

研究報告書

「脳深部微小神経回路を構成する細胞個性の機能的・分子的解釈と情動制御への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 竹本 さやか(木村 さやか)

1. 研究のねらい

感情を生み出す脳は、外界からの様々な刺激を受け、生体の内的状態に応じて生存や種の保存にとって有利なように行動や生体反応を変化させる。感情の障害は種々の精神障害においても観察され、その分子神経基盤の解明は喫緊の課題である。本研究では、シングルセルおよび少数細胞を対象とする解析技術を用いて、刺激に応じて様々な情動が生起する際に、脳内の個々の神経細胞でどのような神経活動が生じているのか、また、そういった神経活動の変化はどのような分子メカニズムで生じているのか、情動変容に関わる分子神経基盤の解明を目指した。

特に、本研究では、扁桃体や分界条床核という脳深部の存在する非常に小さな脳領域に注目した。不安や恐怖といった特にネガティブな情動制御に関与することが示唆され、注目される脳深部に存在する領域である。この領域は機能が異なる小さな神経核(垂核)の集合体であり、複数の細胞種が複雑に混在し構成されるため、多数の細胞を平均化して解析するようなこれまでの方法では、一つ一つの神経細胞の活動制御に関わる分子基盤を明らかとすることは困難であり、この状況を打開するには、微小領域におけるシングルセルあるいは少数細胞レベルでの解析技術を用いることが有効であると考えた。

そのために、独自の分子マーカー知見を手掛かりに、これらの微小領域の神経垂核の特定細胞種を標識することで、

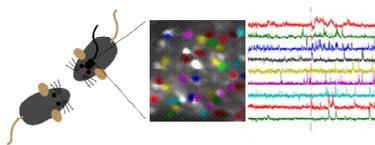
「生きた脳内における細胞ごとにことなる神経活動＝機能的個性」と、「少数細胞の発現機能分子＝分子的個性」の情動制御における役割を、同じ微小神経回路で解明する方法の確立を目指した。これら手法を用いることで、これまで解明が困難であった、情動変化に関わる新たな神経基盤とそれを支える分子メカニズムの解明を推進することが、本研究のねらいである。

情動制御に重要な脳深部微小領域(扁桃体および分界条床核)

課題①: 分子マーカー知見を活用した少数細胞の標識

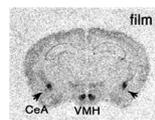
回路機能の解明

微小領域機能分子の同定

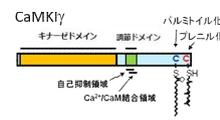


課題②: 経時的シングルセル活動計測法の開発

課題③: 少数細胞の情動制御における機能解明



課題④: 少数細胞機能分子の同定



(図1) 本研究のねらい

情動の制御に重要な扁桃体および分界条床核は、異なる小さな神経核(垂核)の集合体であり、多数の細胞を平均化して解析するようなこれまでの方法では、一つ一つの神経細胞の活動制御に関わる分子基盤を明らかとすることは困難である。本研究では独自の分子マーカー知見をいかし、情動変化に関わる全く新たな神経基盤とそれを支える分子メカニズムの解明を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

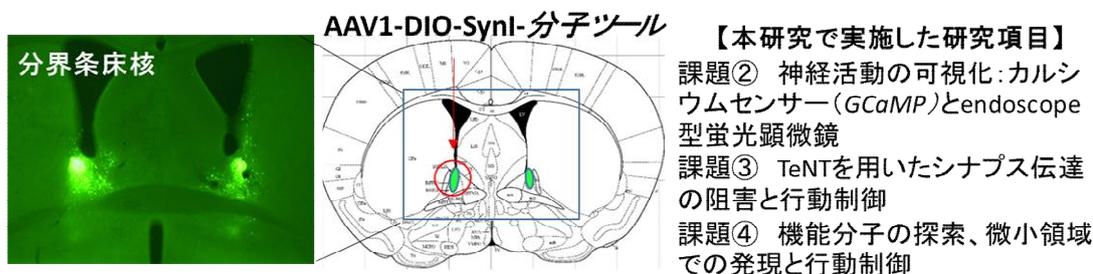
脳の深部には、扁桃体や分界条床核といった、情動制御に関与する、小さな領域が存在する。これらの微小領域において、異なる情動を引き起こす刺激は、個々の神経細胞でどのように情報処理されているのか？また、情動が変化するとき、個々の神経細胞ではどのような分子的な変化が生じるのか？本研究課題では、これらの疑問に答えるため、シングルセルあるいは少数細胞レベルでの解析技術を駆使し研究を推進し、新たな分子神経基盤を見出した。

