

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 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：2014～2015

課題番号：26890026

研究課題名(和文) 大脳皮質の広領域動態解析の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of wide-field Ca²⁺ imaging of cerebral cortex.

研究代表者

仲柴 俊昭 (Nakashiba, Toshiaki)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・研究員

研究者番号：90733931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Ca²⁺センサー蛍光蛋白質を大脳皮質興奮性細胞あるいは抑制性細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスに、炎症起因性発達障害の手法を用いて統合失調症様の病態を引き起こすことができるか検討した。ついで、マクロ顕微鏡により病態モデルマウスの自発性および知覚刺激依存的な神経活動について、細胞内Ca²⁺濃度変化を指標に、頭蓋骨外から非侵襲的に観察した。また、アデノ随伴ウイルスを作製し、Ca²⁺センサーを効率良く感染させる手法について検討した。

研究成果の概要(英文)：With the method of maternal immune activation, we have induced schizophrenia-like condition to mice expressing Ca²⁺ sensor, YC2.60, in either excitatory or inhibitory neurons of the cerebral cortex. Subsequently, we examined spontaneous neuronal activities and sensory stimulus-evoked responses through skulls under a microscope. In addition, we have explored better condition to infect AAV virus for imaging at wider cortical area.

研究分野：神経科学

キーワード：脳神経 イメージング モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は代表的な精神疾患であり、近年のfMRIイメージング研究の進展は、本疾患の本質が限定的な脳局所の機能異常に留まらず、異なる脳領域間(マクロな神経回路)を流れる情報の乱れに依る情報統合の異常であることを示唆している。この事が、本疾患起因因子の多因子性と共に実験動物モデルを用いた病理機構の研究を困難にしている。特に遺伝子変異を導入した統合失調症モデルマウスでは、その遺伝子種が多岐にわたるにも関わらず、共通の主要なフェノタイプとしてシナプスの機能異常があげられている。しかし、これらのシナプス機能異常が、どのような上位階層であるマクロ神経回路レベルでの異常を引き起こし、ひいては統合失調症に至るのかについて調べる研究はなされていない。同様の問題は統合失調症のみならず、殆ど全ての精神疾患および認知疾患に共通すると考えられる。したがって、精神疾患等の病態を正しく理解し将来の治療指針の基盤を提供するためには、機能異常の源における病理機構の詳細を明らかにすると共に、その異常がマクロ神経回路に及ぼす影響を併せて解析する事が必要である。

2. 研究の目的

統合失調症は多様な症状(陽性症状、陰性症状、および認知機能不全など)を呈し、単一脳領域の異常ではなく、広範な神経回路間の情報統合機構の異常に起因すると考えられる。有効な治療方針の確立には、個々のエンドフェノタイプの機序を局所(ミクロ)な神経回路レベルで明らかにする事が欠かせないが、特に異なる脳領域間(マクロな神経回路)での情報の流れの理解も必要である。本研究では、広範な遺伝学的手法を用いて局所回路(ミクロな神経回路)を操作する事ができ、統合失調症モデル動物が利用できるマウスをモデル動物として選択し、マクロ回路レベルでのニューロンの動態をモニターする手法を開発すると共に、既存統合失調症モデルマウスを利用して、行動学的エンドフェノタイプに関連するマクロ回路レベルでの情報の流れの変化を定量的に評価する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Ca²⁺親和性を持つCa²⁺センサー蛍光蛋白質であるYC2.60を大脳皮質興奮性細胞あるいは抑制性細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを用いて、マクロ顕微鏡観察により頭蓋骨外から非侵襲的に自発性および知覚刺激依存的な細胞内Ca²⁺濃度の動態を観察することを目指した。まず、これらのマウスに統合失調症を模倣する発達障害を誘導する手段として、炎症起因性発達障害の統合失調症モデルに使われるPoly(I:C)投与方法を用いた。具体的には、これまでの文献報告を参照して、交配後9.5日目の母マウス

