

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860152

研究課題名(和文) 口腔顔面運動神経細胞に入力するコリン作動性C-terminalネットワークの解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of circuitry of cholinergic C-terminal inputs to oro-facial motor neurons

研究代表者

松井 利康 (MATSUI, Toshiyasu)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・助教)

研究者番号：90531343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔顔面筋を支配する運動ニューロンには、大型のコリン作動性神経終末C-terminalが接しており、運動ニューロンの興奮性調節に機能する。本研究では、まず口腔顔面筋の運動ニューロンに対してC-terminalを投射するニューロン(C-terminal起始細胞)の分布領域を、神経トレーシング法により同定した。次に、単一細胞レベルでコリン作動性ニューロンを可視化するためのウイルスベクターを作製し、脊髄におけるC-terminal起始細胞の形態学的特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Large cholinergic synaptic boutons, named C-terminals, contact motor neurons innervating oro-facial muscles and regulate their excitability. In the present study, we first determined the distribution of cholinergic interneurons that gave rise to C-terminals in oro-facial motor nuclei, using neuronal tracing techniques. Next, we produced viral vectors for the tracer to visualize cholinergic neurons in a single-cell level, and examined morphological characteristics of cholinergic interneurons that are origins of C-terminals in the spinal cord.

研究分野：組織形態学, 神経解剖学

キーワード：運動ニューロン 脳幹網様体 コリン作動性ニューロン 脳神経運動核 神経トレーサー

1. 研究開始当初の背景

骨格筋を支配するα運動ニューロンの細胞体ならびに近位樹状突起には、他の神経終末と比較して3-7μmと大型のコリン作動性終末が接している。この終末は、運動ニューロンにおけるシナプス後膜の直下に筋小胞体に類似した構造（シナプス下槽 subsurface cistern）を有しており、C-terminal と呼ばれる。C-terminal は脊髄の前角運動核に加えて、脳神経運動核（舌下神経核、疑核、顔面神経核、三叉神経運動核、動眼神経核など）にも存在する。近年、脊髄におけるC-terminal が脊髄X層およびVII層内側部のコリン作動性介在ニューロンに由来しており、シナプス後部にあるムスカリン性受容体を介して運動ニューロンの発火頻度を増加させることが報告された。一方で、これらの知見は脊髄に限られており、脳神経運動核にC-terminal を投射する起始細胞の存在領域は不明であった。そこで本課題では、脳幹においてC-terminal を投射するコリン作動性介在ニューロンの分布や形態学的特徴を明らかにし、C-terminal を介した口腔顔面筋運動ニューロンの制御機構の解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

(1) 脳幹の網様体にはコリン作動性ニューロンが多数存在するが、脳神経運動核にC-terminal を投射している細胞（C-terminal 起始細胞）の存在領域は不明である。そこで、脳幹におけるC-terminal 起始細胞の分布を決定するとともに、運動ニューロンへの投射様式を明らかにする。

(2) C-terminal はコリン作動性の神経終末であるが、そのシナプス伝達における分子メカニズムには不明な点が多い。そこでC-terminal に局在し、神経伝達物質の輸送に機能する新規分子を探索し、それらのシナプス伝達における役割を明らかにする。

(3) ニューロンの形態学的特徴は、神経系の研究における本質的な所見の1つである。しかしながら従来の神経トレーサーはニューロンを非特異性に標識するため、目的のニューロンが偶然標識されるのを期待するしかなかった。そこでCre/loxP誘導性ウイルストレーサーを作製し、目的とするニューロンに限定した細胞標識を可能にすることで形態解析の効率化を図る。

(4) 脳幹のC-terminal 起始細胞の形態学的特徴を決定するためには、脊髄に分布する同系列の細胞との比較が必要である。そのため脊髄のC-terminal 起始細胞であるコリン作動性ニューロンの可視化を行い、樹状突起や軸索の分岐様式といった形態に関する基礎的知見を収集する。

(5) 脳幹におけるC-terminal 起始細胞の機能を理解するためには、感覚性/運動性など他の神経ネットワークとの連絡を明らかにすることが必要である。そこで神経トレーサーを用いて、C-terminal 起始細胞と連絡するニューロンを探索する。

3. 研究の方法

(1) 脊髄におけるコリン作動性介在ニューロンの一部は転写因子*Pitx2*を発現するとともに、C-terminal を投射することが知られている。そこで脳幹における*Pitx2*発現ニューロンの分布をin situ hybridizationにより観察した。

