

平成 29 年 9 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06078

研究課題名(和文)加齢脳特異的シナプス機能異常マウスにおける神経活動依存性NMDA受容体動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of activity-dependent dynamics of NMDA receptors in mice with age-dependent synaptic dysfunction

研究代表者

花村 健次 (Hanamura, Kenji)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40361365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：2光子励起レーザー顕微鏡を用いたin vivoイメージングにより、深麻酔下でThy1プロモーターの下流にGFPを発現したトランスジェニックマウスの大脳皮質錐体ニューロンの樹状突起スパインを観察した。加齢脳特異的シナプス機能異常を示すドレブリンの発達期のアイソフォーム変換が起こらないマウスやドレブリンの全てのアイソフォームをノックアウトしたマウスのヘテロ接合体について解析したところ、これらの遺伝子改変マウスのスパインのターンオーバーが野生型と異なる傾向があることが明らかになった。これらのマウスのシナプスにおけるNMDA受容体の量については生化学的に検出した。

研究成果の概要(英文)：In vivo imaging by using two-photon laser microscopy under deep anesthesia revealed dendritic spine morphology of pyramidal neurons in the cerebral cortex of transgenic mice expressing GFP under the control of Thy1-promoter. Analysis of heterozygotes of knockout mice deficient in drebrin A-specific exon or all drebrin isoforms tended to show some changes in turnover rate of dendritic spines compared with wild-type mice. The amount of NMDA receptors in synaptosomes were detected by western blotting.

研究分野：神経生物学、神経薬理学、神経化学

キーワード：樹状突起スパイン 2光子励起レーザー顕微鏡 ドレブリン NMDA受容体

### 1. 研究開始当初の背景

NMDA 型グルタミン酸受容体は記憶学習、シナプス可塑性に重要なだけでなく、各種神経疾患においても、その機能異常が病態と関わっている。中でも老化に伴う認知機能低下と関連が深いアルツハイマー病で NMDA 受容体の量が減少することが知られており、アミロイド 凝集前の初期の認知機能低下と関連していると考えられている。一方で残された NMDA 受容体が、異常に活性化していることが、後期の神経細胞死と関連した認知機能低下と結びついているとする、“アルツハイマー病のグルタミン酸仮説”に基づいた治療薬として、NMDA 受容体の弱い阻害剤であるメマンチンが知られている。このように NMDA 受容体の局在や機能を正しく制御することは、老化やアルツハイマー病に伴う認知機能低下を防ぐ上で重要であるが、そのメカニズムの理解は十分とは言えない。

これまでに NMDA 受容体の局在に影響を与えるメカニズムとして、興奮性シナプス後部のアクチン細胞骨格系を介した制御機構について明らかにしてきた。興奮性シナプス後部のアクチン結合タンパク質である drebrin は、胎仔期に発現量の多い E (embryonic) isoform と成熟脳において発現量という主に 2 つの isoform があり、シナプス形成期に isoform が変わる。これまでに A isoform 特異的な exon のノックアウト(DAKO)マウスを作製し、シナプス形成期の drebrin の isoform 変換を起こさせないことで、アクチン細胞骨格系の成熟を起さなくしたところ、成体脳の脳皮質表層における NMDA 受容体の神経活動依存的なシナプスでの集積が阻害されることを明らかにしてきた (Aoki et al., 2009)。しかし、その詳細なメカニズムは明らかでなかった。

一方で、この DAKO について、これまでその行動解析により、状況依存的な学習行動に異常があることが明らかとなってきた (Kojima et al., 2010)。その後の、詳細な行動と電気生理学的な解析から、この DAKO マウスに週令依存的な学習機能とシナプス可塑性の異常が明らかとなった (Kojima et al., 2016; unpublished data)。10 週令までの若いマウスだと正常な学習行動や長期増強を示すのに対し、30 週令以降の加齢が進んだマウスでは、これらの異常が見られた。

### 2. 研究の目的

本研究では、drebrin の発達期の A isoform 変換の起こらない DAKO マウスを“加齢脳特異的なシナプス機能異常マウス”として用いることができるのではないかと考え、神経活動依存的な NMDA 受容体の局在変化の異常が、学習障害やシナプス可塑性の異常などと同様に週令依存性があるかを明らかにしたいと考えた。本研究ではその手始めとして、大脳新皮質の樹状突起スパインの動態に与える NMDA 受容体の活性の役割や、drebrin