の尾静注にPoly(I:C)を5 mg/kgの濃度で投与した。この胎生期でのPoly(I:C)投与が発達期に炎症反応を引き起こし、統合失調症を模倣する発達障害を誘導するかどうかについて、①オープンフィールド試験と、②プレパルス抑制試験の行動解析を行い、コントロールマウスと比べて統合失調症のエンドフェノタイプがあるかどうか検証した。次いで、③頭蓋骨外から大脳皮質での自発性および知覚刺激依存的な細胞内Ca²⁺濃度の動態を観察した。

(2) 現在、多様な遺伝子種の変異マウスが様々な精神疾患のモデルマウスとして報告されつつある。これらのマウスで大脳皮質Ca²⁺動態解析を行うために、(1)で用いたトランジェニックの方法でCa²⁺センサーを発現させる場合、多重交配によって必要となる労力と時間は莫大なものとなる。この問題を回避するために、トランジェニック以外の方法でCa²⁺センサーをマウス個体に導入することができかどうか検討した。アデノ随伴ウイルス(AAV)を作製し、幼若マウスの大脳皮質へ注入してやり、ウイルスを広範囲に感染させることができるか組織学的な解析を行った。また、ウイルスで発現させたCa²⁺センサーによって、自発性および知覚刺激依存的な細胞内Ca²⁺濃度の動態を観察可能であるかの検討を行った。

4. 研究成果

(1) ①オープンフィールド

YC2.60を大脳皮質興奮性細胞あるいは抑制性細胞特異的に発現するそれぞれのトランスジェニックマウスに対し、胎生期9.5日齢でPoly(I:C)を投与した群と投与しないコントロール群を用意した。同腹のYC2.60を発現しないマウスについてもオープンフィールドの行動解析を行った。コントロール群では、Poly(I:C)を投与すると、リアリングの回数が有意に増えた(図1)。しかし、YC2.60を興奮性細胞あるいは抑制性細胞に発現する群では、Poly(I:C)投与によるリアリング回数に対する効果は見られなかった。(図1)

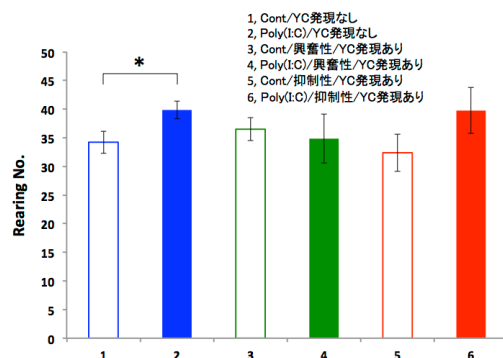


図1、オープンフィールドテストでのリアリングの回数

YC2.60を発現しないマウス群でPoly(I:C)

投与による影響について、他のパラメータを指標にして調べたが、全移動量、移動スピードならびに中央部分の滞在時間と馴化の度合いなど、すべてのパラメータで違いを見いだす事はできなかった (図 2)。

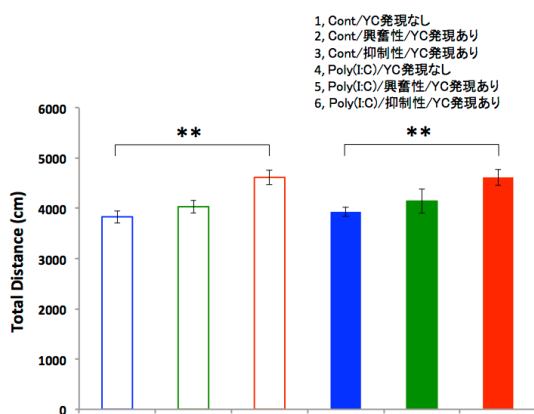


図 2、オープンフィールドテストでの全移動量

一方、YC2.60 の発現が行動に及ぼす影響についても調べると、抑制性神経細胞で YC2.60 を発現する群は、発現しない群よりも、有意に全移動量が増えていることが明らかとなった。この抑制性神経細胞で YC2.60 を発現した場合の影響は、Poly(I:C) 投与群間で比較しても同様に見られた (図 2)。

