

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15908

研究課題名(和文) 統合失調症モデルマウスの巨大なスパインが神経発火に与える非線形的効果の機序解明

研究課題名(英文) Investigation of effect on the extra-large dendritic spine to neuronal firing

研究代表者

白井 福寿 (Shirai, Fukutoshi)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は樹状突起スパインを介して多数の神経細胞から入力を受け、樹状突起演算の後に神経発火を生じる。しかし、スパインのサイズがそれらに対して及ぼす影響については不明だった。そこで、単一スパイン刺激とイメージング、電気生理学的手法を組み合わせ、スパインサイズと樹状突起演算機能および神経発火との関係性について検証した。そして同数のスパインを刺激したとしても、スパインサイズにより樹状突起演算および神経発火に与える影響が異なることを見出した。また、巨大なスパインはより少数のスパインで発火を誘導できたことから、錐体細胞がもつ同時入力を検出する機能が影響されうる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が知る限り、スパインサイズが樹状突起の演算機能に大きな効果を与えることを世界で初めて示そうとする研究である。従来の報告によれば、8個のスパインへの同時入力で神経発火が生じるとあるが、今回の結果から、巨大なスパインを刺激した場合、より少数のスパイン入力から神経発火を誘導する事を示唆する。我々の別の研究から精神疾患モデルマウスにおいて巨大なスパインが増加する知見が得られつつあり、病態解明の基本的な知見となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Neurons receive inputs from a lot of other neurons via dendritic spines. And dendritic computation and neuronal firing occur. However, how spine size affects the dendritic and somatic events is unknown. To investigate their relationships, we combined glutamate uncaging, imaging, and electrophysiological technics. And we found small and large spines have different effects on dendritic computation and neuronal firing even if we stimulated the same numbers of spines. Futhermore, the stimulation to only a few extra-large spines could induce firing. It suggests that extra-large spines could interfere with functioning as a coincidence detector.

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

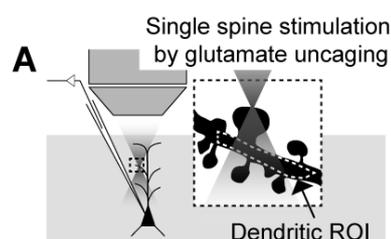
神経細胞はシナプスを介して多くの神経細胞から入力を受け、発火するか否かの演算を行い、発火した場合には多くの投射先神経細胞へ出力する。そのため、どの神経細胞がいつ発火するかは、神経回路の駆動・制御にとって重要な因子といえる。大脳皮質においてグルタミン酸作動性シナプスの約 8 割はスパインと呼ばれる小突起上に形成される。興味深い事に、統合失調症や多くの精神疾患モデル動物でスパイン形態異常が報告され、また統合失調症関連遺伝子の多くがシナプス関連因子であることから、シナプス異常がその病態生理に関わっている事は強く示唆されてきた。しかしながら、如何なるシナプス障害が重要であるのか、定量的にはほとんど明らかにされていない。シナプスが障害された場合に、樹状突起での演算処理や神経発火に対してどのような影響を及ぼすのかは全くの未解明である。

申請者は、複数の統合失調症モデルマウスの前頭前野領域の比較検討を行い、これらの疾患モデルマウスでは共通して、巨大なスパインが出現し、ワーキングメモリーが障害されている事を見出した。現時点でシナプス異常と行動との間の因果関係を示すことは困難であるため、本研究では神経細胞レベルを対象を絞り、スパインへの入力が樹状突起を介して神経発火を惹起するまでの過程の定量的な知見を蓄積したいと考えた。

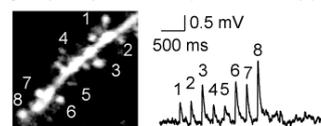
2. 研究の目的

本研究では、巨大スパインへのシナプス入力→樹状突起スパイク→神経発火の間にある関係を、光操作の前後での定量的時系列データより検証する(図 1,2)。スパインサイズは電氣的伝達効率と密接な関係にある事は良く知られているため、申請者らは、スパインのサイズ、そのスパインに由来する EPSP/EPSC、そして各スパインの分布までを含めた定量的な解析を行ってきた(図 1A,B)。

統合失調症モデルマウス (DISC1 KD および Calcineurin KO) を用いて、その錐体細胞で生じている現象を徹底的に定量する。標本は、マウス前頭野領域から急性スライス標本を作製する *in vitro* 実験と、*in vivo* 2 光子励起イメージングおよび Two-photon targeting cell attached 法による *in vivo* 実験を目的に応じて使い分ける。*in vitro* の実験では、グルタミン酸アンケーシングを用いた単一スパイン刺激を、巨大スパインを含む様々な刺激パターンで行い、同時に樹状突起におけるカルシウムスパイクを Cal-520 の蛍光値から求め、同時に膜電位および神経発火はホールセルパッチクランプの電気記録を用いて同一細胞より検出する。これらから、どのようなシナプス入力が、どのような樹状突起イベントを介して神経発火を誘発するかを定量的に明らかにし、さらに様々な阻害剤を比較検討することによりその分子基盤を明らかにする。



B Synapse level: Synaptic potential (Path-clamp)



【図 1】2 光子励起顕微鏡とグルタミン酸アンケーシングによる任意のシナプス刺激と計測：(A) 実験模式図。(B) 単一スパイン刺激により各スパインの EPSP を計測する。

3. 研究の方法

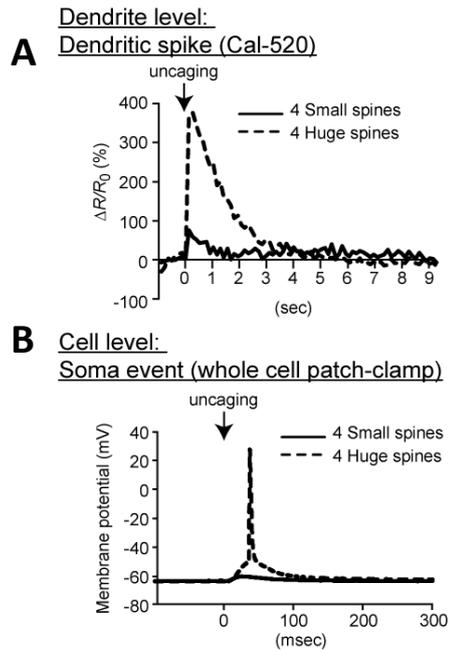
グルタミン酸アンケーシングによるスパイン刺激と Ca²⁺イメージング、電気生理学的手法を組み合わせ、スパインサイズが樹状突起演算機能および神経発火との関係性について形態学・機能的に検証した。

まず、統合失調症モデルマウス (DISC1 KD および Calcineurin KO) の錐体細胞で生じている現象の定量化を行った。標本は、マウス前頭野領域から急性スライス標本を作製する *in vitro* 実験と、*in vivo* 2 光子励起イメージングおよび Two-photon targeting cell attached 法による *in vivo* 実験を目的に応じて使い分けた。*in vitro* の実験では、グルタミン酸アンケーシングを用いた単一スパイン刺激を、巨大スパインを含む様々な刺激パターンで行い、同時に樹状突起におけるカルシウムスパイクを Cal-520 の蛍光値から求め、同時に膜電位および神経発火はホールセルパッチクランプの電気記録を用いて同一細胞より検出した。これらから、どのようなシナプス入力が (巨大なスパインが 1 つでもあれば良いのか、複数必要なのか? 樹状突起におけるスパインの分布は重要なのか?)、どのような樹状突起イベントを介して (時間積分、空間積分の定量化)、神経発火を誘発するか検討し、さらに様々な阻害剤を比較検討した。

4. 研究成果

今回の研究により、樹状突起スパインのサイズと神経発火の誘導に対する影響との関連を示唆する結果を得た。例えば Häusser らによれば、8 個のスパインへの同時入力で神経発火が生じるとある (Branco et al, 2010, Science)。一方で、今回の結果が示した知見によれば、条件が良い細胞を選べば、従来の報告より少数の巨大スパインの入力で、比較的大きな樹状突起イベントに続いて (図 2C)、神経発火が惹起できる (図 2D)。精神疾患モデルマウスでは、通常よりも大きなスパインの出現という表現型が見出されることを考えると、神経細胞の発火機能が持つ、同時入力を検出する Coincidence detector としての機能が著しく障害されている可能性が示唆される。これらの結果は、論文発表に向け取りまとめている。

今後は、この現象がどの程度の普遍性をもつのかを明らかにする予定である。また、今回測定した錐体細胞や樹状突起のパラメータを基にしたシミュレーションを行うことにより作用機序や外的な操作による介入の影響についての予想を立て、新たな仮説導出および仮説検証を行う予定である。



【図 2】 シナプス刺激による樹状突起および細胞体イベントの同時計測: (A) 細胞内液より Cal-520 を注入し、その蛍光値より、如何なるスパイン刺激のパターンで、どのような樹状突起イベントが惹起されるか計測する。(B) 同一の細胞体よりホールセル記録を行い、膜電位および活動電位の時系列パターンを測定する。

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