



Title	発達期マウスのプルキンエ細胞における「勝者」登上線維シナプスの分子解剖学的強化基盤〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	新田, 麻子
Description	配架番号 : 2941
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16550号
Issue Date	2025-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95846
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NITTA_Asako_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 新田 麻子

学位論文題名

発達期マウスのプルキンエ細胞における「勝者」登上線維シナプスの分子解剖学的強化基盤
(Molecular and anatomical strengthening of “winner” climbing fiber synapses
in developing mouse Purkinje cells)

【背景と目的】

神経系の発達過程では、初期に形成された余剰なシナプスのうち、必要なものが強化されて残存し、それ以外は除去され効率的な回路が完成する。発達期マウスの小脳登上線維-プルキンエ細胞投射系は、活動依存的な神経回路の精緻化を示す代表的モデルである。生直後のプルキンエ細胞は、似通った強度の5本以上の登上線維に支配されている。その後1本の登上線維が強化され、生後9日目（P9）以降に「勝者」として細胞体から樹状突起に移動する。移動できなかった「敗者」はP21までに除去され、「勝者」による単一支配が確立する。この一連の過程のうち、「敗者」の除去過程は解明が進んでいるが、「勝者」と「敗者」の選別過程には不明な点が多い。本研究では、発達期マウスの「勝者」と「敗者」登上線維シナプスの分化過程について分子解剖学的な解析を行った。

【材料と方法】

主に P7-P21 の C57BL/6J マウスを使用し、以下の組織学解析を行った。生体マウスに対する処置はイソフルラン吸入か、ペントバルビタールの腹腔内投与による深麻酔下で行った。

① 順行性神経標識を組み合わせた蛍光多重免疫染色法

マウスの下オリーブ核に順行性トレーサーを注入し、登上線維を蛍光標識した。2-5 日間の生存期間の後、9%グリオキサール/8%酢酸溶液による経心的灌流固定を行い、矢状断切片を作成し蛍光多重免疫染色を行った。分子マーカーとして、全ての登上線維終末を標識する 2 型小胞膜型グルタミン酸トランスポーター (VGluT2)、シナプス前終末の RIM1/2、シナプス後部の AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体)、シナプス後部の足場タンパク質 (PSD-95) の抗体を使用した。共焦点レーザー顕微鏡の撮像では、登上線維の経路を追跡するため適宜 Z スタックを用いた。画像は各蛍光チャンネルに分解して二値化し、VGluT2 のシグナルに基づいて対象領域を設定し、内部に含まれる AMPA 受容体、RIM1/2、PSD-95 のシグナル強度を測定した。切片間のばらつきによる影響を最小限にするため、解析領域毎にシグナル強度の標準化を行った。

② 連続電子顕微鏡法を用いた登上線維シナプスの三次元再構築

0.1%グルタルアルデヒド添加 4%パラホルムアルデヒド溶液により経心的灌流固定したマウス (P12) の矢状断切片を使い、VGluT2 抗体を用いた金コロイド銀増感法による包埋前免疫電顕を行った。軟膜と平行な断面から細胞体と近位樹状突起の移行部を含む連続超薄切片を作成し、走査型電子顕微鏡により 210 枚の連続画像を取得した。セグメンテーションは手動で行い、得られたプルキンエ細胞と登上線維シナプスの三次元再構築画像からスパインの体積とシナプス後肥厚 (PSD) の面積を算出した。

【結果】

① 蛍光多重免疫染色によるシナプス分子発現の比較

本研究では、大部分の「勝者」が細胞体に局限する P7-P9 と、樹状突起に移動する P10-P12、樹状突起への移動がほぼ完了する P13-P15 の 3 ステージに分けて分子発現の変化を検討した。また登上線維シナプスは以下の 3 群、(a)「勝者」線維の樹状突起シナプス、(b)「勝者」線維の細胞体シナプス、(c)「敗者」線維の細胞体シナプス、に分類した。AMPA 受容体のシグナル強度は、P7-P9 において「勝者」線維の細胞体シナプスで最も高かった。しかしその後は「勝者」線維の樹状突起シナプスでのシグナル強