②プレパルス抑制試験

まず、YC2.60 を発現しない群について、プレパルス抑制試験において Poly(I:C) 投与の効果を見ると、図 3 のように Poly(I:C) 投与群のプレパルスによる抑制効果は、コントロール群と比較して有意に小さかった。このような変化は、メスマウスにのみに観察され、オスマウスでは変化が見られなかった。

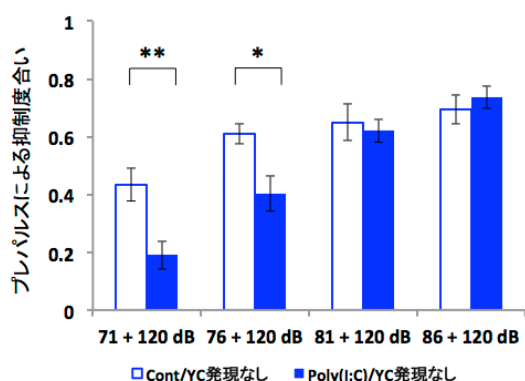


図 3、YC2.60 を発現しないメスマウスについてプレパルス抑制試験における抑制度合い

次に、YC2.60 を大脳皮質興奮性細胞に発現するメスマウスに対し、Poly(I:C) 投与の効果を見た。図 4 のように YC2.60 を発現しない群で観察された抑制効果の減少と同様に、YC2.60 を大脳皮質興奮性細胞に発現させた

場合でも、抑制効果は減少の傾向にあった (71+120 dB で $p=0.076$)。一方、このような傾向は、オスマウスでは見られなかった。

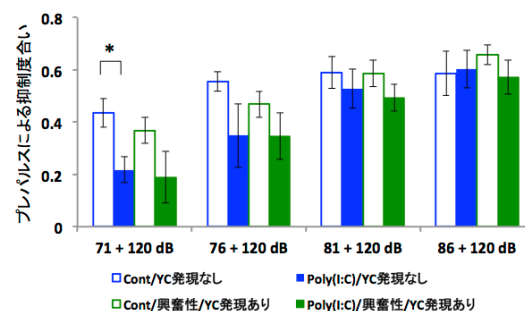


図 4、大脳皮質興奮性細胞に YC2.60 を発現するメスマウスと、同腹の YC2.60 を発現しないメスマウスについて、プレパルス抑制試験における抑制度合い

③大脳皮質での細胞内 Ca²⁺濃度の動態

軽麻酔下のマウス頭蓋骨外から大脳皮質興奮性細胞での自発性および知覚刺激依存的な細胞内 Ca²⁺濃度の動態を観察し、コントロールマウスと Poly(I:C) 投与マウスで比較した例を図 5 と 6 に示す。

