

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11168

研究課題名（和文）運動学習における特異的GABAシナプス脱抑制のメカニズムとその意義

研究課題名（英文）Mechanisms and significance of GABAergic synaptic disinhibition in motor learning

研究代表者

木田 裕之（Kida, Hiroyuki）

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70432739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：脳における活動依存的な可塑性は学習の神経基盤であり、一次運動野(M1)では運動におけるスキル学習にも関与している。本研究ではV層のシナプス可塑性のメカニズムを明らかにするために、電気生理学実験、多光子顕微鏡による形態観察、またマイクロダイアリシスによるアセチルコリン分泌の定量評価を行った。運動学習後には抑制性シナプス電流の発火頻度が減少する脱抑制とともに、運動直後からスパインヘッドの増大が観察された。さらにアセチルコリンと運動スコアとの有意な相関が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AChによる興奮性活動の上昇はM1ニューロンのスパイン可塑性を含めた神経可塑性を誘発するトリガーとなると考えられる。本研究により、M1のV層における細胞特異的なシナプス可塑性様式および、アセチルコリンの役割が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Activity-dependent plasticity in the brain is the neural basis of learning and is also involved in skill learning in the primary motor cortex (M1). To elucidate the mechanism of synaptic plasticity in layer V, we conducted electrophysiological experiments, spine observations using two photon microscopy, and quantitative evaluation of acetylcholine secretion using microdialysis. An increase in spine head was observed immediately after motor learning, along with disinhibition that decreased the frequency of miniature inhibitory postsynaptic currents. Furthermore, a significant correlation between acetylcholine and motor scores was observed.

研究分野：神経科学

キーワード：運動学習 GABA スパイン

1. 研究開始当初の背景

一次運動野 (M1) は随意運動の起点となる領域で、体部位局在地図を形成し運動制御に関与する。M1 ニューロンは運動方向や運動強度に選択性を示すことが知られており、細胞単位で運動の脳内表現を行っていると考えられる。明瞭な VI 層構造の観察されない M1 において、運動情報は専ら II/III 層より V 層へと伝達される。主な出力層は V 層で、少なくとも錐体路を經由して皮質脊髄路を形成するものと (5B 層局限)、線条体および他の皮質へ投射するもの (5A/B 層) とに区別される。

脳における活動依存的な可塑性は学習の神経基盤であり、M1 では運動におけるスキル学習にも関与している。M1 の II/III 層では、運動課題後には浅層における水平結合を介した LTP の誘導や樹状突起におけるスパイン形態の再モデリングが起こる。さらに最近では学習段階に応じて興奮性・抑制性シナプス両面でのシナプス強化が起こることが分かってきた。これらの知見は、運動トレーニング依存的な神経可塑性を示唆し、運動学習の背景になっていると考えられる。

近年の研究では 2 光子顕微鏡を用いた生体ライブイメージングによるスパインのダイナミクスが報告されている。しかしながら、スパインへの入力シナプス前細胞の特性を反映していると考えられるため、シナプス前終末のソースを明らかにすることが必要である。そこで本研究では 2 光子顕微鏡による観察後、ポストホック免疫染色により入力経路依存的なシナプス可塑性の様式を明らかにしようと試みた。

2. 研究の目的

このように M1 における可塑性の様式は徐々に明らかになってきているものの、主な出力層である V 層でのシナプス可塑性はまだ分からないことが多い。そこで本研究では、出力先の異なる V 層細胞を標識し、パッチクランプ法によりニューロン活動を記録し、AMPA 受容体および GABA 受容体を介した運動トレーニングによるシナプス可塑性メカニズムの解明を目的として実験を行った。2 光子顕微鏡を用いた形態観察を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物

全ての実験は山口大学動物使用委員会の承認を受け、動物実験ガイドラインに基づいて実施された。実験には 4 週齢 SD 系 (Sprague Dawley) 雄性ラット (体重 120 ~ 160g, 千代田開発) を用いた (n = 55)。飼育ケージ (40 × 25 × 25 cm) 内では食餌および水を自由に摂取させ、一定気温 (25°C) のもと 12 時間の明暗サイクル下で飼育した。

(2) 運動学習課題

運動学習の効果を評価するために、ローターロッドテスト (ENV577, Med Associates Inc.) を用いた。運動試験は 1 日 9-10 試行とし、最長で 2 日連続行った (図 1A)。試行ごとのインターバルは 30 秒とした。加速モード (4-40 rpm) で 1 試行あたりの運動時間は最大 5 分間とした。

