

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02539

研究課題名(和文) シナプスの選択的強化・除去における神経活動の役割とその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Activity-dependent mechanisms regulating synapse elimination

研究代表者

上阪 直史 (Uesaka, Naofumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70597624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シナプスの選択的強化・除去(シナプス刈り込み)の神経活動依存性とその分子基盤の解明を目指し、モデル系として、小脳の登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達の機構を解明することを目指した。申請者は小脳のシナプス刈り込みにおいて神経活動依存性とその下流で働きシナプス後部からシナプス前部へ伝わる逆行性分子を同定してきた。本研究では、開発したスクリーニング系を用いて未同定の逆行性分子を同定し、神経活動がどのようにそれらの分子を制御するかを明らかにした。さらに、神経活動依存性と非依存性の機構がどのように協調してシナプスを選択的に強化・除去するかを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳機能の基になる神経回路がどのように形成されるかその原理を解明することは神経科学分野で重要なテーマであり、発達障害の病態解明・治療法開発ならびに人工知能の開発に多大に貢献する。神経回路が形成される際の重要な過程としてシナプス刈り込みがある。シナプス刈り込みの破綻が社会性低下やコミュニケーション障害を主症状とする自閉スペクトラム症や統合失調症を発症させる可能性が報告されている。また人工知能を最適化する方法としてもシナプス刈り込みは着目されている。本研究でシナプス刈り込みのメカニズムを明らかにしたことで、将来的に脳疾患の治療や人工知能開発に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to elucidate neural activity dependency and its molecular basis of synapse elimination (selective strengthening and elimination of synapses). I have elucidated the mechanism of postnatal development of the climbing fiber to Purkinje cell synapse in the cerebellum as a model system for synapse elimination. I have identified neural activity dependency in synapse elimination and retrograde signaling molecules that work downstream of neural activity and transmit from the postsynaptic to the presynaptic region. In the present study, I identified unknown retrograde signaling molecules using the developed screening system and clarified how neural activity regulates these molecules. Furthermore, I clarified how neural activity-dependent and activity-independent mechanisms cooperate to selectively strengthen or eliminate synapses.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス刈り込み 逆行性シグナル 神経回路再編成 小脳

1. 研究開始当初の背景

私たちが秩序だった行動をとれるのは、脳や体内において神経のネットワーク(神経回路)が特定のパターンで形成されているからである。本研究では、生後発達期の機能的神経回路形成において、神経活動が果たす役割とそのメカニズムを解明する。そのために、小脳の登上線維 - プルキンエ細胞シナプスでみられる選択的強化・除去を研究対象とする。生まれたばかりの動物の神経系には、シナプスが過剰に存在しており、シナプスの密度は成熟脳の 2 倍程度にのぼる (Huttenlocher et al., *Neurosci. Lett.* 1982)。しかしこの時期のシナプスは機能的に未熟であり、動物個体としても脳機能は未熟な状態にある。成長につれて、必要なシナプスは強められて残存し、不必要なシナプスは弱められて除去されることにより、成熟した機能的神経回路が完成する(シナプス刈り込み)(Kano & Hashimoto, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2009)。生後発達期のシナプス刈り込みの異常は自閉スペクトラム症や統合失調症の病態の基盤にあると広く考えられており、精神神経疾患の病態解明の点からも極めて高い注目を集めている。小脳の登上線維とプルキンエ細胞シナプスは、シナプスの選択的強化・除去の機構が比較的良く調べられている。小脳のシナプス刈り込みは、1本の登上線維が選択的に強化される過程(選択的強化)その強められた1本の登上線維が“勝者”としてプルキンエ細胞樹状突起へ移行する過程(プルキンエ細胞を支配する線維の選択)、細胞体に残された未熟な“敗者”の登上線維シナプスが除去される過程(前期除去過程、後期除去過程)という4つの過程を経て完成する(Watanabe and Kano, 2011)。これまでシナプス刈り込みには神経細胞の活動(神経活動)が関わることを示されてきた(Kano & Hashimoto, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2009)。シナプス刈り込みに関わる分子に関しては登上線維シナプスの実験系が最も研究が進んでいるが、この系ですら神経活動がどのような分子基盤を経てシナプスを刈り込みかはほとんどわかっていない。また神経活動依存的メカニズムと非依存的メカニズムがどのように協調してシナプス刈り込みを完成させるか不明である。