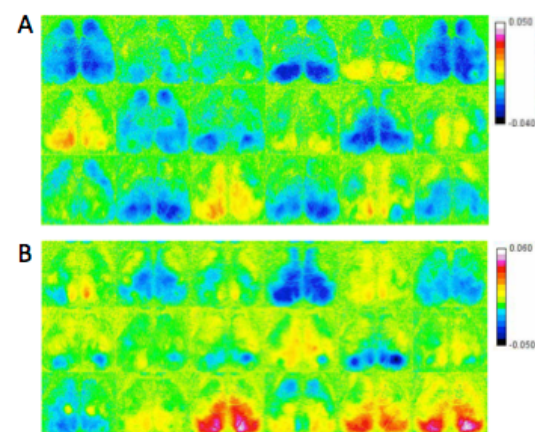


図 5、大脳皮質興奮性細胞での自発性細胞内 Ca²⁺濃度の動態。A, コントロールマウス; B, Poly(I:C) 投与マウス。

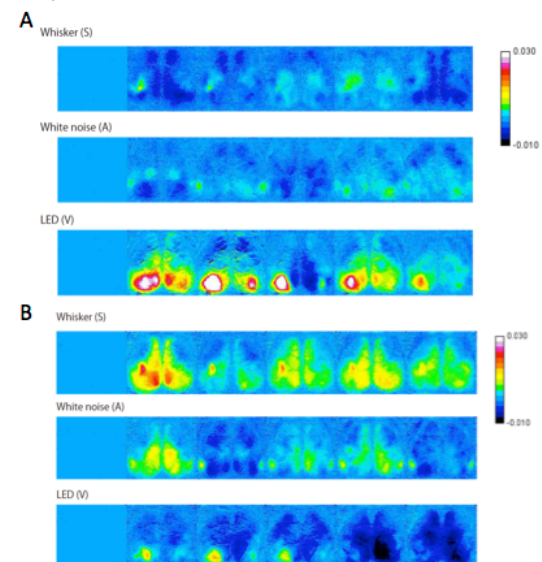


図6、ヒゲ(S)、音(A)、光刺激(LED)時に、大脳皮質興奮性細胞での細胞内Ca²⁺濃度の動態。A, コントロールマウス; B, Poly(I:C)投与マウス。

各種知覚刺激時に、それぞれの知覚情報を処理する大脳皮質野にて興奮性細胞内のCa²⁺濃度の上昇が見られ、また自発的なCa²⁺濃度変化の振動が見られた(図5と6)。現在、例数を増やし、コントロールマウスとPoly(I:C)投与群との間で変化があるかの解析を行っている。

以上の行動解析の結果より次の3点が明らかとなった。

- A, YC2.60の発現自体が神経細胞に影響を与え、行動の変化を引き起こす。特に抑制性の神経細胞でYC2.60を発現させるとオープンフィールドでの活動量が上昇した(図2)。
- B, 統合失調症のヒト患者で観察されるプレパルス抑制の異常と同一な異常を、胎生期にPoly(I:C)を投与する事によって、メスマウスに再現することができた(図3)。
- C, 大脳皮質興奮性細胞にYC2.60を発現させた場合でも、Poly(I:C)を投与後のメスマウスでプレパルス抑制に異常が見られる傾向があった(図4)。

これらの行動解析結果から、Poly(I:C)の投与による炎症起因性発達障害が有効な統合失調症のモデルマウスとなりうることを示した。また、細胞内Ca²⁺濃度の動態を測定する実験より、統合失調症患者における知覚情報の処理過程の異常について推測するために、モデルマウスが有効であることを示した。今後、例数を増やしたCa²⁺濃度動態解析の結果から、各知覚野の機能異常に留まらず、異なる脳領域間(マクロな神経回路)を流れる情報の乱れに依る情報統合の異常が見いだされることが期待される。

もう一つ特筆すべき点は、Ca²⁺センサー蛍光蛋白質はCa²⁺親和性を持つがゆえに、その発現自体が神経細胞の挙動を変え、ひいては行動の異常へとつながることである。神経細胞の種類によって影響が異なるという今回の結果は、Ca²⁺センサーを用いた研究結果の解釈に注意を換気することになるであろう。

(2) Ca²⁺センサー蛍光蛋白質であるYC2.60およびYCX1.6を神経細胞特異的に発現できる高力価AAVウイルスを作製し、出生直後の側脳室へ注入し、成体になった時の蛍光蛋白質の発現を見た。図7と8に示されるように、大脳皮質の広範囲に渡ってウイルスが感染し、多くの神経細胞にて、効率良くCa²⁺センサーが発現していることが明らかとなった。