によるスパインの動態に与える影響を明らかにしようとした。また、NMDA 受容体の動態については、pH 感受性のある SEP-NR2A や SEP-NR1 を使用する予定であったが、条件検討が間に合わなかったため、生化学的に解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

drebrin の発達期の A isoform 特異的な exon のノックアウトマウス (DAKO マウス; Aoki et al., 2009; Kojima et al., 2010; Kojima et al., 2016)、drebrin の全ての A isoform のノックアウトマウス (DXKO マウス、未発表)、Thy1 プロモーターの下流に GFP、或いは YFP を発現するトランスジェニックマウス (M-line, H-line; Feng et al., 2000) を実験に用いた。また、DAKO マウス、或いは、DXKO マウスと M-line をかけ合わせて得られた、一部のニューロンに GFP を発現する、DAKO マウス、DXKO マウスのヘテロ接合型の個体も実験に用いた。NMDA 受容体の活性に依存した樹状突起スパインの動態を解析するためには、ウレタンを腹腔投与し、深麻酔下で実験を行った。手術法として、open skull (open cranial window) 法を用い、カバーガラスと硬膜の間は人工脳脊髄液を充填した。薬剤を脳表面から投与するためのアレンジとして、一部の動物に対しては、カバーガラスは観察領域上については覆うものの、一部、硬膜表面が露出するように設置した。NMDA 受容体の阻害剤としては、MK801 を腹腔、あるいは脳表面より投与した。時間間隔 (1 週間) をおいて観察する際には、ケタミンとキシラジンを腹腔投与し、深麻酔下で実験を行った。この場合は、頭蓋骨の内側の皮質骨を残存し、外側皮質骨はドリルや、手術用ナイフで削開した。in vivo イメージングのために多光子励起レーザー走査型顕微鏡 (FVMPE-RS, Olympus) を用い、得られた画像の解析には Metamorph (Universal Imaging, West Chester, PA) を用いた。

### 4. 研究成果

(1) Thy1-GFP マウス、及び、Thy1-YFP マウスを用いて、ウレタンの腹腔投与による深麻酔下で 2 光子励起レーザー顕微鏡を用いて in vivo imaging 観察をした。そして、NMDA 受容体のアンタゴニストである MK801 を脳表面、或いは腹腔から投与したところ、薬液投与 1 時間程度で死亡する個体が見られた。このことから、NMDA 受容体の活性依存的なシナプスの変化を観察する際には、そのアンタゴニストの濃度や麻酔条件、観察条件などを検討する必要があることが明らかになった。

(2) 麻酔の影響を排除するため、無麻酔下で MK801 を腹腔投与し、大脳皮質のシナプスにおける NMDA 受容体の量を解析しようとした。このためシナプトソームを取得し、NMDA 受容体の NR2A サブユニットや PSD95 等のシナプ

ス構成タンパク質の量を Western Blotting により検出しており、現在、まだ解析途中であるが、野生型マウスと DAKO マウス、DXKO マウスなどの Drebrin 遺伝子改変マウスの生体脳のシナプスにおける NMDA 受容体の量への神経活動による影響を解析可能なことが明らかとなった。

(3) Drebrin の生体脳内のシナプスにおける役割を明らかにする上で、Thy1-GFP マウスをケタミンとキシラジンをを用いて深麻酔し、2 光子励起レーザー顕微鏡下で樹状突起スパインの形態を観察した。そして、1 週間後に再び、同様にスパインの形態観察を行い、全体のスパインの中に占める安定なスパイン (Persistent)、それ以外のスパイン (Dynamic) のうち、新たに出現したスパイン (Added)、消失したスパイン (Retracted) の割合を調べた(図 1)。Drebrin の発達期のアイソフォーム変換の起こらない DAKO マウスや Drebrin の全てのアイソフォームを欠損したマウスである DXKO マウスのヘテロ接合型マウスにおいても、これらの割合が変化している傾向が見られた (data not shown)。しかし、これらは、いずれも統計的に有意な変化ではなかった。このため、今後スパインの動態を解析して Drebrin の働きを検出する上では、ホモ接合型を解析したり、週令の進んだ動物を使用するべきであると考えられた。また、NMDA 受容体の神経活動依存的な局在変化を解析する際には、Drebrin がスパインの安定性を担っている可能性があることを考慮して、実験する必要があるといえる。