(3) 電気生理学実験

運動直後 (30 分後)、急性脳スライスを作製するために深麻酔を行った。動物を断頭後、脳を素早く取り出して混合ガス (5% CO₂/95% O₂) を飽和させた氷冷ダイセクションバッファー (25.0 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM KCl, 0.5 mM CaCl₂, 7.0 mM MgCl₂, 25.0 mM glucose, 110.0 mM choline chloride, 11.6 mM ascorbic acid) 内に浸した。ビブラトームを用い (Leica vibratome, VT-1200)、厚さ 350 μm 脳の冠状断を作製し、混合ガスで飽和させた人工脳脊髄液 (22-25°C, 118 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, 4 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂, pH7.4) で満たしたインターフェイスチャンバー内に移した。ノマルスキー微分干渉装置を備えた正立顕微鏡 (倍率 600 倍, Olympus BX51) に装着した、赤外線高感度カメラ (C2741-79, Hamamatsu Photonics) を通して脳スライス標本を観察し、大脳皮質一次運動野の V 層の細胞からホールセル・パッチクランプ記録を行った。ガラス管微小電極 (GD-1.5,

Narishige, JAPAN) はプラー (P-97, Sutter Instruments) を用い加熱, 牽引して作製した。電極内部は実験に応じた細胞内液で充填し, 抵抗は 4-7 M Ω のものを用いた。記録中のチャンバーの温度は 22 から 25°C に保った。電流・電圧は細胞内記録用増幅器 (Axoclamp 1D, Axon Instruments) にて増幅し, A-D コンバータ (Digidata 1440A, Axon Instruments) でデジタル化した後, ハードディスクに取り込んだ (Clampex 10, Axon Instruments)。

活動電位の発生を抑え、シナプス前終末から自発的に放出される 1 シナプス小胞あたりのグルタミン酸放出による AMPA 受容体由来の微小興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC; mEPSC) を記録するため、電位依存性 Na チャネル選択的阻害剤であるテトロドトキシン (TTX, Wako, 0.5 μ M) および NMDA 受容体選択的阻害剤 APV (Sigma, 100 μ M) を ACSF に加え、自発的な活動電位と NMDA 受容体由来の興奮性電流を阻害した。電位は -60mV に固定し、記録時間は 5 分間とした。同様のプロトコールで電位を +15 mV に固定し、微小抑制性シナプス後電流 (miniature IPSC; mIPSC) を記録した。いずれも 10 pA 以上の EPSC/IPSC を解析対象データとし、平均振幅と 5 分間における頻度を調べた。記録後には AMPA 受容体の選択的拮抗薬 CNQX (Sigma, 10 μ M) 又は、GABAA 受容体の選択的拮抗薬ピククリン (Sigma, 10 μ M) を還流液中に投与し、mEPSC、mIPSC がそれぞれ全て消失することを確認した。

(4) 多光子顕微鏡実験

8-10 週齢の YFP マウスを用い、頭蓋骨と硬膜の間にカバーガラスを挿入した。オープンスケル法を用い、多光子顕微鏡 (Nikon, A1 MP +/A1R MP +) にて運動直後 30 分後の一次運動野の軸索を観察した。運動は 2 日連続行い、30 分後に撮影を行った。頭部金属プレートの固定には脳固定装置 (小原医科産業) を使用した。対物レンズは水浸 25 倍レンズ (CFI75 アポクロマート 25XC W, NA1.10) を使用し、一次運動野 (AP 1.2 mm, L 1.2mm) をターゲットとした。血管の位置をランドマークとして、同じ位置を記録できるようにした (図 1)。

励起レーザー波長は 960 nm とし、画像サイズ 1024 でおおまかな位置合わせをして (解像度 0.50 μ m/Pixel)、2 倍ズーム、画像サイズ 2048 で撮影した (解像度 0.12 μ m/Pixel)。レーザー強度は 10-12 程度とし、スキャンスピードは 0.125 flames/sec とした。撮影対象は深さ 100 μ m 程度の運動野 I 層の樹状突起として、0.7 μ m ステップで撮影した。

(5) 運動によって分泌される GABA, アセチルコリンの評価

運動直後の脳内の GABA 濃度の減少を検出するために、マイクロダイアリシを行う。脳定位固定装置を用いて M1 にガイドカニューラ (Eicom Co. 外径 0.52 mm) を植え込み、頭蓋骨に固定する。先行研究 (Takase et al., 2013) に従って実験を行い、運動学習と脳内 GABA 量との関連を明らかにする。また、我々の研究室ではアセチルコリンが海馬学習を強化すること (Mitsushima et al., 2013) を報告しており、同様に運動によって分泌されるアセチルコリンの量を定量化した。

