

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18360

研究課題名(和文) 投射元に依存した多様なシナプス動態のin vivoイメージング解析

研究課題名(英文) Analysis of synapse dynamics receiving the different inputs

研究代表者

田中 慎二(Tanaka, Shinji)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：60548494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大脳皮質の錐体細胞に入力するシナプスを、樹状突起上の空間的配置や分子マーカールをもとに分類し、それぞれのグループが示すシナプス動態のパターンに違いがあるか検討した。二光子顕微鏡によるin vivoイメージング解析の結果、大脳皮質2/3層錐体細胞のapical樹状突起とbasal樹状突起では同じ細胞内でもスパインのターンオーバーは異なっていること、また、スパインターンオーバーの違いはgephyrinが集積してないスパインの安定性が異なる事に起因していることが示された。以上から、興奮性シナプスの動態は樹状突起の空間的配置や神経回路に依存して異なる調節を受けている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the turnover rate of dendritic spines classified by the spatial location and synaptic marker. In vivo two-photon imaging of the somatosensory cortex showed that the turnover rate of dendritic spines was different between apical and basal dendrites of layer 2/3 pyramidal neurons. The stability of gephyrin-positive spines which are received the inputs from the thalamus, was substantially high both in apical and basal dendrites. Thus, the difference in spine turnover rate between apical and basal dendrites was attributed to the stability of gephyrin-negative spines. Since the apical and basal dendrites are reported to receive the inputs from different sources, these results suggest that the regulation of spine dynamics is different between the spines which receive the different inputs.

研究分野：神経科学

キーワード：in vivo imaging スパイン シナプス

1. 研究開始当初の背景

(1) 大脳皮質は脳の中でも高次機能を担う部位であり、複雑な神経ネットワークによって様々な情報処理が行われる。神経細胞同士の情報伝達の場であるシナプスは、神経細胞による情報処理の根幹を担う構造であり、シナプスの形成、消失、形態変化を追跡することは、神経回路の機能が変化する様子を捉える上できわめて重要な情報となる。

(2) シナプス動態を追跡する有用な手段として、いまや顕微鏡イメージングは欠かせない技術となっている。特に二光子励起レーザー顕微鏡を用いることで、生きたマウスの脳内イメージングが実現し、樹状突起スパインを指標としたシナプスレベルでの *in vivo* イメージング研究が数多く報告されている (Holtmaat et al., *Nature*, 2005; Hofer et al., *Nature*, 2009; Yang et al., *Nature*, 2009)。しかしながら、これまでの研究では樹状突起上のスパインを区別なく定量解析していたため、同じ樹状突起上のスパインでも投射元の違いによって、その動態が異なる可能性についてはあまり考慮されてこなかった。

(3) 抑制性シナプスのシナプス後部足場タンパク質をマーカーとすることで、大脳皮質錐体細胞のスパインを、視床からの入力を受けるものと他の大脳皮質細胞からの入力を受けるものに分類する事が可能である (Isshiki et al., *Nat Commun*, 2014)。また、channelrhodopsin-2 を用いたシナプス入力位置のマッピング解析によると、大脳皮質3層の錐体細胞に作られる4層神経細胞からの入力は主に細胞体か basal dendrite に存在する一方で、他の2/3層の錐体細胞からの入力のほとんどは apical dendrite に形成されていることが報告されている (Petreanu et al., *Nature*, 2009)。

2. 研究の目的

大脳皮質2/3層の錐体細胞に入力するシナプスを、樹状突起上の空間的配置や分子マーカーをもとに分類し、それぞれのグループが示す特徴的な変化パターンを抽出する。これにより、投射元に依存した多様なシナプス動態パターンを見出し、個別の神経回路の特徴、性質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質錐体細胞のスパインの一部には興奮性シナプスのみならず抑制性シナプスも形成されることがあり、これらスパインのほとんどは視床からの投射を受けるスパインである事が知られている (Kubota et al., *J Neurosci*, 2007, Isshiki et al., *Nat Commun*, 2014)。従って抑制性シナプスの足場タンパク質である gephyrin をマーカーとすることで、スパインへの投射元を区別する