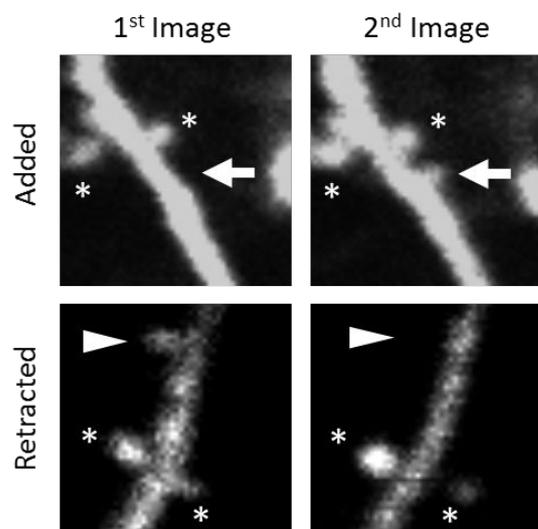


図 1. Drebrin 遺伝子改変マウスの樹状突起スパインのターンオーバーの解析。(A) 最初の *in vivo* イメージング(1<sup>st</sup> Image)後、1 週間後に再び観察を行った(2<sup>nd</sup> Image)。1 週間の間に、新たに出現したスパイン(Added、矢印)、消失したスパイン (Retracted) などを Dynamic なスパインと、それ以外の安定なスパイン(Persistent)などに分類した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Shirao T, Hanamura K, Koganezawa N, Ishizuka Y, Yamazaki H, Sekino Y. (in press) The role of drebrin in neurons" J Neurochem, 査読有、doi: 10.1111/jnc.13988.

② Koganezawa N, Hanamura K, Sekino Y, Shirao T.(in press) The role of drebrin in dendritic spines. Mol Cell Neurosci, 査読有 doi: 10.1016/j.mcn.2017.01.004.

③ Koganezawa N., Hanamura K., Shirao T.(2017) Progress in applications of iPSC-derived neurons for evaluation of drugs. Nihon Yakurigaku Zasshi, 査読有、149:104-109. doi: 10.1254/fpj.149.104.

Kojima K., Yasuda H., Hanamura K., Ishizuka Y., Sekino Y., Shirao T. (2016) Drebrin A regulates hippocampal LTP and hippocampus-dependent fear learning in adult mice" Neuroscience, 査読有、324: 218 - 226 doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.015.

〔学会発表〕(計 19 件)

清水英雄、小針彩奈、須知由未子、関口敬洋、花村健次、白尾智明、田辺光男、関野祐子、佐藤薫 「ベンゾジアゼピン系薬剤の培養海馬神経細胞シナプス数に対する作用 医薬品の中樞神経系有害反応予測のための新規 *in vitro* 評価系確立の試み」第 90 回日本薬理学会年会、長崎、2017 年 3 月 17 日

② 岡 丈朗、花村 健次、白尾 智明 「培養神経細胞を用いたハイコンテンツイメージングによるシナプスの解析」第 90 回日本薬理学会年会、長崎、2017 年 3 月 15 日

③ Hanamura K., Tomoaki Shirao T. (2017) Stable fraction of drebrin in dendritic spines is regulated by the isoform conversion. The 7th International Society of Radiation Neurobiology Conference. Feb 9-10, 2017 (Yuzawa, Niigata, Japan)

Oka T., Hanamura K., Koganezawa N., Kamiyama K., Tanaka N., Shirao T. (2017) High-content imaging analysis of glutamatergic synapses using primary cultured neurons. The 7th International Society of Radiation Neurobiology Conference. Feb 9-10, 2017 (Yuzawa, Niigata, Japan)

Shirao T., Ishizuka Y., Hanamura K., Kanda Y., Sekino Y. (2016) Quantitative imaging analysis of amyloid beta toxicity using cultured neurons. The 5th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (ASCCT) September 29-30. (Durham, NC, USA)

清水英雄、小針彩奈、須知由未子、関口敬洋、花村健次、白尾智明、田辺光男、関野祐子、佐藤薫「シナプスイメージングに基づき医薬品の認知機能影響リスクを予測する in vitro 評価系確立の試み」第 59 回日本神経化学学会大会、福岡、2017 年 9 月 8 日～10 日

花村健次、白尾 智明「スパイン内のドレブリンの安定性は発達期のアイソフォーム変換によりアクチン細胞骨格依存的に増加する」第 39 回日本神経科学大会、横浜、2016 年 7 月 20 日～22 日