上記の方法で得られた*Pitx2*発現ニューロンの分布に基づいて、細胞体から軸索終末へと輸送される順行性トレーサーの注入実験を行った。注入個体の脳から組織切片を作製し、脳神経運動核のC-terminal がトレーサー標識されるのかを、コリン作動性神経マーカーとの二重免疫組織化学により検討した。

(2) コリン作動性神経のシナプス伝達では、コリンを輸送機質とするトランスポーターが重要な機能を担うことが知られている。そこで、複数の神経伝達物質に対して親和性を持つ有機カチオントランスポーター(OCTs)に注目して、C-terminal とその起始細胞における発現・局在を検討した。

(3) Cre/loxP 部位特異的組み替えは、Creを発現する特定の細胞系列においてレポーター蛋白を発現させる目的のため、広く用いられている。そこで、Cre存在下で膜移行シグナル付加GFP(myr-GFP)を発現するウイルスベクターを作製し(図1)、Cre発現マウスに注入することで特定のニューロンの標識を目指した。とくにC-terminal 起始細胞であるコリン作動性ニューロンの可視化のため、コリン作動性ニューロン特異的Cre発現マウス(ChAT-Creマウス)で選択的なニューロン標識が可能かを検討した。

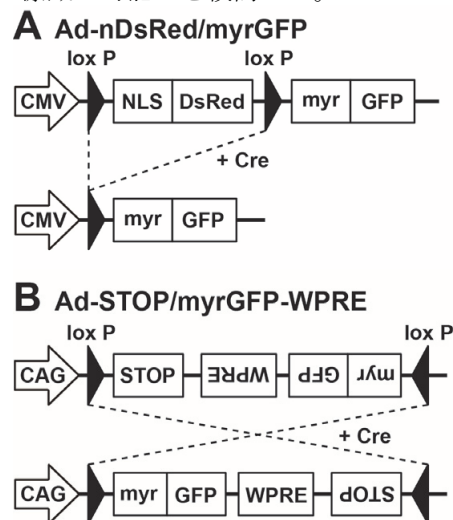


図1 Cre/loxP誘導性ウイルスベクター

(4) 脊髄の運動ニューロンに C-terminal を投射するコリン作動性介在ニューロンは、パーティション細胞と呼ばれる。上記の方法 (3) で作製した Cre/loxP 誘導性ウイルストレーサーの評価を行うとともに、C-terminal 起始細胞の形態学的特徴を決定するため、ChAT-Cre マウスの脊髄にウイルスベクターを注入し、パーティション細胞を少数細胞レベルで可視化して、その形態解析に取り組んだ。

(5) 研究成果 (1) により得られた脳幹の C-terminal 起始細胞に関して、それらと連絡するニューロンの分布を逆行性トレーシングにより解析した。逆行性トレーサー (Fluoro-Gold など) は神経終末から細胞体に向かって輸送される物質であり、C-terminal 起始細胞の存在領域にトレーサーを注入し、逆行性標識されたニューロンの分布を決定することで、C-terminal 起始細胞に入力するニューロンを探索した。

4. 研究成果

(1) 脳幹の組織切片において、転写因子 *Pitx2* の in situ hybridization を行った。その結果、延髄尾側部では中心管近傍の網様体に *Pitx2* 発現ニューロンが存在しており、それらの一部がコリン作動性ニューロンである可能性が示された (図2)。延髄における *Pitx2* 発現ニューロンの分布は中心管近くから腹外側方向へと広がっており、舌下神経核レベルを吻側端として脳幹網様体における *Pitx2* 発現は見られなくなった。

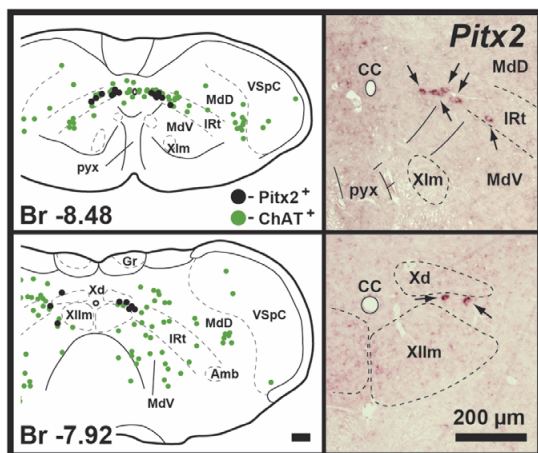


図2 延髄尾側における *Pitx2* 発現ニューロンとコリン作動性ニューロンの分布

延髄網様体における *Pitx2* 発現ニューロンの分布は、脊髄における *Pitx2* 発現コリン作動性介在ニューロン (C-terminal 起始細胞) の分布に類似していた。そのため脳幹の C-terminal 起始細胞は脳幹網様体に存在するとの仮説を立て、逆行性トレーサーを注入することで C-terminal が可視化されるかを検討した。その結果、延髄から橋の大細胞性網様体 (中間網様核、延髄網様体腹側部、巨

