

研究報告書

「光遺伝学を用いた前頭前野シナプスと個体レベル行動との関連解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 9 月～平成 26 年 3 月

研究者: 林 朗子(高木 朗子)

1. 研究のねらい

シナプスは脳回路の最小単位であり、その適切な形成および可塑性が正常な神経回路の基盤である。様々な精神疾患に大脳皮質のグルタミン酸作動性シナプスの関与が示唆されるものの、生体脳でどのような病態がシナプスレベルで進行していくのかは未解明である。グルタミン酸作動性シナプスの約 7 割は、樹状突起上にマッシュルーム様構造(スパイン)を形成する。スパインの特徴の一つに、その形態と機能に著しい相関があること、即ち、形態をイメージングするだけでそのシナプス機能を精度良く推測できるという方法論的な大きな利点がある。さらに 2 光子顕微鏡によりスパインを *in vivo* で繰り返しイメージングすること、Optogenetics によってスパイン形態を人為的に操作する新しいプローブの作成、これらの操作動物に行動解析を併用することが可能になった。本研究は、この Synaptic optogenetics とも表現できる新技法によりスパインと行動との因果律に挑戦した。

2. 研究成果

(1) 概要

脳内の数百億もの神経細胞はシナプスを介して連絡しており、大脳皮質のグルタミン酸作動性シナプスの約 7 割は樹状突起スパインという小突起構造上に形成される。スパインは学習・経験に応じてその形態・サイズが劇的に変化し、それに伴い電氣的伝達効率が変化する。それ故に、スパインは脳機能の記憶素子と考えられ、多くの精神疾患やそのモデル動物で前頭前野領域におけるスパイン形態・密度異常が繰り返し報告されてきた。前頭前野は高次脳機能の中樞であり、様々な精神疾患の責任部位と考えられている。しかし、その神経回路の発達・動作メカニズムを調べるための強力なげっ歯類モデル、例えば視覚野における単眼遮蔽などがなく、分子細胞回路レベルでの調査が遅れている。そこで本研究では、急激な進歩を遂げている光イメージング・光制御法を前頭前野研究に活用し、そのシナプス基盤の解明を進める。スパインの特徴として、その形態と電気生理学的特性が非常に良い相関を示すことが知られており、すなわち形態を観察するだけで、そのシナプス機能を精度良く推測することができる。そこで精神疾患モデルマウスの前頭前野の *in vivo* イメージングを縦断的に行いながら行動解析を併用することで、スパイン形態と行動異常とに如何なる関連があるか模索する。さらにスパイン形態とその機能に強い相関があることを利用し、スパイン形態を人為的に操作する新規の光プローブの作成を試みた。この新規光プローブは、24 時間以内に蛋白合成依存的な頭部増大を呈したスパインに極めて特異的に集積し、さらに青色光照射で同スパイン群だけを収縮させることが可能であることが明らかになった。すなわち新規学習にともない増大したスパインを可視化、さらには収縮操作することができ、実際に新規学習は青色光で消去されることが分かった。本研究は、この Synaptic optogenetics とも表現できる新技法に

よりスパインと行動との因果律に挑戦した。

(2) 詳細

(研究項目1)統合失調症(SZ)モデルマウスのin vivoスパインイメージング

前頭野スパインと行動との関連や、新規治療薬の効果を測定出来る実験系を確立するために、表面的・構成的・予測的妥当性を満たす有力な疾患モデルの異常行動発症前後の縦断的 in vivo 2光子顕微鏡イメージングと疾患関連行動解析を行った。SZ モデルマウスとして前頭前野特異的な DISC1 ノックダウンモデルや Calcineurin ノックダウンモデルの解析を行い、野生型と有意に異なるスパイン特性(スパイン密度が低下し、その中で際立って巨大なスパインが分布)を見出した。さらに行動解析によりこれらの動物が統合失調症モデルとして矛盾しない行動異常を呈することを見出してきた(図 1、Hayashi-Takagi A, PNAS, In press)。DISC1 と Calcineurin という2つの異なる SZ モデルマウスで、前頭前野での“際立って巨大なスパインの分布”という共通するシナプス特性が見出されたことは興味深く、両マウスともに前頭前野認知機能を反映するワーキングメモリー(作業記憶)の障害が認められた(図 1)。