登上線維を除去する分子として、代謝型グルタミン酸受容体やその下流で働く protein kinase C などが関わることを示されていた。このような状況で申請者らは、独自に開発した培養標本を用い、これまで不可能であった神経活動依存的な分子の網羅的スクリーニングを行ってきた。これらの研究により代謝型グルタミン酸受容体の下流で働く細胞内分子や逆行性分子を同定することでそのメカニズムの一端を明らかにした(Uesaka et al., *J. Neurosci.* 2012; Mikuni and Uesaka et al., *Neuron*, 2013; Uesaka et al., *Science*, 2014 など)。これらの研究はシナプス除去の後期過程の分子基盤を明らかにしたが、選択的強化など他の3つの過程の分子基盤に関しては謎のままであった。特に選択的強化やシナプス除去の前期過程に関わる P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの下流で働く逆行性分子は実体がまったく不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下2つである。

1. シナプス刈り込みにおいて未同定の逆行性分子を同定し、神経活動がそれらの分子を制御する機構を明らかにする。
2. 登上線維が“勝者”の線維として樹状突起へ移行する過程を制御する神経活動非依存的な分子の実体を明らかにする。

3. 研究の方法

P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの下流で働く逆行性分子の同定

シナプス刈り込み時においてプルキンエ細胞で発現する遺伝子はプロファイリング済みである。P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルのノックアウトマウスの小脳において、野生型のマウスの小脳と比較して、発現が変動する遺伝子を最近プロファイリングした。この2つのプロファイリングデータから、プルキンエ細胞で発現し、P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルのノックアウトで発現が変化する遺伝子を検出している。逆行性分子として、分泌分子と膜分子を候補とする。本研究では、これらの候補遺伝子を RNAi ノックダウンし、電気生理学の方法によりシナプス刈り込み異常を検出することでスクリーニングした。これらの解析により絞り込まれた遺伝子に関して、ノックアウトマウスを購入あるいは作成し、シナプス刈り込みを含めた神経回路異常や行動異常を解析した。また P/Q 型カルシウムチャネルのノックアウトマウスの小脳で当該分子のノックダウンを行い、ノックダウン細胞と非ノックダウン細胞でシナプス刈り込みの程度が同等か加算的かを調べ、P/Q 型カルシウムチャネルと当該分子が同じシグナル経路にあるかを明らかにした。P/Q 型カルシウムチャネルのノックアウトマウスの小脳で当該分子の免疫組織染色を行い、発現が低下するかを明らかにした。

“勝者”の登上線維の樹状突起への移行を制御する神経活動非依存的な分子の同定
勝者の登上線維では何らかの分子が多く発現し、それにより樹状突起へとシナプスを形成でき

ると考えられる。登上線維で発現する分子は解析済みである。機能分子を同定するために、登上線維の起始細胞である下オリブ核細胞で RNAi ノックダウンを行った。ノックダウンした登上線維がプルキンエ細胞の樹状突起へ登らず、細胞体付近で止まっているフェノタイプを示す分子をスクリーニングした。ノックダウンで機能が確認できた分子はノックダウン配列に抵抗性のある当該分子の遺伝子を導入しレスキューできるか確認した。その後、ノックアウトマウスを作成し、当該分子の機能の詳細を解析した。

4. 研究成果

シナプス刈り込みに関わることが示されている神経活動依存性分子の P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの下流で働く逆行性分子(膜分子と分泌分子)をスクリーニングした。まずシナプス刈り込み時においてプルキンエ細胞で発現する遺伝子群と P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルのノックアウトマウスの小脳において発現が変動する遺伝子群のデータから、発現量とノックアウトでの発現変動度から候補遺伝子の選定を行った。これらの候補遺伝子をノックダウンし、電気生理学の方法によりシナプス刈り込み異常を検出することでスクリーニングを行った。各候補遺伝子に対するレンチウイルスノックダウンベクターを作成するために、各遺伝子に対する microRNA を設計し、レンチウイルスに挿入した。さらにレンチウイルスには導入された細胞が同定できるように EGFP 配列を挿入した。microRNA と EGFP のプロモーターはプルキンエ細胞で特異的に発現するために改良型 L7 プロモーターを用いた。生後 1 - 2 日目のマウスにおいて、レンチウイルスを用いた遺伝子導入法により候補遺伝子それぞれをノックダウンし、生後 20 - 30 日目において小脳の急性スライスを作成しシナプス刈り込みを電気生理学の方法により解析した。EGFP 陽性のノックダウン細胞と EGFP 陰性のコントロール細胞でシナプス刈り込みを比較した結果、ノックダウンした細胞でシナプス刈り込みの異常が認められた遺伝子を 2 つ見出した。またそれらの遺伝子のノックアウトマウスを作成し、同様にシナプス刈り込みを解析した結果、ノックダウンと同様にシナプス刈り込みに障害が見られた。次に、見出したシナプス刈り込みに関わることが示されている神経活動依存性分子の P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの下流で働く分子がシナプス刈り込みのどの過程に関与するかを解析した。その結果、P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの下流で働く分子 Neuroserpin のノックアウトマウスはシナプス刈り込みの前期除去過程の異常を示すことが見いだされた。さらに、P/Q 型カルシウムチャネルのノックアウトマウスの小脳で Neuroserpin のノックアウトを行い、単一分子ノックアウト細胞とダブルノックアウト細胞でシナプス刈り込みの程度を比較し解析した結果、P/Q 型カルシウムチャネルと Neuroserpin が同じシグナル経路にあることが示唆された。また登上線維での分子ノックアウトにより、勝者の登上線維がプルキンエ細胞の樹状突起へ移行する過程を制御する候補分子を見出した。