第一にこれらの微小領域における研究を可能とするために、微小領域の標識が可能な分子マーカーの同定を推進した(課題①)。次に、見出された分子マーカーを用いて、微小領域である扁桃体中心核の特定細胞を対象とし、自由行動下においてシングルセルの解像度で神経活動を計測する、脳深部神経活動イメージング手法の確立を行った。この手法を用いて、様々な情動性刺激を与えた際の神経細胞の活動パターンを観察したところ、個々の情動性刺激によって異なる細胞応答を示すことが分かった(課題②)。また、同定した分子マーカーを発現する少数細胞の機能を解明するために、シナプス伝達の抑制による情動行動(恐怖記憶試験)の変化を検討し、分界条床核において恐怖記憶の成立に寄与するの新たな細胞群を同定した(課題③)。更に、扁桃体における情動制御において重要であることを見出した少数細胞に発現する機能分子を同定するため、候補遺伝子の過剰発現による情動行動変化を検討し、過剰発現によって社会性行動が変化することが分かった(課題④)。それぞれの課題について、詳細を以下に記す。

(2) 詳細

課題① : 分子マーカー知見を活用した少数細胞の標識

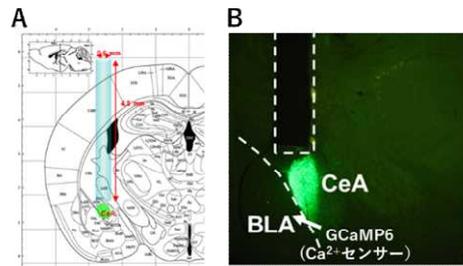
これまでの研究で、自らクローニングし機能解明を行ってきた CaMKI γ 分子が、扁桃体および分界条床核の特定神経垂核の細胞分子マーカーであることを見出し、この発見を契機に他の分子マーカーを探索した。その結果、分界条床核の特定垂核における複数の分子マーカーの同定に成功した。更に、見出した分子マーカー陽性細胞で cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウス(cre ドライバー系統)を入手・整備し、cre 依存的な発現カセットを有するアデノ随伴ウイルスの脳内局所投与やレポーター系統を用いた交配により、cre リコンビナーゼ系統の評価を実施、扁桃体および分界条床核の少数細胞の標識が可能であることを確認した。



(図2) 分子マーカーの同定と cre ドライバー系統を用いた微小領域の標識
cre 依存的なカセットを有するアデノ随伴ウイルスを cre ドライバー系統の脳内局所に感染させることで、微小領域(垂核)の特定神経細胞において目的のたんぱく質を発現する。

課題②: 経時的シングルセル活動計測法の開発

自由行動中のマウス脳深部領域より、シングルセルの解像度でカルシウムイメージングを実施する技術を用いて神経活動計測を行った。具体的には、小型統合型蛍光顕微鏡 (inscopix 社) と細長い GRIN レンズを用い、蛋白性 Ca^{2+} プロブ (GCaMP6) を発現させた脳深部神経活動を可視化する手法である。課題①で確立した方法を用いて、扁桃体中心核微小領域の特定神経細胞において、蛋白性カルシウムセンサー (GCaMP6) を発現させカルシウムイメージングを実施した。様々な情動性刺激を与えた際の扁桃体中心核の神経活動を、自由行動下において計測することに成功し、これまでに報告のない活動パターンを見出した。