(研究項目2)新規光感受性シナプスプローブによる“Synaptic Optogenetics”の創出

ChR2 など従来の Optogenetics は、神経細胞全体の発火を制御する強力なツールである。しかし、神経細胞では文脈依存的に異なるシナプス群が活性化され、異なる神経回路が賦活されるため、神経細胞全体ではなくシナプスレベルでの制御、即ち Synaptic Optogenetics の開発が有用である。そこで、スパイン形態を強力に制御する Rac1 に注目した。

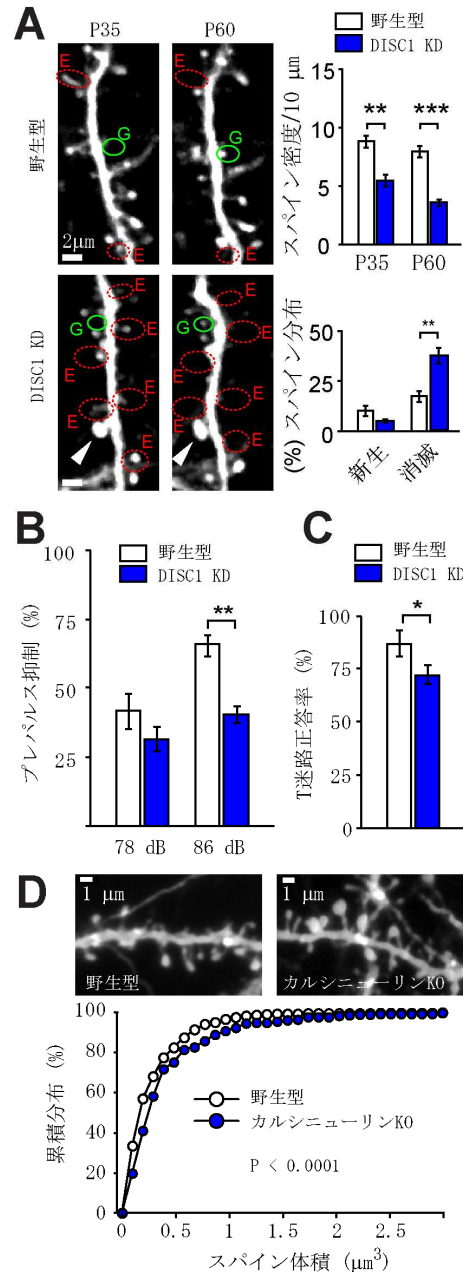


図 1: 統合失調症モデルマウス (C57BL6) の樹状突起スパインと行動解析
 (A) DISC1 ノックダウン (KD) の生後 35 日 (P35) から 60 日の縦断的スパインイメージング。KD マウスでは過剰なシナプス消失が発達期に起こり、際立って大きなスパインが形成される(矢頭)。E: 消失 (elimination) スパイン。G: 新生スパイン (generation)。(B, C) 同マウスは PPI (B)、T 迷路 (C) とともに障害を呈する。(D) カルシニューリン KO においても際立って大きなスパインが多い。

Rac1 に LOV ドメインを融合させた不活化 Rac1 であり、LOV による Rac1 の不活化は光依存的に一過性解除されるため、Rac1 活性を光で時空間的に精密制御できる(図 2A)。われわれは、シナプス後肥厚部(PSD)局在タグを融合した PaRac1 を神経活動依存的プロモーター下に挿入し、さらに神経入力が入った樹状突起領域にこの mRNA が輸送されることを期待し DTE (Dendritic transport element) を付加した PaRac1 を作成した(記憶プローブ)(図 2B)。この記憶プローブは、ごく一部のスパインにのみ発現する(図 2C、左上段、矢頭)。SEP-GluR1 は長期増強の生じたスパインに挿入されるため、SEP-GluR1 と記憶プローブとの分布を