次に、シナプス刈り込みの全過程におけるシナプス伝達の役割を明らかにするため、マウス小脳の登上線維 プルキンエ細胞シナプスにおいてシナプス伝達を消失させた時の影響を調べた。テタヌストキシン軽鎖 (TNLC) は、破傷風毒素のプロテアーゼドメインであり、シナプスの VAMP2 (シナプトプレビン 2 と呼ばれる) を特異的に分解することで、生体内での神経伝達物質の放出を完全に減少させることができる。新生児マウスの下オリブ核神経細胞に、EGFP と TNLC の 2 つのレンチウイルスベクターを 4 : 1 の比率で混合したものを注入した。登上線維における TNLC の発現が、CF-PC シナプスにおけるシナプス伝達にどの程度影響するかを検証した結果、生後 0 日目で TNLC を感染させた生後 3 日目マウスでは、ほぼすべての EGFP 陽性線維で VAMP2 シグナルが消失していた。これらの結果は、TNLC の感染により、3 日以内に VAMP2 が検出不可能なレベルまで減少したことを示している。さらに、TNLC 感染マウスにおける登上線維 プルキンエ細胞シナプスの機能を調べた。TNLC マウスの小脳スライスを用いて、プルキンエ細胞からパッチクランプ記録を行い、登上線維による興奮性シナプス後電流 (CF-EPSC) を記録した。TNLC を感染した登上線維が豊富に存在する領域では、極小の CF-EPSC_{total} を持つ PC しか採取できなかった。以上から、新生児マウスの登上線維に TNLC を感染させることで、感染した登上線維がシナプス伝達を消失することがわかった。次に、個々の登上線維が勝者の登上線維となって樹状突起に転位するためには、より高いレベルのシナプス伝達が必要なかどうかを調べた。その結果、登上線維のシナプス伝達を遮断しても、勝者の登上線維になることが可能であった。このように、生後 3 日目以降の登上線維のシナプス伝達は登上線維シナプス除去の勝者の登上線維の選択には必要ないことが見いだされた。次に、シナプス伝達を奪われた勝者の登上線維が、生後数日で正常な樹状突起領域の拡大を示すかどうかを調べた。その結果は、シナプス伝達が消した勝者の登上線維は、プルキンエ細胞の樹状突起を十分に神経支配できないことが判明した。また、シナプス伝達が消した登上線維はプルキンエ細胞の樹状突起への移動開始のタイミングが遅れていることを見出した。これらの結果は、勝者の登上線維のシナプス伝達はプルキンエ細胞への支配領域の拡大には必要だが、勝者を決定する要因ではないことを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito R, Koebis M, Nagai T, Shimizu K, Liao J, Wulaer B, Sugaya Y, Nagahama K, Uesaka N, Kushima I, Mori D, Maruyama K, Nakao K, Kurihara H, Yamada K, Kano M, Fukada Y, Ozaki N, Aiba A	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Comprehensive analysis of a novel mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome: a model with the most common 3.0-Mb deletion at the human 22q11.2 locus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transl Psychiatry	6. 最初と最後の頁 35-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-0723-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kano M, Watanabe T, Uesaka N, Watanabe M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Multiple Phases of Climbing Fiber Synapse Elimination in the Developing Cerebellum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cerebellum	6. 最初と最後の頁 722-734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12311-018-0964-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fleck David, Kenzler Lina, Mundt Nadine, Strauch Martin, Uesaka Naofumi, Moosmann Robert, Bruentgens Felicitas, Missel Annika, Mayerhofer Artur, Merhof Dorit, Spehr Jennifer, Spehr Marc	4. 巻 10
2. 論文標題 ATP activation of peritubular cells drives testicular sperm transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 na
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.62885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashiro Kunihiro, Hori Kei, Lai Esther S.K., Aoki Ryo, Shimaoka Kazumi, Arimura Nariko, Egusa Saki F., Sakamoto Asami, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Watanabe Takaki, Uesaka Naofumi, Kano Masanobu, Hoshino Mikio	4. 巻 23
2. 論文標題 AUTS2 Governs Cerebellar Development, Purkinje Cell Maturation, Motor Function and Social Communication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101820 ~ 101820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Hiroaki, Sakoori Kazuto, Konno Kohtarou, Nagahama Kenichiro, Suzuki Honoka, Watanabe Takaki, Watanabe Masahiko, Uesaka Naofumi, Kano Masanobu	4. 巻 11
2. 論文標題 Autism spectrum disorder-like behavior caused by reduced excitatory synaptic transmission in pyramidal neurons of mouse prefrontal cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 na
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18861-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahama Kenichiro, Sakoori Kazuto, Watanabe Takaki, Kishi Yusuke, Kawaji Keita, Koebis Michinori, Nakao Kazuki, Gotoh Yukiko, Aiba Atsu, Uesaka Naofumi, Kano Masanobu	4. 巻 32