4. 研究成果

加速モード (4~40 rpm) を使ってローターロッドによる運動トレーニングを 1 日 10 試行、2 日間連続で行った。回転棒上の平均滞在時間を図 1 に表す。1 回目の試行では 79.7 ± 15.1 秒、最後のトライアルでは 170.1 ± 25.5 秒で回数を経るごとに回転棒上の滞在時間は延長が見られた。2 日目の試行後には 244.2 ± 21.2 秒で運動スコアはプラトーになった。テストした動物全てにおいて (N = 35)、滞在時間の延長が見られた。

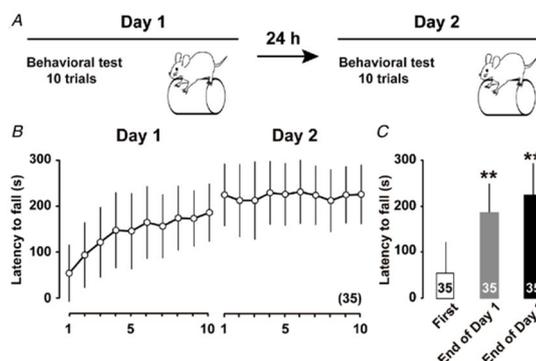


図 1

次にシナプス前細胞側の可塑性とシナプス後細胞側を細胞ごとに網羅的に解析するため、0.5 μ M の TTX 存在下で、-60 mV に膜電位を固定して 1 シナプス小胞あたりの微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を 5 分間記録した (図 2A)。コントロール群 (n = 60) では頻度 27.6 ± 10.5 回/5 分、振幅 11.9 ± 0.4 pA であつたのに対し、運動 1 日目 (n=59) では頻度 29.0 ± 7.1 回/5 分、振幅 12.1 ± 0.4 pA で有意差はなく、運動トレーニング 2 日群 (n=60) では頻度 86.1 ± 40.0 回/5 分、振幅 16.0 ± 1.1 pA で頻度・振幅ともに有意な増加が観察された (ANOVA, $P < 0.05$, Fisher's test, $P < 0.05$, 図 2B, 図 2C)。さらに、膜電位を +15 mV に固定して、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を同一細胞から記録したところ (図 2A)、1 日目では頻度のみが低下したが (ANOVA, $P < 0.05$, Fisher's test, $P < 0.05$, 図 2B)、2 日目では頻度、振幅ともに有意差は観察されなかった。