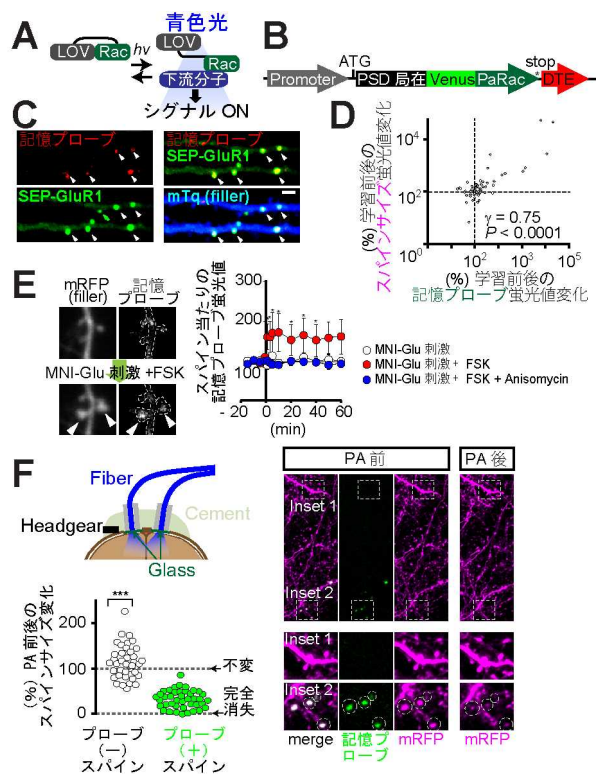


図 2 : 記憶プローブの特性

比較したところ、両者は有意に共局在した(図 2C)。さらに、AS プローブを発現していないスパインに単一スパイン長期増強刺激を行うと、刺激スパイン特異的に AS プローブが集積し、この AS プローブの集積は蛋白合成依存性であった(図 2E)。in vivo の学習時における AS プローブの集積を確認するために、新規運動学習の前後で同一個体のスパイン体積と AS プローブの蛍光値を比較した。すると学習後にスパイン頭部増大の程度と AS プローブの蛍光値の増加には強い相関があることが明らかになった(図 2D)。これらの知見より AS プローブはあらゆるスパインに均一に分布するのではなく、記憶・学習などにより長期増強が誘導されたスパインを選択的に標識することが示され、即ちこの新規プローブを利用し学習に必要なシナプス可塑性の法則を解析することが可能になる。さらに光刺激の最適化により、AS プローブを発現するスパインだけを特異的に収縮させる技術にも成功し(図 2F)、この操作により通常の運動には影響を与えることなく既得学習だけを消失させることが可能になった(図 3)。これは、記憶・学習に必要とされたスパインを可視化するのみでなく、記憶の本体を操作する synaptic optogenetics を初めて実現したことを意味し、今後の脳科学研究に有効なツールの一つとなると思われる。