細胞性網様核、外側傍巨細胞性網様核) にトレーサーを注入したときに、脳神経運動核の運動ニューロンの周囲で大型の神経終末の標識が観察された (図3)。コリン作動性神経マーカーの小胞性アセチルコリントランスポーター (VAC hT) と免疫染色を行ったところ、トレーサーとの二重陽性を示したため C-terminal であることが確認された。続いて脳神経運動核に対する C-terminal 起始細胞の投射様式を観察したところ、舌下神経核も含めた口腔顔面筋の運動核に両側性かつ同時投射することが明らかになった。以上から、脳幹では大細胞性網様体に分布するコリン作動性ニューロンが C-terminal の起始細胞であり、複数の口腔顔面筋の運動ニューロンの興奮性調節に機能する可能性が示唆された。

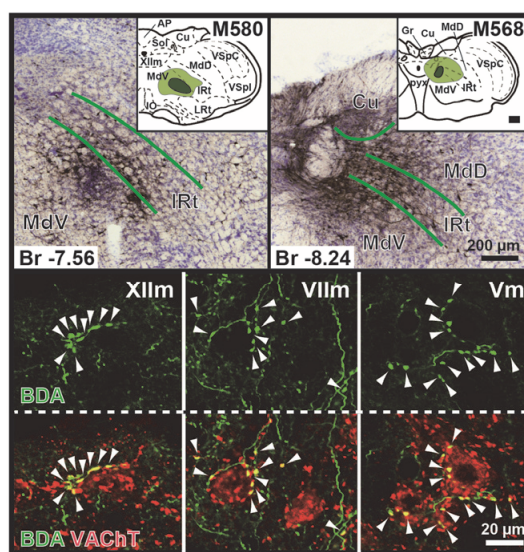


図3 脳幹網様体における逆行性トレーサー (BDA) の注入例と脳神経運動核で見られた C-terminal

(2) 2種類の Cre/loxP 誘導性ウイルストレーサー (Ad-nDsRedSTOP/myrGFP および Ad-STOP/myrGFP-WPRE ; 図1) をコリン作動性ニューロン特異的 Cre 発現マウス (ChAT-Cre マウス) に注入して、コリン作動性ニューロンのみが特異的に標識されるのかを観察した。その結果、ウイルス注入量および注入後の生存期間を適切に設定することで、ChAT-Cre マウスの脳と脊髄においてコリン作動性ニューロンの神経突起を精細に可視化できた (図4)。また2種類のウイルストレーサーのうち Ad-STOP/myrGFP-WPRE は、ウイルス注入後の生存期間を長くすることで逆行性トレーサーとしても利用できることが示された。これらのウイルストレーサーは、目的とする神経部位に微量注入することが可能であり、特定の領域に局限して、少数細胞レベルでコリン作動性ニューロンを可視化する手法が確立できた。

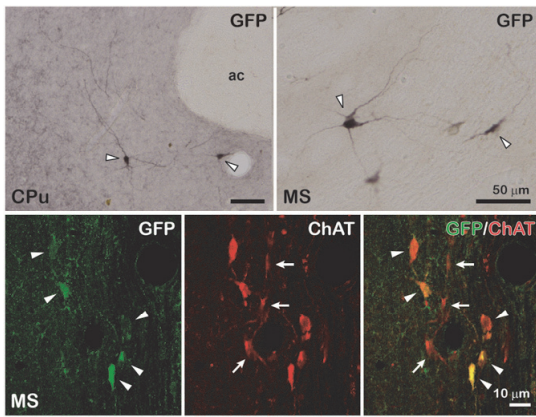


図4 Cre/loxP 誘導性ウイルストレサーによるコリン作動性ニューロン特異的な細胞標識

(3) 有機カチオントランスポーターファミリーは肝臓や腎臓で発現することが知られ、薬物とその代謝物、生体内の化学物質といった多様な物質を輸送する。有機カチオントランスポーターの1つ OCT2 は、in vitro においてモノアミン、コリンなど神経伝達物質を輸送することが報告されている。そこで抗 OCT2 抗体を用いた免疫組織化学により、コリン作動性ニューロンにおける OCT2 の発現・局在を検討した。その結果、OCT2 は脊髄において運動ニューロンやコリン作動性介在ニューロンの細胞体で発現が見られた。また運動ニューロンの細胞体に接する C-terminal はコリン作動性神経終末であるが、その終末部に OCT2 の分布が観察された。続いて、脳神経運動核における OCT2 の分布を検討したところ、脊髄と同様に C-terminal における OCT2 局在が示された。以上から、脊髄および脳幹の C-terminal で機能する新規分子として、OCT2 を同定することができた。