事が可能となる。顕微鏡イメージングで gephyrin の集積部位を可視化するため、GFP 標識された gephyrin (gephyrin-GFP) を子宮内電気穿孔法によりマウス大脳皮質錐体細胞に発現させた。胎生 15 日のマウス脳室内に DNA 溶液を注入し、電気パルスをかけることで脳室周囲の神経幹細胞に DNA を遺伝子導入した。この時、神経細胞の形態も同時に可視化するため、赤色蛍光タンパク質である DsRed2 を発現する DNA も同時に遺伝子導入した。

(2) 遺伝子導入を行ったマウスが成熟後 (2ヶ月齢以上) 顕微鏡イメージングのための観察窓を頭蓋骨に作成する手術を行った。手術法については、深部までイメージングが可能な open-skull 法を採用した。

(3) 観察窓の作製を行った麻酔下のマウスを二光子顕微鏡対物レンズ下に静置し、脳内のイメージングを行った。二光子励起に使用するパルスレーザーの波長を 920nm にセットし、25 倍対物レンズ (NA1.1) を使用して、体性感覚野の画像を取得した。スパイン動態解析のための画像は、73 x 73 μm の画像サイズ (1 ピクセルあたり約 140nm) で取得した。また、GFP のシグナルと DsRed2 のシグナルはダイクロイックミラーで分離し同時に取得した。1回目の観察を終えた後、マウスをケージに戻し、3日後に再度同じ場所を観察した。1回目のイメージングと同じ場所は画像取得を行った部位の脳表血管画像を取得をもとに同定した。

(4) 1回目と2回目の画像を比較し、形成、消失したスパインの数を測定した。また、1回目、2回目のイメージングでカウントしたスパインの数をもとに、スパインの形成率、消失率を算出した。Gephyrin-GFP の集積は、樹状突起上のバックグラウンドシグナルより一定の強度以上のものを抽出する事で同定した。Apical dendrite、basal dendrite それぞれのスパインについて gephyrin の集積の有無を決定し、これらの形成率、消失率を算出した。

4. 研究成果

(1) 脳表面から 200-300 μm の深さに位置する basal dendrite 上のスパインを観察するためには、頭蓋骨の一部を除去しカバーガラスを取り付ける open skull 法による手術が必要となる。しかし、手術後まもなく観察野が曇る事象が頻発したため、安定して観察可能な観察野を作成する方法を模索した。頭蓋骨除去の方法や抗炎症剤の投与などを検討した結果、カバーガラスを脳表面に密着させることで観察野が曇る頻度を大きく下げること成功した。

(2) 神経細胞の形態と gephyrin 集積部位

を同時に観察するため、子宮内電気穿孔法を用いてマウス大脳皮質 2/3 層の錐体細胞に DsRed2 と gephyrin-GFP を共発現させた。マウスが成熟後、(1) で確立した方法で頭蓋骨に観察野を作成し、二光子顕微鏡による観察を行って apical dendrite と basal dendrite の画像を取得した。1 回目の画像取得から 3 日後に同じ領域の画像を取得した。新しく形成されたスパインと消失したスパインを解析した結果、apical dendrite のスパインの形成、消失率が 5~6% だったのに対し、basal dendrite の形成、消失率は 2~3% であり、同じ神経細胞においても異なる樹状突起領域で安定性が異なる事が示された。

(3) 先行研究では gephyrin が集積するスパインは視床からの投射を受けるスパインであり、安定性が非常に高いことが報告されている (Isshiki et al., 2014)。Apical dendrite と basal dendrite において gephyrin 集積スパインの安定性に違いがあるか解析したところ、どちらの領域においても gephyrin 集積スパインは非常に高い安定性を示した。よって、gephyrin 集積スパインの安定性は樹状突起領域に依存しないことが示された。

(4) 次に apical dendrite と basal dendrite で gephyrin 集積スパインの割合に違いがあるか調べた。Apical dendrite では gephyrin が集積しているスパインの割合が全スパインの 20% 程度であったが、basal dendrite の gephyrin 集積スパインの割合は 12% 程度であった。すなわち、apical dendrite は basal dendrite に比べ安定性の高い gephyrin 集積スパインの割合が高いにも関わらず、スパインのターンオーバーは basal dendrite よりも高いことが分かった。実際に gephyrin が集積していないスパインの形成、消失率を算出したところ、apical dendrite では 7% 程度、basal dendrite では 3~4% 程度であり、大きく異なっていた。