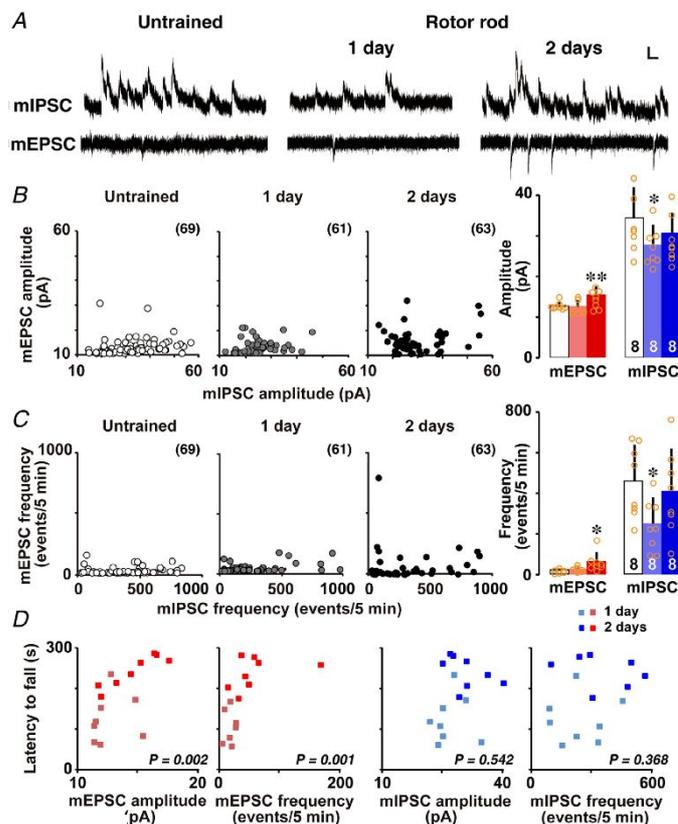


図 2

スパイン観察に関しては個々のスパインを見てみると、学習前後で面積が増えたものと減ったもの、新たに生成されたものと消失したものと様々であった。運動学習によりスパインヘッド体積は有意に増加し、平均すると連続 2 日間増加し続けた (非学習, 1.000 ± 0.0077 ; 1 日トレーニング群, 1.44 ± 0.012 ; 2 日トレーニング群, 1.82 ± 0.013 ; $F(2,444) = 14.0$; $P < 0.01$, one-way factorial ANOVA)。スパイン数は運動直後より有意に増加する一方で、減少するものも観察された (非学習, 1.000 ± 0.0052 ; 1 日トレーニング群, 1.093 ± 0.0051 ; 2 日トレーニング群, 1.044 ± 0.0051 ; $F(2,509) = 3.00$; $P = 0.42$, one-way factorial ANOVA, 図 3)。

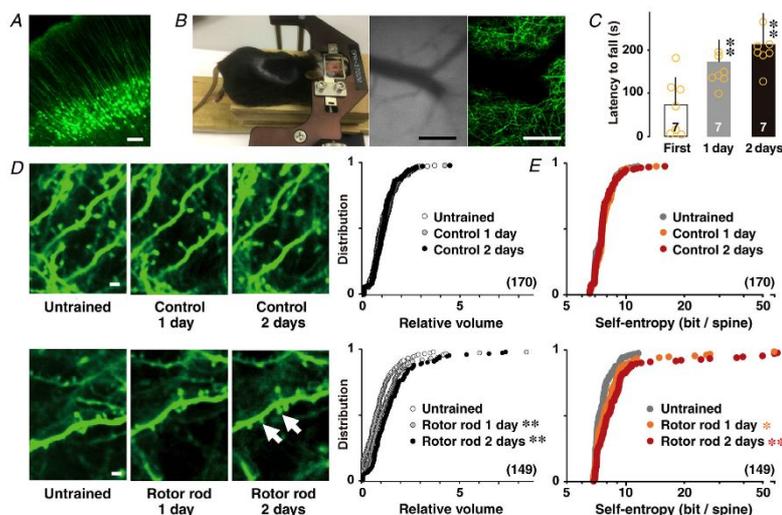


図 3

運動前 1 時間、運動中 (45 分間)、運動後 2 時間のフェーズに分けて 25 μ l あたりの ACh 量を定量化した。学習前と比べて、学習 1 日目より ACh 分泌量の有意な増加が観察された。またこの増加は運動後も 1 時間程度持続した (one-way repeated measures ANOVA, $F(4,34) = 8.13$; $P = 0.0003$, 図 4)。次に翌日の運動 2 日目でも同様の実験を行ったところ、運動前と比較して増加はするものの変化量としては学習初期と比べて緩やかなものであった (one-way repeated measures ANOVA, $F(4,34) = 8.29$; $P = 0.0002$, 図 4)。ACh と学習スコアとの関係を調べるために、各セッション (15 分間) の平均運動スコアと ACh 量の関係をプロットした。運動 1 日目は両者に有意な相関が観察された ($R = 0.40$, $P = 0.04$)。一方で、2 日目は有意な相関は観察されなかった ($R = 0.07$, $P = 0.72$, 図 4)。