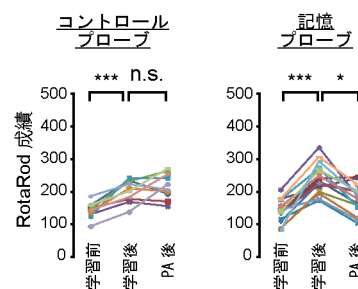


図 3 : 記憶プローブで標識されたスパインを消失させると、既得学習が消失する。

3. 今後の展開

(研究項目1)ワーキングメモリーの障害は、認知機能の中でも特に健常者との差が大きく、転帰

とも関連が大きく、患者の社会機能予後に直結すると言っても過言ではない。ワーキングメモリ一課題実行中には前頭前野のグルタミン酸作動性錐体細胞が同期的発火し、同期発火の程度と課題実行能力には相関があることが知られている。しかしながら、シナプス異常がどのようなメカニズムで神経回路障害や、その結果としての前頭前野機能異常を誘発するのかは未解明な部分が多い。そこで今後は、2光子励起顕微鏡や電気生理学を用いた前頭前野シナプス特性の実験データを基に、SZモデル動物の前頭前野神経回路障害の数理モデルの確立を試みる(上智大学、田中昌司先生との共同研究)。これらのシミュレーションにより、情報処理の基盤となる前頭前野神経回路のダイナミクスや安定性が、SZモデルマウスにおいてどのように野生型マウスと異なるか、どのパラメーターが回路異常への寄与が大きいかを検証する。さらに神経回路における個々のスパインの寄与についても解析を進める。スパインは活動電位の発生にたいして非線形的に大きな効果を有し、とりわけ大きなスパインではこの非線形効果が顕著であることが明らかになりつつある。DISC1とCalcineurinという2つの異なるSZモデルマウスで、前頭前野での“際立って巨大なスパインの分布”という共通するシナプス特性が既にあきらかであるため、このようなモデルマウスにおける樹状突起の非線形性をモデル化し、回路シミュレーションを行う。これにより、実験で予想される発火頻度や発火パターンの変化をどの程度シミュレーションによって説明されるかということを検討し、SZモデルマウス機能不全に寄与する要因が樹状突起の演算機能なのか、レセプターのパラメーターにあるのか、あるいは回路ダイナミクスにあるのかを検証する。

(研究項目2)記憶プローブを改良し、脳の幾つかの領域の学習記憶現象に応用し、各脳領域の学習記憶を可視化定量化し操作する方法を確立する。遺伝子改変動物やアデノ随伴ウイルス(AAV)を利用することで、複数の脳領域に遺伝子導入する。こうして、記憶形成に関係した興奮性回路のできるだけ多くの部分をシナプスレベルで標識するとともに、軸索およびシナプス前終末まで標識する。これを透明化した全脳標本で観察して、各種学習課題について、広い脳領域で調査する。こうして、これまでは主として細胞単位で行われてきた記憶の研究を記憶の単位であるシナプスレベルで調査する。

4. 評価

(1)自己評価

(研究項目1)前頭前野特異的DISC1ノックダウンマウスにおける神経発達後期の縦断的スパインとプレパルス抑制試験(PPI)を行い精神病様行動異常の評価を行った。DISC1ノックダウンマウスでは発達期に伴うスパインの減少が過剰に生じていること、そして新規の低分子化合物であるPAK阻害剤が過剰なスパイン減少やPPI低下を予防出来ることを見出した(5.の原著論文番号1: Hayashi-Takagi, PNAS, In press)。統合失調症モデルマウスの縦断的スパインイメージングは世界初の試みであり、また新規の化合物を創薬標的として提唱出来たことは申請目標を達成できたと考ええる。

(研究項目2)新規の光プローブによる新規光刺激法 Synaptic optogenetics の確立を試みた。プローブ作成・最適化に相当な時間を費やしたものの、当初の予想を遥かに超える精度のプローブが作成できたと自負している(特許出願準備中)。未だ論文発表には至っていないものの、本プローブ、もしくはその改良型がシナプス可塑性研究に有用なツールになる可能性