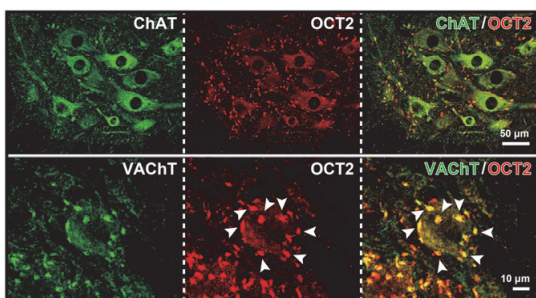


図5 脊髄の運動ニューロンにおける有機カチオントランスポーターOCT2 の発現と C-terminal への局在

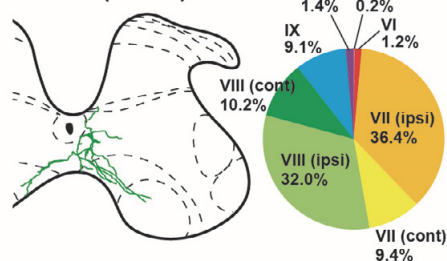
(4) 脊髄の C-terminal 起始細胞であるコリン作動性介在ニューロン (パーティション細胞) について、Cre/loxP 誘導性ウイルストレサーを用いて可視化を行った。その結果、従来は大きな細胞集団としてまとめられていたパーティション細胞が、細胞体位置と形態学的特徴に基づいて3群 (内側群、中間群、外側群) に分類できることが示された (図6)。

内側群は樹状突起を腹方へと伸ばし、それらは主に脊髄 VII 層の内側部に分布していた。中間群は水平方向に伸びる樹状突起を持ち、それらは脊髄 VII 層の外側部に主として分布していた。一方、外側群では樹状突起の枝様式に特定の傾向は見られなかった。

また、これまでの研究から脊髄の C-terminal は中心管近くに位置するパーティション細胞のみに由来すると考えられていたが、脊髄 VII 層の外側部に分布するパーティション細胞 (中間群および外側群) も運動ニューロンに C-terminal を送ることが、ウイルストレサーを用いた神経トレーシングにより明らかにされた。

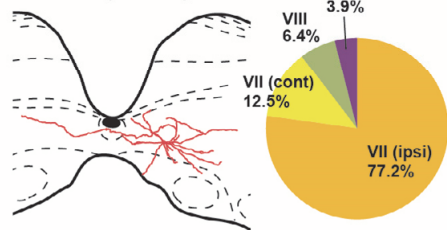
Medial group

M630 (C5-6)



Intermediate group

M641 (C6-7)



Lateral group

M628 (C4-5)

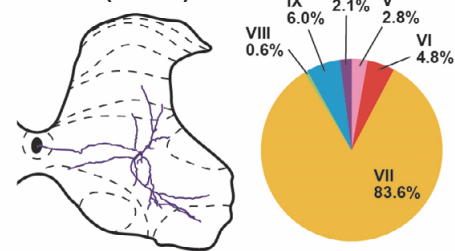


図6 脊髄の C-terminal 起始細胞 (パーティション細胞) の可視化と樹状突起分布様式

(5) 脳幹の C-terminal 起始細胞の存在領域に対して逆行性トレーサーを注入し、細胞体が逆行性標識されたニューロンの分布を観察した。その結果、標識ニューロンは、脊髄後角・三叉神経脊髄路核および中脳路核といった感覚性神経核、脳幹網様体 (小細胞性および大細胞性網様体)、赤核 (小細胞部) などで多数観察された。加えて中脳中心灰白質の外側部、結合腕傍核、縫線核、上丘などにおいても、少数の標識ニューロンの分布が

確認された。以上から、C-terminal 起始細胞が分布する網様体領域は、口腔顔面領域からの感覚を受ける感覚性中継核や自律神経系を含めた運動性中継核と神経連絡を持つことが示唆された。

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4件)