度が、「勝者」線維の細胞体シナプスより有意に高かった。また「敗者」線維の細胞体シナプスのシグナルは一貫して最も低く、発達とともにさらに低下した。シナプス前部のアクティブゾーンでグルタミン酸放出制御の中心的役割を担う RIM1/2 の発現は一貫して「勝者」線維の樹状突起シナプスで高く、この傾向はその後さらに顕著になった。シナプス後部における PSD-95 の発現は、全ての発達段階において 3 群間での有意差を認めなかった。

② 連続電子顕微鏡法を用いた登上線維シナプスの三次元再構築

「勝者」線維の樹状突起および細胞体シナプスでは、終末およびスパインが分葉化を伴う複雑な形態に分化し、PSD の面積は有意に大きかった。これに対し「敗者」線維の細胞体シナプスは分葉化を伴わない単純な形態を示し、PSD の面積は有意に小さかった。シナプスを形成するスパインの体積や、スパイン当たりのシナプス数については 3 群間で有意差は検出されなかった。また全ての群でスパインの体積と PSD の面積は線形の正の相関を示したが、「勝者」線維のシナプスでは「敗者」線維のものよりも近似直線の傾きが大きく、大きなスパインはより大きな PSD を形成する傾向が示唆された。

【考察】

これまでの研究から、P7 頃までの登上線維入力シナプス機能や構造が似通っており、入力間の強弱は各線維が形成するシナプスの数で決まることが明らかになっている。本研究では P7 以降の「勝者」の登上線維シナプスにおいて、シナプス強度に影響を与える分子発現の増加や PSD の増大、シナプス形態の分葉化など分子解剖学的な強化が生じていることを明らかにした。

P7-P9 の「勝者」線維における細胞体シナプスの後部では、AMPA 受容体の発現が「敗者」線維のシナプスよりも有意に高く、両者のシナプス機能における質的な分化を示唆している。P10 以降では樹状突起に移動した「勝者」線維のシナプスで AMPA 受容体や RIM1/2 の発現がさらに増加していた。この所見は「勝者」線維のシナプスでグルタミン酸放出効率などの機能的な成熟が進むという、同時期の電気生理学解析の報告と合致する。また、シナプス後部の AMPA 受容体の活動は登上線維終末からのグルタミン酸放出機能の維持に不可欠であることも知られている。したがってこの結果は「勝者」シナプスの AMPA 受容体の活動が、未知の逆行性シグナルを介してシナプス前部の RIM1/2 の発現を増加させ、シナプス伝達効率を高めるという正のフィードバック機構の存在を示唆している。

シナプス機能の変化は、PSD サイズの増減などの構造的変化に先行することが知られている。本研究では、樹状突起のシナプス形成がピークとなる P12 で「勝者」線維の細胞体と樹状突起シナプスの PSD 面積は、「敗者」線維の細胞体シナプスより大きいことを明らかにした。しかし「勝者」線維の細胞体シナプスでは「敗者」のシナプスと同様に、その後の発達過程で AMPA 受容体の発現が減少することから、機能的に弱化されていくと予想される。また、PSD-95 の発現には 3 群のシナプス間で明らかな違いが認められなかったが、これはシナプスの構造的安定性を反映していると考えられる。実際、細胞体のシナプス除去が進む生後 2 週目において、抑制性のバスケット細胞終末が形成するシナプス後部に一過性に PSD-95 が検出されることが知られている。こうした結果からは、AMPA 受容体の発現低下に伴うシナプス機能の弱化の後で、PSD-95 を含むシナプス後部構造の分解が進行しシナプス結合が離解していく可能性が示唆される。

【結論】

本研究は発達期における「勝者」登上線維シナプスで、PSD の増大やシナプス形態の分葉化を伴う構造的強化とシナプス分子発現の増加による選択的強化が生じることを明らかにした。この強化は「勝者」シナプスの競合優位性を確保し、神経支配領域の拡大と他の弱いシナプスの除去を促進するための分子解剖学的基盤を提供すると考えられる。