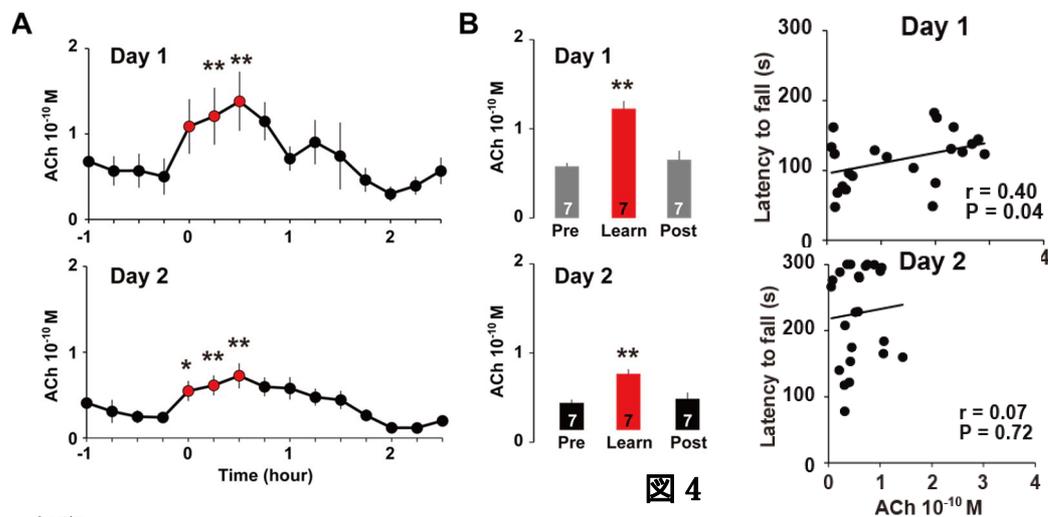


図 4

考察

本実験の結果、mIPSC の頻度は運動トレーニング 1 日目で有意に減少した。mIPSC は頻度のみが減少したため、プレシナプス側からの GABA 放出の低下、あるいは GABA の取り込み促進の可能性が挙げられる。詳細なメカニズムは不明だが、この結果は運動学習直後の GABA 濃度低下は磁気共鳴を用いたヒトの実験の結果と一致する。二光子顕微鏡を用いた Live imaging 実験でも、運動トレーニング後に運動野ニューロンの apical dendrite に投射するソマトスタチン陽性 GABA ニューロン由来のシナプスプットの減少が知られており、やはり運動学習には GABA 性入力の減少が必要であると考えられる。運動トレーニングによって、まず内因性の GABA 放出量が自発的に減少し、この脱抑制により神経活動が急性的に活性化され、最終的に V 層錐体細胞の興奮性シナプスが強化されたと考えられる。

運動学習によってスパインの体積・数も有意に増加することが分かった。これは、スパインの体積・数が増加することで (その表面にある AMPA 受容体も増え) シナプス可塑性が強化された結果、運動スコアが増加したということを示唆していると考えられる。これまでの研究から本研究と同じ運動トレーニング(ローターロードテスト)を 2 日間行うことによって、スパインが増加することが報告されている。本研究では運動直後にスパインが増加したことに関しては、かなり短期間での変化のため、タンパク質合成等は考えにくい。恐らくスパインを形成しているアクチン細胞骨格の神経活動依存的な集積等による肥大と考えられるが詳しいメカニズムは分からない。運動直後にスパインが減少したことに関しては、使わない神経回路が脱落することで運動の最適化がなされた結果であると考えられる。

また 2 日間にわたる運動トレーニングによって ACh の分泌が上昇した。これまでの研究では、運動中に ACh の分泌が増加するという報告はあるものの(Kurosawa et al., 1993; Westerink, 1995)、強制的な運動や自発活動によるもので、ローターロード試験中の ACh 分泌の定量化は報告されていない。本実験では ACh 分泌は運動前と比べて、トレーニング 1 日目、2 日目とも上昇したが、学習初期であると考えられる 1 日目の方が ACh 分泌量は多く、運動スコアと高い相関を示したことから単純に運動量に依存したものではないと考えられる。また、運動学習中の V 層ニューロンでは、運動トレーニング直後から微小シナプス後電流(mIPSC)の頻度は有意に減少し、形態学的にも apical dendrite に投射するソマトスタチン(SOM)陽性細胞のからの抑制性入力が増加(脱抑制)することが知られている。近年の報告から、ACh は SOM 細胞活動を選択的抑制する VIP 細胞を活動させる役割があり、ACh による興奮性活動の上昇は M1 ニューロンのスパイン可塑性を含めた神経可塑性を誘発するトリガーとなると考えられる。

結語

本研究において一次運動野 V 層では、細胞特異的なシナプス可塑性様式および、アセチルコリンの役割が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kida H, Kawakami R, Sakai K, Otaku H, Imamura K, Han-Thiri-Zin, Sakimoto Y, Mitsushima D.	4. 巻 601(2)
2. 論文標題 Motor training promotes both synaptic and intrinsic plasticity of layer V pyramidal neurons in the primary motor cortex.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 335-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP283755.	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 Sakimoto Y, Matsumoto A, Yoshiura D, Goshima M, Kida H, Mitsushima D.	4. 巻 12
2. 論文標題 A critical period for learning and plastic changes at hippocampal CA1 synapses.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7199-7199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10453-z	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木田 裕之
2. 発表標題 一次運動野におけるスキル学習の神経基盤
3. 学会等名 第128回山口大学医学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木田 裕之, 川上 良介, 崎本 裕也, 美津島 大
2. 発表標題 運動学習におけるV層細胞のシナプス可塑性
3. 学会等名 第100回 日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木田裕之
2. 発表標題 運動トレーニングによる一次運動野V層ニューロンのシナプス可塑性
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木田裕之
2. 発表標題 Dynamics of synaptic plasticity and acetylcholine secretion in layer V neurons of primary motor cortex by motor learning
3. 学会等名 第101回 日本生理学会
4. 発表年 2024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