Hanamura K., Kojima N., Yasuda H., Yamazaki H., Shirao T. (2016) Maturation of actin cytoskeleton in dendritic spines and the age-dependent role in synaptic plasticity” 第 93 回日本生理学会大会、札幌、2016 年 3 月 22 日～24 日 (in Symposium “Molecular mechanisms underlying synapse formation and remodeling during development and age-related synaptopathy”)

⑨ Shirao T., Koganezawa N., Ishizuka Y., Yamazaki H., Hanamura K., Sekino Y. (2016) Toxic Effects of Astemizole on Neurite Growth and Synaptogenesis of CNS neurons. The 55th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 13-17. (New Orleans LA, USA)

⑩ Miao S., Hanamura K., Puspitasari A., Koganezawa N., Shirao T. (2016) NMDA receptors are involved in X-irradiation-induced decrease in drebrin clusters within dendritic spines of cultured hippocampal neurons in vitro. The 6th International Society of Radiation Neurobiology Conference. February 12-13 (Nagasaki, Japan)

Miao S., Koganezawa N., Hiruma T., Hanamura K., Puspitasari A., Roppongi R.T., Shirao T. (2015) X-irradiation-induced decrease in drebrin clusters within dendritic spines of cultured hippocampal neurons: Association with NMDA receptor and histone deacetylase activities. Society for Neuroscience 45th Annual Meeting, Oct. 17-21 (Chicago IL, USA)

Koganezawa N., Yamazaki H., Roppongi R.T., Arayama Y., Shirao T., Ishizuka Y., Hanamura K., Tanaka N., Sekino Y. (2015) Axonal growth of human iPSCs-derived neurons is slow. 25th Neuropharmacology Conference, Synaptopathy-from biology to Therapy, Oct. 15-16. (Chicago IL, USA)

Miao S., Koganezawa N., Puspitasari A., Hiruma T., Hanamura K., Roppongi R.T., Shirao T. (2015) X-irradiation-induced drebrin decrease in dendritic spines associated with fear memory is mediated by NMDA receptor activity. 25th Neuropharmacology Conference, Synaptopathy-from biology to Therapy, Oct. 15-16. (Chicago IL, USA)

Shirao T., Ishizuka Y., Hanamura K., Tanaka N., Sekino Y. (2015) Inhibition of histone deacetylase activity protects the synaptopathy induced by amyloid beta oligomers. 25th Neuropharmacology Conference, Synaptopathy-from biology to Therapy, Oct. 15-16. (Chicago IL, USA)

Shirao T., Ishizuka Y., Hanamura K., Koganezawa N., Ootsu M., Yamazaki H. (2015) Differential effects of astemizole on the neurite growth and synaptogenesis of neurons. 15th Annual Meeting of Safety Pharmacology Society Meeting. Sep 28- Oct 1 (Prague, Czech Republic)

Miao S., Puspitasari A., Hanamura K., Koganezawa N., Roppongi R.T., Shirao T. (2015) NMDA receptors are involved in X-irradiation-induced decrease in drebrin clusters within dendritic spines of cultured hippocampal neurons. 第 58 回日本神経化学学会、さいたま、2015 年 9 月 11 日～13 日

Oka T., Roppongi R.T., Hanamura K., Shirao T. (2015) 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, Ketanserin induces change in the localization of an actin-binding protein drebrin in hippocampal neurons. 第 58 回日本神経化学学会、さいたま、9 月 11 日～13 日

Hanamura K., Sheffler-Collins S.I., Xia N., Washburn H., Tillu D.V., Hassler S., Spellman D.S., Zhang G., Neubert T.A., Price T.J., Dalva M.B. (2015) EphB extracellular phosphorylation controls pathological pain and synaptic function of NMDA receptors” 第 58 回日本神経化学学会、さいたま、9 月 11 日～13 日

Yasuda H., Kojima N., Hanamura K., Shirao T. (2015) Deletion of drebrin A impairs hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent fear learning in adulthood” 第 58 回日本神経化学大会、さいたま、9月11日～13日

〔図書〕(計1件)

花村健次、白尾智明 (2016) 「ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた医薬品の副作用予測」、iPS 細胞の安全・高品質な作製技術、技術情報協会 p.170-174

〔その他〕

ホームページ等

[http://neuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/?page\\_id=96](http://neuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/?page_id=96)

6. 研究組織

(1)研究代表者

花村 健次 (HANAMURA KENJI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40361365

(2)研究分担者

(なし)

(3)連携研究者

高鶴 裕介 (TAKATSURU YUSUKE)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30446265

(4)研究協力者

(なし)