

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19508

研究課題名(和文)パーキンソン病における神経回路再編過程の可視化解析

研究課題名(英文)Neuronal circuitry rewiring during the progression of Parkinson's disease

研究代表者

畑中 悠佑(Hatanaka, Yusuke)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50581899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の進行に付随する脳神経回路の再編過程を、モデルマウスの2光子生体内蛍光イメージングにより可視化解析する手法を開発した。黒質ドーパミン作動性ニューロンの細胞死と、関連タンパク質である α -シヌクレインの蓄積により、パーキンソン病の運動症状および運動前駆症状が惹き起こされるが、運動前駆症状までの表現型を忠実に再現する新規モデルマウスを解析した。その結果、協調運動学習そのものは障害されないものの、その後の記憶痕跡が希薄化していることを発見した。このことから、運動症状呈示以前より、神経回路可塑性が障害されており、以後のパーキンソン病の運動症状が惹き起こされるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel method which can analyze neuronal circuitry rewiring accompanying the progression of Parkinson's disease (PD) by visualizing neuronal activity engram using two-photon in vivo imaging. We used PD model mice which faithfully recapitulated the spatiotemporal expression pattern of PD-associated protein, α -synuclein, and which showed dopaminergic neuronal cell death in the substantia nigra and premotor symptoms of PD. In this study, we found that the neuronal activity engram after coordinated motor learning in the primary motor cortex of PD model mice was lower than control group. This suggest that neuronal circuitry plasticity in the motor cortex was already disrupted in this PD premotor symptom model and that could trigger later motor deficits.

研究分野：神経科学，神経内科学

キーワード：記憶痕跡 2光子in vivoイメージング 前初期遺伝子 パーキンソン病 α -シヌクレイン 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、黒質ドーパミン作動性ニューロンの細胞死による進行性の神経変性疾患であり、主に運動症状と、認知症状を含む非運動症状を特徴とする。ヒトや霊長類の脳機能イメージングから、マクロスコピックな病態生理メカニズムが解明されつつあり、一方で、 α -シヌクレインを中心とした、ミクロスコピックな発症分子メカニズムも明らかになりつつある。しかしながら、その両者を結びつけるような、メゾスコピックな神経回路レベルにおける病態研究は存在せず、パーキンソン病の進行や脳機能代償に伴う神経回路の再編成メカニズムについて、全く不明である。また、パーキンソン病の動物モデルを用いた研究の多くは、単純な運動機能障害によりその症状を評価するものであり、運動症状・非運動症状を含めた実際の病態を反映する、より包括的な運動学習能の評価が不可欠となるが、運動学習成立の諸段階に、ドーパミン欠乏がどのような影響を及ぼすのか、その詳細は依然として不明のままである。本研究では、パーキンソン病モデルマウスを用いて、症状進行及び機能代償に伴う神経回路の遷移機構を解明し、さらに、運動学習の諸段階における神経回路再編過程の破綻機構を明らかにしようと試みる。

神経回路の再編過程の解析には、神経活動時に発現が誘導される最初期遺伝子 *Arc* のプロモーター下で一過的に蛍光タンパク質を発現する *Arc-dVenus* マウス (岐阜大学 山口瞬先生より譲渡) を用いる (Eguchi et al., *NeuroImage* 2009) (図 1)。脳機能の発揮には、同期活動したニューロン集団がシナプス可塑性に基づいて結びつきを増強させる必要がある。このときの活動記録は、「記憶痕跡 (memory engram)」として、特定のニューロン集団に符号化され保存されることが分かっていた (Liu et al., *Nature* 2012)。本研究では、*Arc-dVenus* マウスを用いて、同期活動したニューロン集団のみを特異的にラベルすることで、運動課題により活性化される神経回路を随時可視化し、病態進行と運動学習に付随して変化する運動野の神経回路を、生きたままの同一個体で継時的に追跡する (図 2)。また、ドーパミン作動性ニューロンの細胞死に伴い補償的に活性化される代償回路を、*Arc-dVenus* と透明化技術を用いて脳全体から探索する。

同一個体の継時的生体内観察には、2光子励起レーザー顕微鏡による非侵襲的な *in vivo* イメージングを用いる。申請者は、脳の2光子 *in vivo* イメージングを研究分野としており、樹状突起スパイン (シナプス後部構造) の動態解析により、脊髄小脳失調症1型 (SCA1) 及び自閉症スペクトラムのモデルマウスにおけるシナプス不安定性を明らかにしてきた (Hatanaka et al., *Sci Rep* 2015;