は高いと考えるため、今後、これらを最大限に活用し、シナプスと神経回路、そしてその破綻としての精神疾患研究を推進していきたいと考える。

(2) 研究総括評価

統合失調症では最近の研究により脳のグルタミン酸作動性シナプス機能の異常が特に注目されている。本研究では生体脳で個々のスパインを可視化・経時観察する技術を、DISC1 ノックダウンや Calcineurin ノックダウンなどの統合失調症モデルマウスの前頭前野に適用してスパインの形態変化の動態を計測し、作業記憶の障害に対応づけることができた。さらに、スパイン形態に強く関わる Rac1 に着目し、その活性を光により精密に時空間制御できるコンストラクトに軸索輸送と後シナプス局在機能を仕組んだ“記憶プローブ”を作出して、実際にこれが長期増強スパインに集積することを示した。これは学習にともなうシナプスレベルの変化を可視化できるもので高く評価できる。さらにこのレポータープローブを改変し、シナプス単位でその形態・機能を操作することにも成功しており、シナプス生理学に新しい境地を開く成果である。今後は、このような技術を駆使して統合失調症の遺伝的要因だけでなく環境要因の解析も展開することができれば、社会的にもきわめて大きいインパクトを与えることになるであろう。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hayashi-Takagi, A., Araki, Y., Nakamura, M., Vollrath, B., Duron, S., Yan, Z., Kasai, H., Haganir, R. L., Campbell, D. & Sawa, A. PAKs inhibitors ameliorate schizophrenia-associated dendritic spine deterioration in vitro and in vivo during late adolescence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (In press).
2. Hayashi-Takagi, A. (CA), Vawter, M. P. & Iwamoto, K. Peripheral Biomarkers Revisited: Integrative Profiling of Peripheral Samples for Psychiatric Research.
Biol Psychiatry (2014).
3. Wei, J., (5名略) Hayashi-Takagi, A., (3名略) Yan, Z. Regulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors by Disrupted-in-Schizophrenia-1.
Biol Psychiatry 75, 414-424 (2014).
4. Hayama, T., (3名略) Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G. C., Matsuzaki, M. & Kasai, H. GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling.
Nature Neurosci. 16, 1409-1416 (2013).
5. Wang, Q., (12名略) Hayashi-Takagi, A., (9名略) Brandon, N. J. The psychiatric disease risk factors DISC1 and TNIK interact to regulate synapse composition and function.
Mol Psychiatry 16, 1006-1023 (2011).
6. Hayashi-Takagi, A., Barker, P. B. & Sawa, A. Readdressing synaptic pruning theory for schizophrenia: Combination of brain imaging and cell biology.
Commun Integr Biol 4, 211-212 (2011).
7. Kato, T., Hayashi-Takagi, A., Toyota, T., Yoshikawa, T. & Iwamoto, K. Gene

expression analysis in lymphoblastoid cells as a potential biomarker of bipolar disorder.

J Hum Genet 56, 779-783 (2011).

8. Koga, M., Serritella, A. V., Messmer, M. M., Hayashi-Takagi, A., (9名略) Sedlak, T. W. Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 596-602 (2011).

9. Hayashi-Takagi, A. (CA) & Sawa, A. Disturbed synaptic connectivity in schizophrenia: convergence of genetic risk factors during neurodevelopment. *Brain Res Bull* 83, 140-146 (2010).

10. Hayashi-Takagi, A., (17名略) Sawa, A. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nature Neurosci* 13, 327-332 (2010).

11. Seshadri, S., Kamiya, A., Yokota, Y., Prikulis, I., Kano, S., Hayashi-Takagi, A., (7名略) Sawa, A. Disrupted-in-Schizophrenia-1 expression is regulated by beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1-neuregulin cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 5622-5627 (2010).

(2) 特許出願

研究期間累積件数：0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著作物等

1. 河西春郎、(5名略)、林(高木) 朗子、「樹状突起スパイン異常と精神疾患」
生体の科学、65巻(1)、7-11、2014
2. 林(高木) 朗子、「グルタミン酸作動性シナプスと統合失調症」
神経化学、52巻(1)、5-12、2013
3. 林(高木) 朗子、河西春郎、「光遺伝学」
分子精神医学、11巻(4)、41-45、2011

主要な学会発表

1. Hayashi-Takagi A. Delineation of the Learning Engram by a Novel Synaptic Optogenetic Tool "Activated Synapse targeting PhotoActivatable Rac1 (AS-PaRac1)". *The sixth international neural microcircuit conference* (2013, July, Okazaki)
2. Hayashi-Takagi A. "AS-PA (Activated Synapse targeting PhotoActivatable) probe: a novel synaptic probe for Synaptic Optogenetics"
Neuro2013, Symposium "Optical control of neuronal function" (2013, July, Kyoto)
3. 林(高木) 朗子、「グルタミン酸シグナルと synaptic protection」、
第42回日本神経精神薬理学会、スタディグループ「精神疾患の治療開発～今、見逃せない新たな取り組み」(2012年10月、宇都宮)
4. 林(高木) 朗子、「Neural DISConnectivity by Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)」
第33回日本生物学的精神医学会、シンポジウム「統合失調症の病態研究から創薬への展開」、(2011年5月、東京)
5. Hayashi-Takagi A. "Disrupted in synapse by Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1): A dendritic spine as a pathogenesis of schizophrenia".
Neuroscience 2010, Minisymposium "Dendritic Spine Dysfunction in Mental Disorders" (2010, Nov, San Diego)

受賞

第 18 回日本生物学的精神医学会学術賞 (2010 年 10 月 8 日受賞)