2. 論文標題 Setd1a Insufficiency in Mice Attenuates Excitatory Synaptic Function and Recapitulates Schizophrenia-Related Behavioral Abnormalities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108126 ~ 108126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagumo Yasuyuki, Ueta Yoshifumi, Nakayama Hisako, Osaki Hironobu, Takeuchi Yuichi, Uesaka Naofumi, Kano Masanobu, Miyata Mariko	4. 巻 31
2. 論文標題 Tonic GABAergic Inhibition Is Essential for Nerve Injury-Induced Afferent Remodeling in the Somatosensory Thalamus and Ectopic Sensations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107797 ~ 107797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107797	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rai Yurie, Watanabe Takaki, Matsuyama Kyoko, Sakimura Kenji, Uesaka Naofumi, Kano Masanobu	4. 巻 462
2. 論文標題 Phospholipase C ₃ is Required for Climbing Fiber Synapse Elimination in Aldolase C-positive Compartments of the Developing Mouse Cerebellum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 36 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.04.035	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 長濱 健一郎 / 佐郡 和人 / 渡邊 貴樹 / 古戎 道典 / 上阪 直史 / 饗場 篤 / 狩野 方伸
2. 発表標題 精神疾患関連エピソード因子の欠損が、マウス内側前頭前野錐体細胞への興奮性シナプス入力への減弱と異常行動を引き起こす
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会・新潟
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 貴樹 / 頼 友梨恵 / 鈴木 穂香 / 赤松 翼 / 上阪 直史 / 狩野 方伸
2. 発表標題 発達期小脳において、アルドラーゼC陽性プルキンエ細胞の登上線維シナプス刈り込みはアルドラーゼC陰性プルキンエ細胞よりも遅れ、ホスホリパーゼC 3を必要とする
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会・新潟
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaki Watanabe, Honoka Suzuki, Kazuto Sakoori, Shutaro Inoue, Tsubasa Akamatsu, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano,
2. 発表標題 Protocadherin 10 delays developmental climbing fiber synapse elimination in a subset of aldolase C-positive Purkinje cells in the cerebellum
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会・大分
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naofumi Uesaka, Tzu-Huei Kao, Masanobu Kano
2. 発表標題 Activity-dependent synapse elimination in the developing cerebellum
3. 学会等名 FAOPS2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaki Watanabe, Shutaro Inoue, Tsubasa Akamatsu, Honoka Suzuki, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano
2. 発表標題 Accelerated climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells lacking protocadherin 10
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kushibe Kyoko, Celine Mercier, Takaki Watanabe, Taisuke Miyazaki, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano
2. 発表標題 Fndc3b promotes climbing fiber synapse elimination partly by inhibiting STAT3 in the cerebellum
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichiro Nagahama, Kazuto Sakoori, Takaki Watanabe, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano
2. 発表標題 Reduced synaptic inputs in prefrontal cortex by lack of a mental disorder-related epigenetic factor
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Myeong Jeong Choo, Naofumi Uesaka, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Masanobu Kano
2. 発表標題 Retrograde BDNF signaling required for synapse elimination in the developing cerebellum
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichiro Nagahama, Kazuto Sakoori, Takaki Watanabe, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano
2. 発表標題 Impaired Synapse Development in Mouse Medial Prefrontal Cortex by Deletion of a Histone-Modifying Enzyme Implicated in Psychiatric Disorder
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tzu-Huei Kao, Kyoko Matsuyama, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano
2. 発表標題 Roles of synaptic transmission in climbing fiber to Purkinje cell synapse elimination during postnatal cerebellar development
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_Lab_j/Top_j.html https://researchmap.jp/keichan3sai/ 神経生理学教室ホームページ http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_Lab_j/Top_j.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------