(5) 以上の結果から、一つの神経細胞であっても樹状突起の領域や投射元の違いによってスパインの安定性が異なることが示された。Apical dendrite 上のスパインは basal dendrite よりも形成、消失率が高かったが、視床からの投射を受ける gephyrin 集積スパインの安定性については違いがなかった。つまり、apical dendrite と basal dendrite のスパインターンオーバーの違いは gephyrin 集積が認められない、大脳皮質間シナプスの安定性の違いに起因すると考えられる。先行研究では apical dendrite は主に他の 2/3 層の錐体細胞からの入力を受け、basal dendrite は主に 4 層の神経細胞からの入力を受ける事が示唆されている (Petreanu et al., 2009)。よって、大脳皮質間のシナプスであっても投射元が異なれば、その安定性は異なる調節を

受けている可能性がある。

今後、apical dendrite と basal dendrite のスパインに注目する事で、シナプスの安定性を調節するメカニズムの一端が明らかになることが期待される。また、自閉スペクトラム症のモデルマウスではスパインの形成、消失率が増加する事が報告されているが、どのような種類のシナプスで安定性が障害されるかについて、本研究の知見が生かされることが期待される。

< 引用文献 >

Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E, Svoboda K. Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature*. 2006, 441, 979-983.

Hofer SB, Mrcic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hübener M. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature*. 2009, 457, 313-317.

Isshiki M, Tanaka S, Kuriu T, Tabuchi K, Takumi T, Okabe S. Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism. *Nat Commun*. 2014, 5, 4742.

Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y. Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *J Neurosci*. 2007, 27, 1139-1150.

Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K. The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature*. 2009, 457, 1142-1145.

Yang G, Pan F, Gan WB. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*. 2009, 462, 920-924.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Miyazaki J, Iida T, Tanaka S, Hayashi-Takagi A, Kasai H, Okabe S, Kobayashi T. Fast 3D visualization of endogenous brain signals with high-sensitivity laser scanning photothermal microscopy. *Biomed Opt Express*. 査読有、2016、7 巻、1702-1710. doi: 10.1364/BOE.7.001702.

Parajuli LK, Tanaka S, Okabe S.

Insights into age-old questions of new dendritic spines: From form to function. Brain Res Bull. 査読有、2017、129 巻、3-11. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.07.014.

Cornelia-Koeberle S, Tanaka S, Kuriu T, Iwasaki H, Koeberle A, Schulz A, Helbing DL, Yamagata Y, Morrison H, Okabe S. Developmental stage-dependent regulation of spine formation by calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and Rap1. Sci Rep. 査読有、2017、7 巻、13409. doi: 10.1038/s41598-017-13728-y.

Higashi T, Tanaka S, Iida T, Okabe S. Synapse Elimination Triggered by BMP4 Exocytosis and Presynaptic BMP Receptor Activation. Cell Rep. 査読有、2018、22、919-929. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.101.

Morimoto MM, Tanaka S, Mizutani S, Urata S, Kobayashi K, Okabe S. In Vivo Observation of Structural Changes in Neocortical Catecholaminergic Projections in Response to Drugs of Abuse. eNeuro. 2018、5 巻. doi: 10.1523/ENEURO.0071-17.2018.

〔学会発表〕(計 4 件)

田中慎二、岩崎広英、岡部繁男 Analysis of spine stability in the mouse neocortex in vivo. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 29 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Shinji Tanaka, Masaaki Isshiki, Toshihiko Kuriu, Katsuhiko Tabuchi, Toru Takumi, Shigeo Okabe. In vivo two-photon imaging of synapse dynamics in mouse models of autism. The 2nd East-Asia microscopy conference. 2015 年 11 月 25 日、姫路商工会議所 (兵庫県姫路市)

田中慎二、岡部繁男 Analysis of spine structure and stability by two-photon in vivo imaging. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術誌集会、2016 年 3 月 29 日、ビッグパレットふくしま (福島県郡山市)

田中慎二、一色真明、井口理沙、浦田真次、水谷俊介、栗生俊彦、田淵克彦、内匠透、岡部繁男 Abnormal synapse dynamics in mouse model for autism spectrum disorder. 2017 年 3 月 28 日、長崎大学 (長崎県長崎市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田中 慎二 (TANAKA, Shinji)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 60548494

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし