

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250014

研究課題名(和文) イメージングによる神経回路動態とその障害の特徴抽出

研究課題名(英文) Dynamics of neural circuit and its impairment studied by optical imaging

研究代表者

岡部 繁男 (Okabe, Shigeo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：60204012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,600,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス動態を先端的なイメージング技術を活用して解明することを目的として、大脳皮質における興奮性、抑制性シナプス形態の解析、二光子顕微鏡によるシナプス成熟過程の解析、超解像顕微鏡によるシナプス構造の解析、精神神経疾患モデル動物のイメージング解析を行った。これらの実験により、生後発達早期の神経回路発達過程におけるシナプス動態には回路特異的な制御機構が存在すること、シナプス動態が生後発達過程で障害される事によって、神経回路の機能不全が生じることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at understanding biological mechanism of synaptic dynamics by cutting-edge imaging technologies. To achieve this goal, we analyzed morphology and function of excitatory and inhibitory synapses in the neocortex, maturation steps of individual synapses imaged in vivo by two-photon microscopy, and defects in synaptic functions and dynamics in mouse models of psychiatric disorders. From these experiments, we conclude that synaptic dynamics in the developing neural circuits show circuit-specific regulation mechanisms. Furthermore, we showed that early impairments in synaptic dynamics cause dysfunction of neural circuits in later stages of development.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：シナプス イメージング 超解像顕微鏡 自閉症モデル動物

1. 研究開始当初の背景

神経回路の研究において、シナプスの形成・成熟の分子機構を明らかにすることは中心的な課題である。これまでのシナプス研究は、海馬の錐体細胞など、特定の神経細胞間でのシナプスに集中して行われてきた。一方で特定の脳の領域に着目して、シナプス動態の解析とその領域内の神経回路の機能の発現を対比して解析する試みは進んでいない。シナプス形成の多様性を説明するモデルとしては Sotelo model, Miller/Peters model, Filopodial model が知られている。これら3つの仮説は排他的であり、小脳の顆粒細胞とプルキンエ細胞の間のシナプスについて Sotelo model が当てはまるという以外は論争が続いている。申請者の研究室ではイメージング技術を応用してシナプス形成と発達の研究を進めており、シナプス形成が脳の領域や神経細胞の種類によって特異的に制御されている可能性を見出したことが本研究提案のきっかけとなった。

2. 研究の目的

本研究は多様なシナプス動態を先端的なイメージング技術を活用して解明することを目指とする。シナプスの動態は領域特異的かつ発達依存的に複雑に制御される。生後発達早期の神経回路の機能発達過程におけるシナプス動態の生理的な意義を探索し、制御機構を明らかにする。更にシナプス動態が生後発達過程で障害される事によって、神経回路の機能不全が生じ、精神神経疾患の発症に関与する可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 電子顕微鏡によるシナプス解析：従来行われてきた透過型電子顕微鏡によるシナプス微細形態の解析を超える手法として、超薄切片自動回収装置(ATUM)を用いた3次元立体画像再構築法を採用した。更にイオンビームにより試料表面を自動切削し、連続的に表面の走査電顕画像を取得することによって3次元立体画像を得る手法(FIB-SEM法)も併用してシナプス微細構造の解析を行った。

(2) 2光子顕微鏡による in vivo imaging：子宮内電気穿孔法により胎児期に脳室下帯に存在する神経前駆細胞に遺伝子を導入し、生後適当な時期に頭蓋骨を20ミクロン程度薄く削る thin skull 法を用いてイメージングを行った。数日間隔で同一脳領域の画像を取得し、安定なスパインと形成・消失したスパインを同定した。

(3) 超解像顕微鏡イメージング：構造化照明法および一分子検出法を利用して主にスパインの構造とスパイン内に存在する分子の分布についての情報を得た。一分子検出法の場合には一分子の重心位置を推定する手法である PALM 法、STORM 法を採用して画像化を実施した。

4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡を用いた神経回路機能発達過程の解析：走査型電子顕微鏡による3次元

立体画像再構築法を用いて、大脳皮質の生後発達過程におけるシナプス構造とグリアによる接触の程度を定量的に解析した。また自閉症のモデルマウスであるヒト15番染色体重複を模倣したモデルマウス(patDp/+マウス)を用いて、シナプス密度やグリアによる接触様式の定量化を行った。自閉症モデルマウスにおいては興奮性シナプスと抑制性シナプスのバランスに異常が観察され、このバランスを制御することで自閉症の臨床症状の緩和につながる可能性が示唆された(Nakai et al. Science Advances in press)。

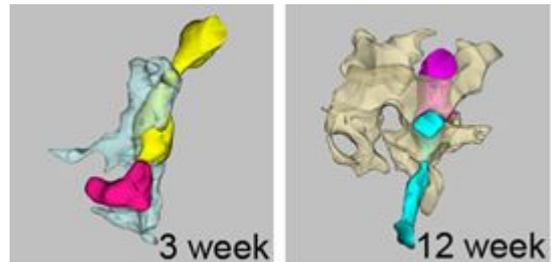


図1 電子顕微鏡3次元立体再構築により得られた興奮性シナプスの立体画像

(2) 二光子顕微鏡 in vivo imaging を用いたシナプス発達過程とその障害の解析

自閉スペクトラム症における神経回路の変化の特徴を明らかにするため、複数の自閉症モデルマウスについて二光子顕微鏡によるシナプスイメージングを行い、異なった遺伝的背景を持つ動物モデルで共通にみられるシナプスレベルでの表現型を特定することを試みた。

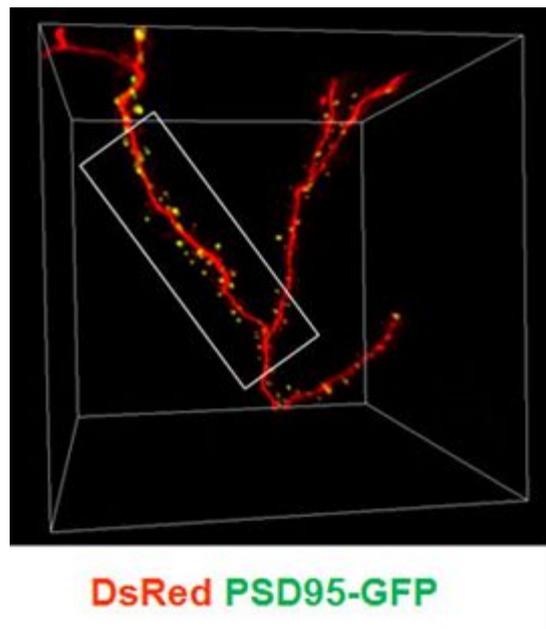


図2 二光子顕微鏡画像から立体再構築された樹状突起形態(赤: DsRed)とシナプス後部構造(緑: PSD95-GFP)

モデルマウスとしては前述した patDp/+マウス、シナプスの接着分子である neuroligin3 の点突然変異マウス、マウス系統として社会

性の障害を示す BTBR マウスの 3 系統を用いた。これら 3 種類のマウスは行動レベルで社会性の障害を示すが、脳のマクロ形態やシナプスの密度については著明な変化がないことが報告されている。これらの 3 種類の自閉症モデルマウスに対して生後 3 か月の大脳皮質でシナプスイメージングを行い、シナプスの形成・消失率を測定したところ、全てのモデル動物でシナプスの形成・消失率が 50 - 100% 上昇していることが明らかになった。この変化は大脳皮質内部を連絡する皮質内の興奮性軸索が形成するシナプスに特異的であり、視床から大脳皮質に投射する軸索が形成するシナプスについては自閉症モデルマウスでも特に障害は見られなかった。この結果は自閉症特異的に大脳皮質内の線維連絡が障害を受けることを示している。また複数の全く異なる遺伝子背景を持つ動物でも同じ回路レベルでの表現型を示すことから、神経回路における共通表現型という意味を持つと考えられる。(Isshiki et al. Nature Communications, 2014)

(3) 超解像顕微鏡を用いたシナプスイメージング

PALM 法を用いたシナプス分子の分布解析により、シナプス可塑性誘導後に複数のシナプス足場蛋白質の分布を観察すると、分子種特異的な分布の変化を示すことを明らかにした。また構造化照明法(SIM)により取得したシナプスの構造データを元にして、その表面積や体積等を比較的正確に計算できる手法を開発し、複数の遺伝子改変動物においてそのシナプス形態の変化を定量的に解析した。(以上は未発表データ)

(4) シナプス動態を検出するためのマーカーの開発と応用

シナプス伝達における最も重要な分子であるグルタミン酸受容体に着目し、AMPA 型グルタミン酸受容体の機能とその分子動態に関する研究を行った。モデル動物としてのホヤの幼生における AMPA 型受容体の役割を機能抑制実験等により明らかにし、シナプス伝達以外にも組織発生の過程に関与することを示した(Hirai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017)。AMPA 受容体の細胞内への取り込みと細胞内輸送をモニターするためのプローブを開発した(Hayashi et al., Neuropharmacology, 2016)。この手法により、AMPA 受容体の膜表面からの endocytosis による取り込みがスパイン局所でも活発であることが示された。

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 15 件)

1. Nakai, N., Nagano M., Saitow F, Watanabe

W., Kawamura Y., Kawamoto A., Tamada K., Mizuma H., Onoe H., Watanabe Y., Monai H., Hirase H., Nakatani J., Inagaki H., Kawada T., Miyazaki T., Watanabe M., Sato Y., Okabe, S., Kitamura K., Kano M., Hashimoto K., Suzuki H., and T. Takumi Serotonin Rebalances Cortical Tuning and Behavior Linked to Autism Symptoms in 15q11-13 CNV Mice **Science Advances** in press. 査読有.

2. Hirai, S., Hotta, K., Kubo, Y., Nishino, A, Okabe, S., Okamura, Y. and H.Okado AMPA glutamate receptors are required for sensory-organ formation and morphogenesis in the basal chordate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 査読有, 114(15), 3939-3944, 2017 doi: 10.1073/pnas.1612943114

3. Parajuli, L. K., Tanaka, S., and S. Okabe. Insights into age-old questions of new dendritic spines: From form to function. **Brain Research Bulletin**. 査読有, 129, 3-11, 2017. pii: S0361-9230(16)30168-X. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.07.014.

4. Miyazaki, J., Tadatsune, I., Tanaka, S., Hayashi-Takagi, A., Kasai, H., Okabe, S., and T. Kobayashi Fast 3D visualization of endogenous brain signals with high-sensitivity laser scanning photothermal microscopy. **Biomedical Optics Express**. 査読有, 7, 1702-1710, 2016. doi: 10.1364/BOE.7.001702

5. Ochi, T., Nakatomi, H., Ito, A., Okabe, S. and N. Saito. Temporal Changes in the response of SVZ neural stem cells to intraventricular administration of growth factors. **Brain Research**. 査読有, 1636, 119-129, 2016. doi: 10.1016/j.brainres.2016.01.046.

6. Hayashi, A., Asanuma, D., Kamiya, M.,

- Urano, U. and S. Okabe. High affinity receptor labeling based on basic leucine zipper domain peptides conjugated with pH-sensitive fluorescent dye: visualization of AMPA type glutamate receptor endocytosis in living neurons. **Neuropharmacology**. 査読有, 100, 66-75, 2016. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.07.026.
7. Matlashov M. V., Bogdanova Y. A., Mishina N. M., Ermakova Y. G., Nikitin E. S., Balaban P. M., Okabe, S., Lukyanov S., Enikolopov G., Zaraisky A. G., and Belousov VV. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: applications in neuroscience and regenerative biology. **BBA-General Subjects**. 査読有, 1850, 2318-2328, 2015. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.08.002.
8. Oshiro, H., Hirabayashi, Y., Koretune, H., Nakao, K., Aizawa, S., Okabe, S. and Y. Gotoh Upregulation of HP1 expression during neuronal maturation promotes axonal and dendritic development in mouse embryonic neocortex. **Genes to Cells**. 査読有, 20, 108-120, 2015 doi: 10.1111/gtc.12205.
9. Ogura, T., Hamada, T., Matsui, T., Tanaka, S., Okabe, S., Kazama, T., and Y. Kobayashi Neuroprotection by JM-1232(-) against oxygen-glucose deprivation-induced injury in rat hippocampal slice culture. **Brain Research**. 査読有, 1594:52-60, 2015. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.038.
10. Isshiki, M., Tanaka, S., Kuriu, T., Tabuchi, K., Takumi, T. and S. Okabe. Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism. **Nature Communications**. 査読有, 5, 4742, 2014. doi: 10.1038/ncomms5742.
11. Ebrahimi, S., and S. Okabe. Structural dynamics of dendritic spines: molecular composition, geometry and functional regulation. **BBA-Biomembranes**. 査読有, 1838, 2391-2398. 2014. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.06.002.
12. Ito-Ishida, A., Okabe, S. and M. Yuzaki. The role of Cbln1 on Purkinje cell synapse formation. **Neuroscience Research**. 査読有, 83, 64-68, 2014 doi: 10.1016/j.neures.2014.01.009.
13. Ito-Ishida, A., Kakegawa, W., Kohda, K., Miura, E., Okabe, S. and M. Yuzaki. Cbln1 down-regulates the formation and function of inhibitory synapses in mouse cerebellar Purkinje cells. **European Journal of Neuroscience**. 査読有, 39, 1268-1280, 2014. doi: 10.1111/ejn.12487.
14. Isshiki, M. and S. Okabe. Evaluation of cranial window types for in vivo two-photon imaging of brain microstructures. **Microscopy**. 査読有, 63, 53-63, 2014. doi: 10.1093/jmicro/dft043.
15. Dai X., Iwasaki H., Watanabe M. and S. Okabe. Dlx1 transcription factor regulates dendritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression. **European Journal of Neuroscience**. 査読有, 39, 531-47, 2014. doi: 10.1111/ejn.12413.
- [学会発表](計16件)
1 岡部繁男 Imaging structural remodeling of synapses in vitro and in vivo. In "Collaborations in Neuroscience Symposium" Max-Planck Florida Institute for Neuroscience, May 9-10, 2014 (May 9), Palm Beach County (USA).

- 2 岡部繁男 Visualization of assembly and remodeling of synaptic molecules. In “Dendrites: Molecules, Structure & Functions” Gordon Research Conference, March 15-20 (March 18), 2015, Ventura (USA).
- 3 岡部繁男 Synapse development and remodeling studied by imaging technologies. “International Brain Projects” Cold Spring Harbor Conferences Asia, June 19-22 (June 21), 2015, Suzhou (China).
- 4 岡部繁男 Imaging microglia and synapses with an optical clearing technique. “Novel insights into glia function & dysfunction” Cold Spring Harbor Conferences Asia, June 22-26 (June 25), 2015, Suzhou (China).
- 5 岡部繁男 Imaging microglia and synapses with an optical clearing technique. XII European meeting on glial cells in health and disease, July 15-18 (July 15), 2015, Bilbao (Spain).
- 6 岡部繁男 Imaging synapse dynamics in vivo; its application in the analysis of neurodevelopmental disorders. In 25th Neuropharmacology Conference 2015, “Synaptopathy - From biology to therapy”. October 15-16 (October 15), 2015, Chicago, (USA).
- 7 岡部繁男 In vivo imaging of synapse dynamics applied to psychiatric disorders. Symposium “Advanced molecular imaging of synapses in health and disease”, Neuroscience 2015, October 17-21 (October 19), 2015, Chicago (USA).
- 8 岡部繁男 Imaging synapse remodeling in vitro and in vivo. IMA conference on neural imaging in neuroscience. March 21-23 (March 22), 2016, Cambridge (UK).
- 9 岡部繁男 Imaging technologies for the understanding of synapse development and dysfunction. US-Japan Brain Workshop March 30, 2016, 読売ビル内 AMED 会議室 (東京都・千代田区).
- 10 岡部繁男 Maturation-dependent regulation of synaptic density and the role of CaMKII. US-Japan Brain Research Cooperative Program Current trends and future directions of synaptic plasticity research, June 22-25 (24), 2016, Baltimore (USA).
- 11 岡部繁男 自閉スペクトラム症の病態理解に向けて モデル動物イメージングからのアプローチ. シンポジウム「脳科学から見た自閉スペクトラム症」第46回日本神経精神薬理学会, 2016年7月2-3日(2日), ソウル(韓国).
- 12 岡部繁男 High resolution imaging analysis of postsynaptic structure in Symposium “Frontiers of advanced, high-resolution optical imaging for neuroscience” 第39回日本神経科学大会 2016年7月20-22日(21日), パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- 13 岡部繁男 Maturation-dependent regulation of synaptic density and dynamics. The 47th NIPS International Symposium “Decoding Synapses”, Oct 26-28 (26), 2016, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市).
- 14 岡部繁男 Developmental Defects in cortical synapse remodeling associated with autism spectrum disorders. NSF-AMED Workshop: Comparative Principles of Brain Architecture and Functions, Nov 17-18 (17), 2016, San Diego (USA).
- 15 岡部繁男 High resolution imaging of synaptic structure and molecules. Super-resolution & Intra-vital Imaging

Workshop, The 4th International Anatomical Sciences & Cell Biology Conference 2016, Dec 4-6 (4), 2016, Hong Kong (Hong Kong).

16 岡部繁男 Imaging synapses in vivo - physiology and pathology of synapses and neural circuits (Plenary Lecture). The 4th International Anatomical Sciences & Cell Biology Conference 2016, Dec 4-6 (6), 2016, Hong Kong (Hong Kong).

〔その他〕

ホームページ等

東京大学・大学院医学系研究科 神経細胞生物学分野 岡部研究室

<http://synapse.m.u-tokyo.ac.jp/>

大阪大学 大学院医学系研究科 細胞生物学 原田研究室

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/acb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 繁男 (OKABE Shigeo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：60204012

(2) 研究分担者

原田 彰宏 (HARADA Akihiro)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40251441

(3) 連携研究者

岩崎広英 (IWASAKI Hirohide)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)講師

研究者番号：30342752

(4) 研究協力者

()