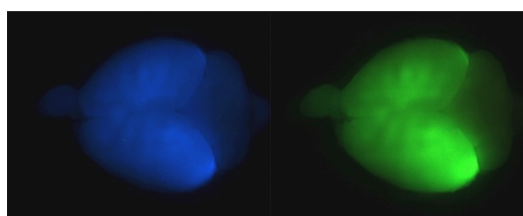


図7, CFP(左)とVenus(右)の蛍光写真

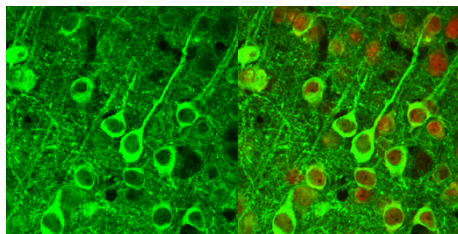


図8, Ca²⁺センサーのYC(緑)が、多くの神経細胞(赤)で発現している。

次いで、ウイルスを介して発現させたCa²⁺センサーによって、自発的な神経活動に伴うCa²⁺濃度の動態変化を観察できるか調べるため、軽麻酔下のマウスをマクロ顕微鏡にて観察した。図9に示されるように、左右両側の脳で同期した自発的なCa²⁺濃度変化の振動が見られた。

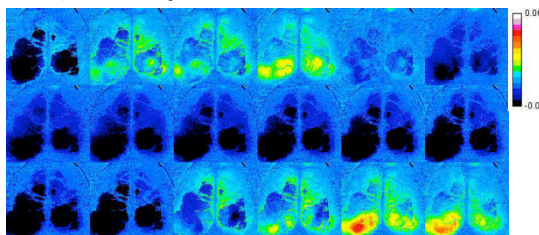


図9, 軽麻酔下のマウスの自発的なCa²⁺濃度の変化

これらの結果より、大脳皮質の広範囲の神経細胞にCa²⁺センサー蛍光蛋白質を発現させることが可能であり、その発現量は自発的なCa²⁺濃度の変化を検出するのに十分であることが明らかとなった。これにより、多重交配によらずに、様々な遺伝子種の変異による精神疾患のモデルマウスに対して、簡便にCa²⁺センサー蛍光蛋白質を発現させることが可能となった。しかし、個体間での計測結果を正確に比較できるようになるためには、ウイルスの感染範囲と発現量について再現性をもって巧妙に制御する必要がある。このことが、トランジェニック以外の方法でCa²⁺センサーをマウス個体に導入するために克服しなければならない残された課題である。

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 3件)

- ① Zhang Q, Goto H, Akiyoshi-Nishimura S, Prossellkov P, Sano C, Matsukawa H, Yaguchi K, Nakashiba T, Itohara S.

Diversification of behavior and postsynaptic properties by netrin-G presynaptic adhesion family proteins. Mol Brain 9:6. (2016) 査読有り
DOI: 10.1186/s13041-016-0187-5.

② Itohara S, Koobayashi Y, Nakashiba T. Genetic factors underlying attention and impulsivity: mouse models of attention-deficit/hyperactivity disorder. Current Opinion in Behavioral Sciences, 2:46-51 (2015) 査読有り
DOI: 10.1016/j.cobeha.2014.09.002

③ Matsukawa H, Akiyoshi-Nishimura S, Zhang Q, Luján R, Yamaguchi K, Goto H, Yaguchi K, Hashikawa T, Sano C, Shigemoto R, Nakashiba T, Itohara S. Netrin-G/NGL complexes encode functional synaptic diversification. J Neurosci. 34(47):15779-92. (2014) 査読有り
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1141-14.2014.

〔学会発表〕(計 2件)

① 仲柴俊昭、遺伝研研究会・ほ乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム、「The role of dentate gyrus granule cells in pattern separation and pattern completion.」平成 26 年 12 月 2 日、岡崎市

② 仲柴俊昭、生理研研究会・シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミズム、「The role of dentate gyrus granule cells in pattern separation and pattern completion.」平成 26 年 12 月 1 日、三島市

〔図書〕(計 1件)

① 仲柴俊昭、「Optogenetics による記憶の操作」生体の科学、2016年02月号、67, 27-31 (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://bgshige.brain.riken.jp/indexj.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲柴 俊昭 (NAKASHIBA TOSHIAKI)
国立研究開発法人理化学研究所
バイオリソースセンター・研究員
研究者番号：90733931

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：