(図 3) 小型蛍光顕微鏡を用いた扁桃体神経活動計測法の確立

A: 扁桃体中心核は脳深部に存在するため、グリーンレンズを用いて蛍光イメージングを実施した。B: 遺伝子改変動物の脳内に GCaMP6 を発現させ、実際に神経活動観察を行った扁桃体中心核 (緑色) と観察に用いたグリーンレンズ (水色) の概略図。

課題③: 少数細胞の情動制御における機能解明

分界条床核において新たに見出された分子マーカーを発現する少数細胞の、情動制御における機能解明を推進した。分子マーカーの cre ドライバー系統に cre 依存的アデノ随伴ウイルスを用いて、テタヌトキシン (TeNT) を発現させ、本細胞群のシナプス伝達を阻害した際の恐怖条件付け記憶を測定した。その結果、テタヌトキシンを発現した個体では恐怖条件付け記憶が減弱し、この細胞群のシナプス伝達は恐怖記憶の成立に必要なことが分かった。分界条床核の垂核および細胞腫ごとの機能は未だ不明な点が多く、本結果によりその一端が明らかとなった (Fujiwara et al. 未発表)。

課題④: 少数細胞機能分子の同定

各分子マーカーを発現する少数細胞において機能し情動制御に関わる機能分子の同定を推進した。

④-1: 候補遺伝子の情動制御における機能

$\text{CaMKI}\gamma$ は、扁桃体中心核および分界条床核の微小領域に発現し、その様々な生化学的な特性からシナプス機能を制御し、情動制御においても重要な役割を果たす可能性が示唆されている。既にノックアウトマウスにおける情動行動変化を見出していたため、本研究では、 $\text{CaMKI}\gamma$ を扁桃体中心核の少数細胞において過剰発現させた際の行動変化を検討した。その結果、本酵素を扁桃体中心核の少数細胞において過剰発現させると、細胞腫選択的に情動性行動に変化をもたらすことが判明した (Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。

④-2: 新規遺伝子の探索

扁桃体や分界条床核の微小領域の少数細胞で機能する新規遺伝子の探索のため、課題①で同定した分子マーカーの cre ドライバー系統と蛍光レポーター系統を交配することで、微小領域の蛍光標識を行った。その後、蛍光標識を手掛かりに、微小領域を採取し遺伝子発現解析を実施することで、これらの領域間で発現の変動を示し、情動制御において重要な役割を有することが推測される新たな候補遺伝子の探索を推進した。

3. 今後の展開

本研究課題では、扁桃体や分界条床核の微小領域に焦点を当て、シングルセルあるいは少数細胞の解析技術を駆使して、神経活動計測ならびに機能分子の同定を目指した研究を推進した。各微小領域(亜核)あるいは細胞腫を限定した解析を行うことで、これまで埋もれてしまっていた神経活動や遺伝子発現変化を見出し、これまで未解明である情動制御に寄与する新たな分子神経機構の同定に繋がると考える。また、少数細胞を対象に、両側面からの研究を推進する技術を確立したことで、今後はこれらを組み合わせることが可能となり(情動変化に繋がる神経活動変化をもたらす分子機構の解明や、逆に情動に影響する遺伝子がどのような神経活動変化を引き起こすかなど)、これまでの研究を補完し情動制御についての分子神経基盤の理解が一層深まることが期待される。また、カルシウムセンサーを用いた神経活動計測についても、次々と改良されたセンサーの開発が進んでおり、これらを活用することでより詳細な神経活動計測が可能となることが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

研究目的の達成状況: 個々の技術の確立を進めると同時に、情動制御の新規分子神経機構を見出し、研究目的は達成しつつある。見出された知見について早急に結論を得て論文報告を行うとともに、今回の研究によって派生した結果を発展させ、情動制御を多面的に理解することが重要と考える。

