

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23937

研究課題名(和文) 死後脳研究のための死にゆく脳の縦断的定量的解析

研究課題名(英文) The longitudinal and quantitative study of neurons in dying brain for postmortem study

研究代表者

白井 福寿 (Fukutoshi, Shirai)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・リサーチアソシエイト

研究者番号：20849038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲的解析が困難なヒト脳研究において、死後脳解析は脳内で実際に起きているミクロスケールの病変を解明するための重要な手段であるが、死後脳研究で得られた知見が生前の病態生理を反映しているのか、死後の時間経過による副次的変化なのかは不明である。そこで、動物の脳神経細胞を継続的に観察できる2光子in vivo イメージング法を用いて、生前から死後に渡って脳内の神経細胞やシナプスがどのような変化を辿るのかを観察した。安楽死後の樹状突起やスパインの形態変化は、部位によって異なる時間的推移をたどり、比較的大型の樹状突起スパイン保存されやすい事が示唆され、現在論文投稿に向け取りまとめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患の病態解明のためには、脳内の微小な病変まで詳細に調べられる死後脳研究は重要である。しかし、死後脳は数時間以上の死後安置期間が生じるため、死後脳研究で得られた知見が生前の病態生理を反映しているのか、死後の時間経過による副次的変化であるのかの判別は困難であった。本研究は、死後脳サンプルが置かれる特殊だが無視することのできない条件下における変化を、動物モデルを用いて解析することで、死後脳研究やモデル動物から得られた知見を互いに結び付け、より正確に考察するための基盤となりうる。

研究成果の概要(英文)：The postmortem brain study is important to investigate the micro-scale pathophysiology in the human brain of patients with mental disorders. However, it is unclear whether the knowledge from the postmortem brain study reflects the pathophysiology while alive or the secondary effect after death. In this study, we investigated the morphological changes of dendrites and dendritic spines in living mouse brains by two-photon in vivo imaging and continued this imaging after euthanasia. The results suggest that dendrite and dendritic spine morphology don't change uniformly after death. And relatively large dendritic spines tend to keep their shapes compared to dendrites.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 2光子イメージング 樹状突起スパイン

1. 研究開始当初の背景

精神疾患研究には遺伝学的な解析や脳機能イメージング解析などのマクロスケール解析など様々な方法が存在するが、死後脳解析は患者脳内で実際に起きている変化を微小構造レベルで解析できる利点を持つ。シナプスは神経細胞同士を連絡する構造であるが、大脳皮質のグルタミン酸作動性シナプスの約7割は樹状突起スパイン上に形成される。スパインはその大きさにより電氣的伝達効率を変化させる性質を持ち、形態と機能とが密接な関係にある事が明らかにされている。そして実際の死後脳解析より、多くの精神疾患において、シナプスの形態・密度異常が報告され、その疾患モデル動物においてもこうしたシナプス異常は再現されている。更に、遺伝学的解析により疾患関連遺伝子と報告された遺伝子には、シナプス機能に関わる遺伝子が有意に多く含まれることが明らかにされ、シナプスの機能異常が精神疾患の病態生理ではないかと考えられてきた[1, 2]。一方、基礎研究領域でも様々な精神疾患モデル動物の細胞・回路・個体行動レベルでの解析によって病態に関する知見が蓄積されてきた。しかし、こうした知見を病態理解へと繋げる事は未だ容易ではなく、その原因の一つがヒト脳の比較対象が死後脳である点にある。死後脳は、すぐに固定処理がなされる動物実験とは異なり、死後数十時間にわたり安置される事も多い。そのために、死後脳研究に用いられるサンプルには、生前の脳内病態と死後経過によって生じた副次的な変化とが混在すると恐れ、病態の理解を困難にしている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、精神疾患との関連が強く示唆されるシナプスを主な観察対象として、死にゆく脳内においてシナプスがどのような変化を辿るのかを調べ、どのようなシナプスは維持され、あるいはどの程度変化するのかを縦断的・定量的に記述することである。本研究では、生きた状態や既に固定された状態の神経細胞を対象とする他の研究とは異なり、死後脳サンプルが置かれる特殊な条件下における変化を詳細に解析する。

そのために、同一の動物脳内における樹状突起やスパインを継続して観察・追跡することができる2光子 *in vivo* イメージングの利点をいかし、マウスの大脳皮質におけるシナプス形態を生前から安楽死後にわたって継続的に観察する。死後の脳内において、様々な形態・サイズをとるスパインがそれぞれどのように変化するのか、しないのかを単一スパインレベルで縦断的・定量的に解析する。

