

## 論文の内容の要旨

論文題目 Development and plasticity of corticospinal synapses in vitro

和訳 皮質脊髄路シナプスの発達・可塑性

指導教官 辻省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月 入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 大野孝恵

皮質脊髄路は最長かつ線維数最大の皮質遠心路であり、それ故、多くの神経疾患や外傷の座となり、その損傷は重篤な運動障害をもたらすことから、この系の生物学的特性を解明する事は、基礎的にも臨床的にも極めて重要であるが、投射距離の長さ等からこれまで十分追求されているとは言い難かった。

我々は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* で再構築し、皮質深層を電気刺激して脊髄よりフィールドシナプス後電位 (field EPSP) を記録する方法で、そのシナプス形成の空間分布を簡便かつ定量的に評価できる系を確立することに成功している (Takuma et al (2002) *Neuroscience* 109, 359-370)。今回は、この再構築系を用いて、皮質脊髄路シナプスの脊髄内における空間分布、その発生過程に見られる活動依存的なシナプス除去、更にそのメカニズムを明らかにし、その過程で興味ある事実を発見するに至った。

新生ラット(P0)の感覚運動皮質(前肢領域)と脊髄(頸髄)のスライスを共培養した。大脳皮質は冠状断, 脊髄は水平断で 400 $\mu$ m にスライスし、皮質から前肢領域を切り出し、皮質側に向ける脊髄白質は除去した。両スライスを 500 $\mu$ m 離してコラーゲン膜上の気相-液層境界面に置き、37°C, air 95%, CO<sub>2</sub> 5%の環境で静置培養した。

皮質脊髄路シナプスは *in vitro* においても *in vivo* と同様、脊髄背側に部位特異的に局在する

スライスを記録用チェンバーに置き、37°Cに維持し、95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> で飽和した灌流液で灌流した。白金双極電極を用いて 2Hz の電流パルスで皮質深層を電気刺激し、その反応を脊髄よりガラス管微小電極で細胞外記録した (field EPSP)。シナプス形成の空間分布を定量的に評価するため、脊髄灰白質より 100 $\mu$ m の格子状に fEPSP を記録した。培養後 14 日 (14 DIV) 以降では、皮質に対して脊髄背側を向けた場合にも腹側を向けた場合にも、field EPSP は *in vivo* で皮質脊髄路が終わる脊髄背側 (Rexed IV-VI 層にほぼ一致した部位) に限局した分布を示すことがわかった。

皮質脊髄線維終末の分布を形態学的に調べるため、大脳皮質深層に biocytin を置き、皮質脊髄投射線維を順行性標識した。神経終末は、14 DIV では皮質に対して脊髄背側を向けた場合にも腹側を向けた場合にも脊髄背側に限局して分布していた。

発達初期には脊髄灰白質にび漫性にシナプスが形成されるが、9日頃より腹側からシナプス除去が始まり背側に限局していく

つぎに、シナプス形成過程の時間経過を追うと、6 DIV より field EPSP が記録可能となり、7 DIV には脊髄灰白質全体に比較的広範に見られるようになる。しかし 9 DIV より腹側からは消退が始まり、14 DIV には上述の脊髄背側部に限局するようになる。この過程を biocytin を用いて組織学的にも検討してみ

ると、神経終末は、シナプス分布の変化と平行して 7 DIV では脊髄全体に分布し、9 DIV から 14 DIV にかけて、脊髄背側へ限局していくことが確認された。

#### 上記シナプス除去・背側への限局化は、活動依存的な過程である

視覚皮質、体性感覚皮質など中枢神経系において発生初期における活動依存的な可塑性が示されていることから、上記シナプス形成過程の活動依存性を検討した。培養液に NMDA 受容体阻害剤である D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) 50  $\mu$ M、AMPA 受容体阻害剤である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX) 10  $\mu$ M、及び Na チャネル阻害剤である tetrodotoxin (TTX) 3  $\mu$ M を添加し、対照群と比較した。シナプス終末の消退は、APV 及び TTX にて抑制され、CNQX による効果は両者に比べて優位に小さかった。これより、この発生過程におけるシナプス除去が活動依存性であり、かつ NMDA 受容体の活性化が必要である事が示唆される。

#### シナプス除去は腹側への軸索側枝の除去に伴っている

ここで、発生過程における神経終末の消退が、皮質における脊髄腹側に軸索をおくる錐体細胞の細胞死によるものか、腹側軸索側枝の軸索除去によるものを検討するため、2種類の実験を行った。

1つの細胞が背側と腹側へ軸索側枝を送っていれば、その間に軸索反射が存在するはずである。1つはこれを確認するための電気生理実験で、paired pulse 刺激を行った。7 DIV に行った paired pulse 刺激実験では、脊髄腹側刺激により皮質刺激の反応が干渉を受けており軸索反射が確認された。

もう1つは組織学的実験で、赤と緑2色の蛍光ビーズ (fluorescent latex microspheres, Lumafuor) を各々腹側・背側脊髄に注入して逆行性二重標識を行った。これらのビーズは神経終末からのみ取り込まれ、通過線維からは取り込まれない特性をもっている。注入には径 30  $\mu$ m のガラス管微小電極を用い、2種のビーズの混入を避けるために最低 150  $\mu$ m は離すよう、マニピュレーターを用いて顕微鏡下で慎重に行った。この逆行性二重標識でも 7 DIV には皮質細

胞の大部分が二重に染色されたことから、同一の皮質細胞より脊髄腹側および背側に軸索が分岐していると解釈された。

7 DIV に確認された脊髄腹側からの反応が 14 DIV には消失し、7 DIV には二重に染色されていた皮質細胞も 14 DIV には大部分が背側脊髄に注入した単色のみで染色されていた。以上より、前述の field EPSP および神経終末の消退の少なくとも主要な部分は、単一ニューロンの軸索側枝の軸索除去である可能性が示唆される。

本研究にて、皮質脊髄路シナプスの形成過程におけるシナプス除去とその可塑性が発見され、その可塑性が活動依存性であること、発生過程における神経終末の消退が皮質における神経細胞死によるものではなく軸索除去であることが解明された。これらは、皮質脊髄路および神経回路形成の分野の研究における貢献である。一方、軸索除去は痙性対麻痺, ALS をはじめとする錐体路疾患の病態との関連も注目され、この過程を究明することはこれら疾患を解明する上でも重要であろう。