害効果のあった阻害剤について、手法 2 にてシナプスの空間分布を調べる。

#### 4. 研究成果

発生初期に見られる脊髄腹側からのシナプス除去過程が、2B 特異的であつ脊髄側の 2B に依存している事を明らかにし、論文化した。また、上記過程が 2B の下流にあると考えられる CaMKII 依存性であることが示唆され、kinase としての機能のみ失った CaMKII  $\alpha$  KI を、山肩葉子先生(生理学研究所)より分与いただき、共同研究を進める計画が決定した。

#### 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 $\epsilon$ 2

(NR2B)-containing NMDA receptors in the developmental elimination of corticospinal synapses.

Proc Natl Acad Sci USA 2010 in press

査読有

[学会発表] (計 3 件)

(1) Society for Neuroscience 2009 : GluR  $\epsilon$  2 (NR2B)-containing NMDA receptors are specifically involved in the corticospinal synapse elimination during development ; T Ohno, H Maeda, N Murabe, T Kamiyama, N Yoshioka, M Mishina, M Sakurai  
Chicago Convention Center  
(2009年10月20日)

(2) 第 3 2 回日本神経科学大会 :  
皮質脊髄路シナプス除去に対する GluR  $\epsilon$  2 (NR2B) の選択的関与 ;  
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  
名古屋国際会議場  
(2009年9月16日)

(3) 第 49 回日本神経学会総会 :  
マウス皮質脊髄シナプスの GluR  $\epsilon$  2 (2B) 依存的発達 ;  
大野孝恵、前田仁士、吉岡昇、三品昌美、桜井正樹  
パシフィコ横浜  
(2008 年 5 月 16 日)

[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

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