

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01007

研究課題名(和文) 幼弱神経系における興奮形態形成連関による回路形成制御機構

研究課題名(英文) Circuit Formation Control Mechanisms by Excitation-Morphogenesis Coupling in the Developing Nervous System

研究代表者

尾藤 晴彦 (Bito, Haruhiko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：00291964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳発達期の回路形成にはL型Ca²⁺チャンネル依存的な興奮形態形成連関SRCaTが大きく寄与している。本研究では、幼弱神経系における興奮形態形成連関による回路形成制御機構を解明するため、1)まず脳発達期におけるin vivo 幼弱神経系にて、SRCaTが発生する時期・条件を解明し、さらに2)SRCaTの下流のCa²⁺伝達経路を明らかにし、3)興奮形態形成連関の破綻に伴う自閉症関連動物表現型への展開機序について追求する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉スペクトラム症併発率70%のL型Ca²⁺チャンネル点変異によりSRCaTが破綻し、神経発達障害の一因とされる細胞移動異常が生じる。本研究は、このような表現型発見から逆に本研究により、自閉症関連動物表現型発症の本質的理解へ迫ろうとするものである。

研究成果の概要(英文)：We previously uncovered an L-type Ca²⁺ channel-dependent excitation-morphogenesis coupling mechanism SRCaT, which may contribute significantly to circuit formation during brain development. In this study, we attempt to elucidate some of the regulatory mechanisms mediated by SRCaT in the developing nervous system. We will 1) investigate the timing and conditions under which SRCaT occurs in the developing brain in vivo, 2) clarify the Ca²⁺ signal transduction pathway downstream of SRCaT, and 3) examine the mechanism potentially linking the disruption of SRCaT with the onset of autism-related animal phenotypes.

研究分野：神経生化学

キーワード：脳・神経 カルシウム 脳発達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究グループは、新規 Ca²⁺インディケータの設計を手がける過程で、新たな Ca²⁺インディケータ-Lck-G-CaMP7 を作出し、幼弱神経細胞において、これまで定量的な解析が全くなされてこなかった、メカニズム未解明の新たな Ca²⁺動員機構として、局所的な自発的再生的一過性 Ca²⁺上昇(Spontaneous Regenerative Ca²⁺ Transient, SRCaT)を発見した(J. Neurosci. 2018)。興味深いことに、SRCaT は、幼弱期にまだ電位変化が Na⁺スパイクに依らない時期に、L型 Ca²⁺チャンネル開口を介して発生する Ca²⁺流入が引きがねとなることが明らかとなった。加えて、自閉症発症が高頻度で報告されている Timothy 症候群患者における Cav1.2-G406R 変異により、SRCaT に持続的に異常をきたし、これが引きがねとなり、幼弱突起短縮や、幼弱細胞の放射状移動の異常が発生することが示唆された。このことは、興奮形態形成連関が幼弱神経系で SRCaT の下流で制御され、その破綻が脳発達障害の分子機序となりうる可能性を示唆している。

そこで本研究計画では、これまでの申請者の研究によって、初めて具体化された、幼弱神経系における興奮形態形成連関による回路形成制御機構の存在に焦点を絞り、その解明を中核に据える。

2. 研究の目的

本研究では、幼弱神経系における興奮形態形成連関による回路形成制御機構を解明するため、具体的に3つの目的を掲げた。

- 1) 脳発達期における in vivo 幼弱神経系にて、SRCaT が発生する時期・条件の解明。
- 2) SRCaT の下流で興奮形態形成連関を担う Ca²⁺/CaM 伝達経路の解明。
- 3) 興奮形態形成連関により制御される神経回路形成ステップの同定、ならびにその破綻に伴う自閉症関連動物表現型の理解。

3. 研究の方法

1) In vivo 脳発達期の幼弱神経系にて、SRCaT を記録するためには、さらなる高性能 Ca²⁺インディケータを用いた最適化と in vivo 発現系の構築が肝要である。このための実験系構築と条件検討の改良を行う。

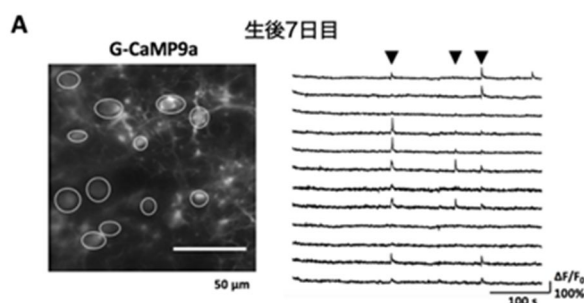
2) 放射移動中の幼弱期神経細胞のカルシウム動態を精密に計測する技術を改良して、SRCaT の放射性移動中の貢献について明らかにしていく。