- ① Toshiyasu Matsui, Yu Hongo, Yoshinori Haizuka, Kenichi Kaida, George Matsumura, Donna M. Martin, Yasushi Kobayashi, C-terminals in the mouse branchiomotor nuclei originate from the magnocellular reticular formation, *Neuroscience Letters*, 査読有, 548 巻, 2013, pp. 137-142, DOI:10.1016/j.neulet.2013.05.063
- ② Takahiro Nakata, Toshiyasu Matsui, Kumiko Kobayashi, Yasushi Kobayashi, Naohiko Anzai, Organic cation transporter 2 (SLC22A2), a low-affinity and high-capacity choline transporter, is preferentially enriched on synaptic vesicles in cholinergic neurons, *Neuroscience*, 査読有, 252 巻, 2013, pp. 212-221, DOI:10.1016/j.neuroscience.2013.08.011
- ③ Takahiro Ogura, Tsuyoshi Hamada, Toshiyasu Matsui, Shinji Tanaka, Shigeo Okabe, Tomiei Kazama, Yasushi Kobayashi, Neuroprotection by JM-1232(-) against oxygen-glucose deprivation-induced injury in rat hippocampal slice culture, *Brain Research*, 査読有, 1594 巻, 2015, pp. 52-60, DOI: 10.1016/j.brainres.2014.10.038
- ④ Hiroshi Suzuki, Koji Araki, Toshiyasu Matsui, Masayuki Tomifuji, Taku Yamashita, Yasushi Kobayashi, Akihiro Shiotani, Value of a Novel PGA-Collagen Tube on Recurrent Laryngeal Nerve Regeneration in a Rat Model, *Laryngoscope*, 査読有、印刷中, pp. 1-7, DOI: 10.1002/lary.25750

[学会発表] (計8件)

- ① 松井 利康、中田 隆博、安西 尚彦、小林 靖、マウス脳における有機カチオントランスポーターOCT2の局在解析、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月、札幌
- ② 本郷 悠、松井 利康、中田 隆博、古川 敬世、小野 岳史、海田 賢一、宮平 靖、

小林 靖、Morphological analysis of spinal cholinergic interneuron, partition cells, 第37回日本神経科学大会、2014年9月、横浜

- ③ 中田 隆博、松井 利康、小林 久美子、小林 靖、安西 尚彦、Organic Cation Transporter 2 (SLC22A2), A low-affinity and high-capacity choline transporter, is preferentially enriched on synaptic vesicles in cholinergic neurons, 第37回日本神経科学大会、2014年9月、横浜
- ④ Katsuki Niwa, Kunio Mizutari, Toshiyasu Matsui, Takaomi Kurioka, Takeshi Matsunobu, Atsushi Tamura, Satoko Kawauchi, Yasushi Satoh, Shunichi Sato, Akihiro Shiotani, Yasushi Kobayashi, A sensorineural hearing loss rat model based on laser-induced shock waves, 2015ARO, 2015年2月、Baltimore
- ⑤ Hiroshi Suzuki, Koji Araki, Toshiyasu Matsui, Masayuki Tomifuji, Taku Yamashita, Yasushi Kobayashi, Akihiro Shiotani, Value of a Novel PGA-Collagen Tube on Recurrent Laryngeal Nerve Regeneration in a Rat Model, COSM2015, 2015年4月、Boston
- ⑥ Katsuki Niwa, Kunio Mizutari, Toshiyasu Matsui, Takaomi Kurioka, Takeshi Matsunobu, Atsushi Tamura, Satoko Kawauchi, Yasushi Satoh, Shunichi Sato, Akihiro Shiotani, Yasushi Kobayashi, A rat model of sensorineural hearing loss and tinnitus by laser-induced shock waves, 第38回日本神経科学大会、2015年7月、神戸
- ⑦ Katsuki Niwa, Kunio Mizutari, Toshiyasu Matsui, Takaomi Kurioka, Takeshi Matsunobu, Satoko Kawauchi, Yasushi Satoh, Shunichi Sato, Akihiro Shiotani, Yasushi Kobayashi, Changes of neuronal activities in the auditory pathway on a rat tinnitus model induced by laser-induced shock waves, ARO 39th MidWinter Meeting, 2016年2月、San Diego
- ⑧ 松井 利康、中田 隆博、小林 靖、マウス脳において有機カチオントランスポーターOCT2はモノアミン作動性・コリン作動性神経の軸索終末に分布する、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016年3月、郡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 利康 (MATSUI, Toshiyasu)
防衛医科大学校・その他部局等・助教
研究者番号：90531343