研究実施体制: 2年度目から技術補佐員を雇用し、効率的な研究推進が実現した。

研究費執行: 年度ごとに当初予算を執行しており計画的な執行であった。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果: 先駆的研究技術を用いることで、これまで埋もれていた、情動制御の分子機構を見出すことが期待され、それにより、精神疾患の生理的病態生理的理解を深め、治療法開発の可能性の提示に繋がるなど、社会的な波及効果が期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

脳深部に存在する分界条床核や扁桃体などの微小領域に焦点を当て、遺伝子工学および蛍光標識技術を駆使することで、マウス脳の微小領域を標識し、重要な役割を果たす分子を同定し、その機能解明を推進してきました。更に、マウス個体レベルで情動の変化をもたらす様々な刺激を与えた際の脳深部の細胞応答を単一細胞レベルで可視化することによって、分界条床核と扁桃体の重複した分子実体と機能を明らかにすることに成功しつつあり、これらの成果は高く評価できます。本研究に新たな解析技術を加え、さらに発展させてゆくことで、生物個体レベルでの情動の理解が1細胞の分解能で進展し、様々な要因によって生じる情動異常の病態解明や治療へと繋がることが期待されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kamijo S, Ishii Y, Horigane SI, Suzuki K, Ohkura M, Nakai J, Fujii H, **Takemoto-Kimura S**, Bito H. A Critical Neurodevelopmental Role for L-Type Voltage-Gated Calcium Channels in Neurite Extension and Radial Migration. **J Neurosci**. 2018, 38(24):5551-5566.
2. Nishiguchi KM, Fujita K, Tokashiki N, Komamura H, **Takemoto-Kimura S**, Okuno H, Bito H, Nakazawa T. Retained Plasticity and Substantial Recovery of Rod-Mediated Visual Acuity at the Visual Cortex in Blind Adult Mice with Retinal Dystrophy. **Mol Ther**. 2018, 26(10):2397-2406.
3. Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane S, Sakamoto M, Kawakami R, Yamaguchi K, Otomo K, Yokoyama H, Kim R, Yokoyama T, **Takemoto-Kimura S**, Abe M, Okamura M, Kondo Y, Quirin S, Ramakrishnan C, Imamura T, Sakimura K, Nemoto T, Kano M, Fujii H, Deisseroth K, Kitamura K and Bito H. Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for in vivo imaging of complex brain circuit dynamics. **Cell**. Accepted in principle.

(2) 特許出願

なし

(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)

・論文(総説)発表

1. **Takemoto-Kimura S**, Suzuki K, Horigane S, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, Fujii H, Bito H. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. **J Neurochemistry**. 2016, 141(6):808-818.
2. **Takemoto-Kimura S** and Horigane S. Exploring the function of calcium-dependent phosphorylation in neuronal morphogenesis and circuit formation. **Jpn. J. Neuropsychopharmacol.** .2017, 37:163-16.

・学会発表(シンポジウム講演)

1. **竹本さやか**。神経細胞形態制御を担うカルシウム依存性リン酸化経路の神経機能解明。
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会・福島県郡山市ビッグパレットふくしま,
2016 年 3 月 29 日
2. **竹本さやか**、遠藤俊裕、金亮、鈴木敢三、藤井哉、尾藤晴彦。扁桃体神経回路におけるカルシウム依存的リン酸化経路と情動行動。第 46 回日本神経精神薬理学会年会(韓国、ソウル), 2016 年 7 月 2 日
3. **Takemoto-Kimura S**, Ueda S, Bito H. Calcium-dependent phosphorylation signaling in emotional and social amygdala circuits. 第 41 回日本神経科学大会(神戸), 2018 年 7 月 27 日
4. **Takemoto-Kimura S**, Ueda S, Bito H. Exploring molecular pathways involved in central amygdala-dependent control of emotional behaviors. 第 61 回日本神経化学会大会(神戸), 2018 年 9 月 7 日