3) 興奮形態形成連関に関与する分子シグナルの自閉症関連表現型への貢献について検討する。

4. 研究成果

上記の研究に基づき、以下のような成果を得た。

- (1) SRCaT を in vivo あるいは急性切片にて計測可能なカルシウムインディケータ(GECI)の絞り込みをした。その過程で、旧来の GECI におけるカルシウム応答の非線形性を改良した R-CaMP2 の設計手法に基づき、緑色の線形



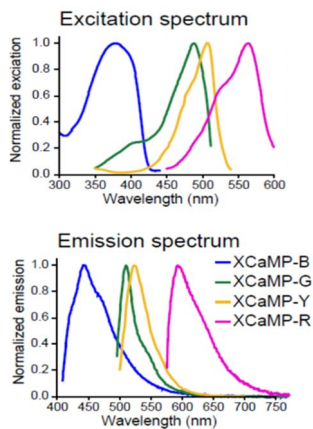


図 1. 4 色 XCaMPs の吸収蛍光波長

性 GECI, G-CaMP9a を創出した。本インディケータの有効性を子宮内電気穿孔法後、急性切片記録で確認するとともに、in vivo 幼若期脳のイメージングにおいても確認した。これを任意の時期・脳部位にて計測できる G-CaMP9a 発現遺伝子改変マウスを新潟大学 脳研究所 崎村建司博士、阿部学博士と共同にて作成した (Sakamoto et al. Cell Rep Met 2022)。

(2) 本成功に基づき、青、緑、黄、赤の各色の GECI をセットとしてさらに改良を加えた新規 GECI セット XCaMP を創出した (Inoue et al. Cell 2019)。

(3) 脳発達期における Ca^{2+} 測定条件検討の結果、最適の子宮内電気穿孔法手法を確立し、これにより、幼若脳計測に係る各種技術

(頭蓋骨削術に基づく P7 計測法や、観察窓を用いた P12 計測法) なども成功し始めた。これらの条件検討の一部をプロトコールとして発表した (Sakamoto et al. STAR Prot. 2022)。

(4) 放射移動中の幼若期神経細胞のカルシウム動態を精密に計測する技術を改良していった結果、radial migration 中の神経細胞移動中の intermediate zone において、電位依存性カルシウムチャンネルの貢献が増強していく可能性を見出した (Horigane et al. Neurosci. Res. 2021)。

(5) 名古屋大学精神科との共同により、ヒト統合失調症・自閉症コホートにおいて、CaCNA1C 遺伝子の ultra rare variant を見出し、gain-of-function mutation である可能性が示唆された (Wang et al. Trans Psych 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Horigane SI, Hamada S, Kamiyo S, Yamada H, Yamasaki M, Watanabe M, Bito H, Ohtsuka T, Takemoto-Kimura S.	4. 巻 掲載確定
2. 論文標題 Development of an L-type Ca ²⁺ channel-dependent Ca ²⁺ transient during the radial migration of cortical excitatory neurons.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 掲載確定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.06.003	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 Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane SI, 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, Bito H.	4. 巻 177
2. 論文標題 Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1346-1360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2019.04.007	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 該当する
1. 著者名 Wang C, Horigane SI, Wakamori M, Ueda S, Kawabata T, Fujii H, Kushima I, Kimura H, Ishizuka K, Nakamura Y, Iwayama Y, Ikeda M, Iwata N, Okada T, Aleksic B, Mori D, Yoshida T, Bito H, Yoshikawa T, Takemoto-Kimura S, Ozaki N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of ultra-rare disruptive variants in voltage-gated calcium channel-encoding genes in Japanese samples of schizophrenia and autism spectrum disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-022-01851-y	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 Sakamoto M, Inoue M, Takeuchi A, Kobari S, Yokoyama T, Horigane SI, Takemoto-Kimura S, Abe M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K, Fujii H, Bito H.	4. 巻 2
2. 論文標題 A Flp-dependent G-CaMP9a transgenic mouse for neuronal imaging in vivo.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2022.100168	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 Sakamoto M, Ota K, Kondo Y, Okamura M, Fujii H, Bito H.	4. 巻 3
2. 論文標題 In utero electroporation and cranial window implantation for in vivo wide-field two-photon calcium imaging using G-CaMP9a transgenic mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101421	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Bito H
2. 発表標題 Plasticity and memory mechanisms in vivo.
3. 学会等名 Stockholm Trio - University of Tokyo Strategic Partnership Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bito H
2. 発表標題 Lessons learned from elucidating calcium-dependent neural circuit control mechanisms.
3. 学会等名 Japanese Pharmacology Society Annual Meeting (招待講演)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 Bito H
2. 発表標題 Rational engineering of XCaMPs, a next-generation Ca ²⁺ indicator.
3. 学会等名 14th International Conference of Neurons and Brain Diseases, Queenstown, New Zealand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------