Hatanaka et al., *Neurochem Int* 2015)。特に、パーキンソン病と同様に、細胞死を特徴とする神経変性疾患の一つである SCA1 の研究では、神経症状の発症前から、シナプスレベルで神経ネットワークが不安定になることを示した。このことから、神経ネットワークの遷移解析により、今まで分からなかった潜在的な神経病態も検出できると考えられる。本研究では、シナプスレベルから回路レベルへと視野を広げ、より広範な脳の神経ネットワーク再編過程を解析することで、従来の神経変性疾患研究では得られなかった新規病態の発見が期待される。

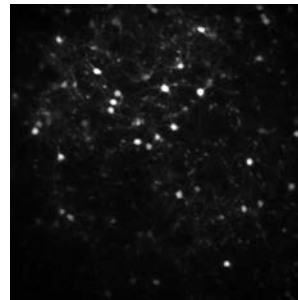


図 1: 実際の *Arc-dVenus* マウスの 2 光子 *in vivo* イメージング像。運動課題により活性化したニューロン集団を継時的に観察する

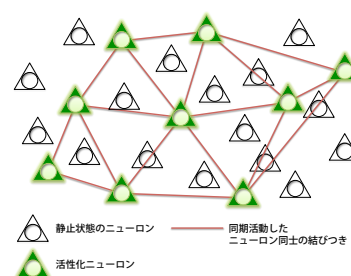


図 2: *Arc-dVenus* マウスにおいて可視化された神経活動履歴 (記憶痕跡) の模式図。病態進行に伴い、この神経回路が変化することが予測される

2. 研究の目的

ドーパミン作動性ニューロンの細胞死を主な原因とするパーキンソン病において、症状の進行及び失われた脳機能の代償作用に伴い、脳の神経ネットワークの再編成が起こると考えられるが、その過程には不明な点が多い。本研究では、神経活動の痕跡を単一細胞レベルで可視化できるマウスを用いて、パーキンソン病における神経回路の再編過程を、2光子レーザー励起顕微鏡を用いた 1 細胞レベルの解像度を持った *in vivo* イメージングにより、同一個体で継時的に追跡する。さらに、脳透明化技術を用いた脳全体の *ex vivo* イメージングにより、パーキンソン病に対し補償的に活性化される代償回路を探索する。すなわち、本研究は、パーキンソン病の進行に伴う回路レベルでの病態機構の解

明と、新規パーキンソン病関連回路の同定を試みるものである。

3. 研究の方法

神経回路の再編過程の解析には、神経活動時に発現が誘導される最初期遺伝子 *Arc* のプロモーター下で一過的に蛍光タンパク質を発現する *Arc-dVenus* マウスを用いる。これにより、本研究では、同期活動したニューロン集団のみを特異的にラベルすることで、運動課題により活性化される神経回路を随時可視化し、病態進行と運動学習に付随して変化する運動野の神経回路を、生きたままの同一個体で継時的に追跡する。同一個体の継時的生体内観察には、2光子励起レーザー顕微鏡による非侵襲的な *in vivo* イメージングを用いる。研究期間内に以下のことを明らかにする。

1. 運動学習成立過程にドーパミン欠乏が及ぼす影響

ドーパミン神経毒を投与したパーキンソン病モデルマウスを用いる。これにより、記憶成立時の任意の諸段階（獲得・固定化・想起）において、ドーパミン欠乏状態を作り出し、その影響を評価することを可能とする。本研究は、後述のイメージング実験の予備検討であると同時に、記憶・学習過程に及ぼすドーパミンの調節機構の基礎研究でもある。特に、記憶の想起に及ぼすドーパミンの役割について報告した先行研究は無く、成立していた記憶の維持にドーパミンが果たす役割を解明する意義は大きい。

2. パーキンソン病モデルマウスの1次運動野における神経回路再編過程

Arc-dVenus マウスを用いた2光子 *in vivo* イメージングにより、パーキンソン病モデルマウスの運動神経回路（運動課題に伴う記憶痕跡）を、同一個体で継時的に解析する。薬物投与モデルの他に、当研究室で作成した α -シヌクレイン BAC トランスジェニックマウス (Yamakado et al., *Neurosci Res* 2012) や他の遺伝学的モデルマウスも使用し、多面的にパーキンソン病の神経回路病態の解明を目指す。パーキンソン病では、ドーパミン性入力を受ける線条体とループを形成する1次運動野の可塑性が障害を受けており (Morgante et al., *Brain* 2006)、運動機能の中核を担うこの領域において、神経回路の大規模な再編成が進行していると考えられる。