3. 研究の方法

(1) マウス神経細胞の可視化

神経細胞の可視化のため、蛍光タンパク質をコードする tdTomato 遺伝子や、シナプス機能に重要な PSD-95 ドメインを持つ融合蛍光タンパク質遺伝子を子宮内電気穿孔法により前頭前野の錐体細胞に導入した。胎生 14.5 日目に遺伝子導入を行うことで、2/3 層の錐体細胞選択的に遺伝子発現を誘導した。本手法により導入し発現した蛍光タンパク質は、生後 60 日や 90 日までの長期にわたって発現した。

(2) 2光子 *in vivo* イメージング

2光子 *in vivo* イメージングのため、Cranial window 法により観察窓を設置した。生後 30 日のマウスをイソフルランにより麻酔し、頭皮と骨膜を除去した。次に歯科用ドリルを用いて頭蓋骨に直径約 1.8 mm の穴を空け、ガラスとイメージング用の固定具を設置後、歯科用セメントを用いて保定した。術後、抗炎症剤および鎮痛剤を継続的に腹腔内投与した。生後 60 日のマウスを麻酔後 2 光子顕微鏡のレンズ下に固定し、大脳皮質の 1 層樹状突起及びスパインを経時的に観察した。その後、イソフルランによる深麻酔によりマウスを Sacrifice し、死後の脳内における樹状突起およびスパインの形態観察を行った。

(3) 観察に用いたマウスの固定・解析

(2) に用いたマウスは、観察後 4% パラホルムアルデヒドにより固定処置を行った。通常の固定処置とは異なり、死後時間が経過した脳組織サンプルとして、イメージングによる形態観察後、これまでに報告されている死後脳研究との比較検討を行った。

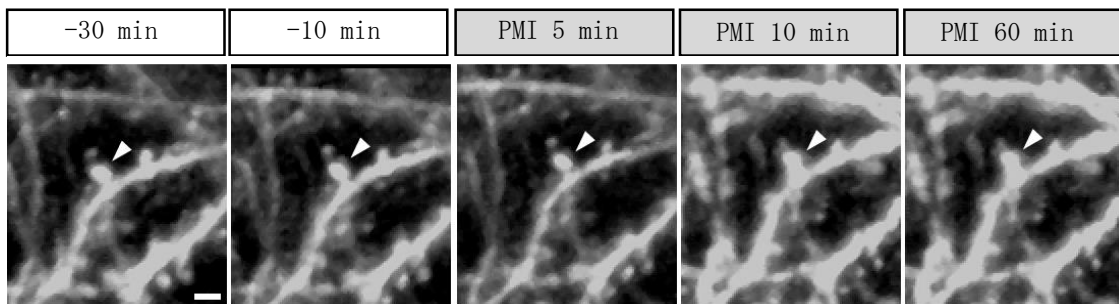
4. 研究成果

深麻酔による Sacrifice 後 10 分で樹状突起や比較的小型のスパインの形態に変化が見られる (図 1, PMI 10min)。一方、大型のスパインは形状を比較的保っており (図 1, 中央矢頭)、これは死後の脳内構造変化は均一ではなく差異が生じうることを示唆する。現在、論文発表に向け、解析をとりまとめている。

本研究における課題と今後の展望

本研究では、一つの動物モデルについて解析を行ったが、この知見がどの程度一般的な現象であるかについてはまだ十分な知見を得られていない。また、固定後サンプルの解析について結論付けるには至っていない。そのため、今後は複数のモデルの解析や、固定切片を用いた死後脳研究結果との比較が必要と考えている。

本研究では、樹状突起スパインの形態変化に着目していたが、統合失調症患者の死後脳内で変化しているという報告がされている [1]。報告者が所属する機関における研究で、統合失調症などの精神疾患発症との関係が強く示唆されている遺伝子に変異が導入された複数のマウスモデルにおいても、樹状突起スパイン形態が変化することが明らかになりつつある (論文投稿準備中)。これらのことから、疾患モデル動物内における神経細胞・樹状突起やスパインの形態変化を同様に解析し、死後における形態変化の推移、程度を明らかにすることができれば、死後脳研究から得られた知見が、生前の脳内でも保存されているのかどうかについて重要な知見を得られるのではないかと考えている。



【図 1】 *in vivo* 2 光子励起スパインイメージング：「形態マーカー」をマウス前頭野に発現させ、イソフルランによる深麻酔による Sacrifice 前後で樹状突起を *in vivo* 観察した。死後 10 分 (PMI 10 min) で樹状突起は膨張し、小さいスパインの形態は容易に変形する。一方で、大きなスパイン (矢頭) は比較的安定である。

引用文献

- 1, Penzes P, 2011, *Nat Neurosci*
- 2, MacDonald ML, 2017, *Am J Psychiatry*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------