

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 大 野 孝 恵

本研究は、多くの神経疾患や外傷の座となり、その損傷が重篤な運動障害をもたらす皮質脊髄路のシナプスを *in vitro* で再構築し、そ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、更にはそのメカニズムを明らかにすることを目的としており、以下の結果を得ている。

1) シナプス形成の空間分布を定量的に評価するため、皮質深層を刺激し脊髄灰白質より 100 μ m の格子状に field EPSP を記録したところ、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明らかにされた。

2) 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ところ、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することが示された。

3) シナプス形成過程の時間経過を追ったところ、field EPSP は 7 DIV には脊髄灰白質全体に比較的広範に見られるが、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とが示された。この過程を biocytin を用いて組織学的にも検討したところ、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。

4) NMDA 受容体阻害剤である D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) 50 μ M、AMPA 型受容体阻害剤である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX) 10 μ M、及び Na チャネル阻害剤である tetrodotoxin (TTX) 3 μ M のうち一つを培養液に添加し、上記シナプス形成過程の活動依存性を検討したところ、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有意に小さかったことから、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された。

5) 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、腹側軸索側枝の除去によるものかを検討した。まず paired pulse facilitation を利用して軸索の腹側分枝-背側分枝間の軸索反射の存在を示す電気生理学実験では、7 DIV に記録できた脊髄腹側からの反応が 14 DIV には消失していた。また赤と緑 2 色の蛍光ビーズ (fluorescent latex microspheres, Lumafluor) を各々腹側・背側脊髄に注入して逆行性二重標識を行う組織学的実験を試みた結果、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に染色されていた。以上から、前述の field EPSP および神経終末の消退は軸索分枝の除去であることが示唆された。

以上、本論文にて皮質脊髄路シナプスの形成過程とその可塑性が明らかにされ、その可塑性は活動依存性である点、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分枝の除去であることがわかった点など、今後の研究に大きく寄与するものと考えられる。軸索除去の概念は痙性対麻痺, ALS をはじめとする疾患との関連からも注目されつつあり、この過程を究明することは各疾患の病態を解明する上でも重要であり、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。