4. 研究成果

ロータロッド（回転型トレッドミル）を用いた協調運動学習成立の諸段階（記憶獲得・固定化・想起）のそれぞれにおいて、任意のタイミングでドーパミン欠乏状態を実現させることに成功した。これは、ドーパミン作動性ニューロンに選択的に細胞死を誘導する MPTP の投与方法およびその投与タイミン

グを変えることで実現した（図3）。

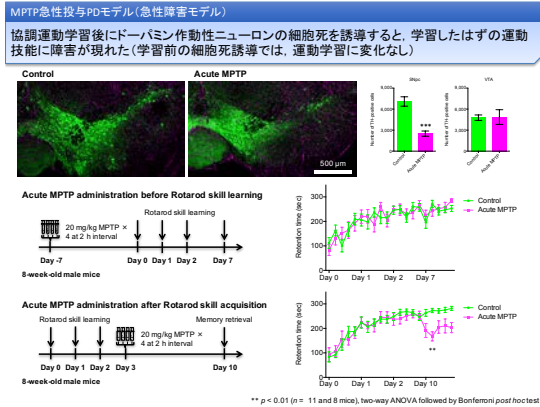


図3：ドーパミン欠乏による学習過程依存的な運動技能障害

パーキンソン病関連変異 A53T およびリスク SNP を有する α -シヌクレインの BAC トランスジェニックマウス (A53T *SNCA*-BAC マウス) を新規に作製し、 α -シヌクレインの時空間発現パターンを忠実に再現したパーキンソン病モデルマウスを作製した（図4）。異常リン酸化した α -シヌクレインの大脳皮質および嗅球における選択的な蓄積を示した。またドーパミン作動性ニューロンの脱落およびその神経終末における TH の減少を示した。このマウスは12週齢で運動技能獲得に異常を示すが、その一方で運動技能障害は認めなかった。マウス1次運動野 (M1) の2光子 *in vivo* イメージング法を樹立し、協調運動学習後の活性化ニューロン集団（記憶痕跡）を、*Arc-dVenus* マウスを用いて可視化する実験系を確立した。*A53T A53T SNCA*-BAC; *Arc-dVenus* マウスにおいて、協調運動学習後の *Arc* の発現そのものが低下していることを示した。

A53T *SNCA*-BACマウスの開発

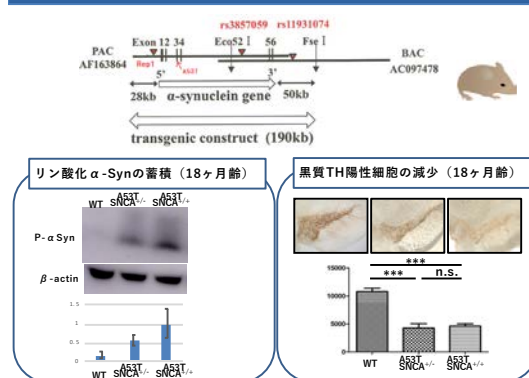


図4：A53T *SNCA*-BAC マウス。リン酸化 α -synuclein の蓄積と TH ニューロンの細胞死

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 2 件)

1. *Hatanaka Y, Kabuta T, * Wada K (2017) Disturbance in Maternal Environment Leads to Abnormal Synaptic Instability during Neuronal Circuitry Development. Front Neurosci 11: 35. (査読あり)
2. *Hatanaka Y, Wada K, *Kabuta T (2016) Maternal high-fat diet leads to persistent synaptic instability in mouse offspring via oxidative stress during lactation. Neurochemistry international Neurochem Int 97:99-108. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. ドーパミン欠乏がもたらす記憶成立過程依存的な運動学習障害, 畑中 悠佑, 第39回日本神経科学大会 2016年7月20日
2. Maternal High-fat Diet Leads to Persistent Synaptic Instability in Mouse Offspring via Oxidative Stress during Lactation., 畑中 悠佑, Current Trends and Future Directions of Synaptic Plasticity Research 2016年6月22日

6. 研究組織

(1)研究代表者

畑中 悠佑 (HATANAKA, Yusuke)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50581899

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

高橋 良輔 (TAKAHASHI, Ryosuke)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90216771

()