

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19672

研究課題名(和文) レット症候群の神経基盤となる成熟型シナプス維持の破綻メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for regression of matured synapses as a neuronal basis for Rett syndrome

研究代表者

鳴島 円 (Narushima, Madoka)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・准教授

研究者番号：30596177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：レット症候群はMeCP2遺伝子の欠損が原因の発達障害疾患であり、動物モデルでは視床求心性シナプスが成熟後に維持されず、幼若型の結合パターンに退行する。これまでMeCP2と関連して神経回路の退行に直接的に関わるタンパク質は明らかでなかった。本研究では、mGluR1欠損マウスが視床の求心性シナプスでMeCP2欠損マウスと同様の表現型を示すこと、mGluR1がMeCP2に似た時間経過で発現し、視覚経験依存的なシナプス維持機構に必要な十分な分子であることを証明した。この研究成果により、mGluR1とMeCP2が密接に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome is a neurodevelopmental disorder that is induced by a genetic mutation of the Methyl CPG-binding protein 2 (MeCP2) and that is characteristic for regression of once acquired cognitive functions and behaviors. Regression of matured synaptic connectivity has been reported in the afferent synapses of the visual thalamus in MeCP2-knockout (KO) mice but molecular mechanisms underlying regression of synaptic connectivity in relation with MeCP2 was unclear. We reported that KO mice of the metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) showed similar phenotype as MeCP2-KO mice that exhibited regression of once matured synaptic connectivity in the visual thalamus. mGluR1 expressed in a similar developmental time course with MeCP2 and was necessary and sufficient for maintenance of matured synaptic connectivity in the thalamic afferent synapses. These results strongly suggest that mGluR1 and MeCP2 have strong relationship in the maintenance of matured neuronal circuits.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 発達 維持 mGluR1 MeCP2 レット症候群

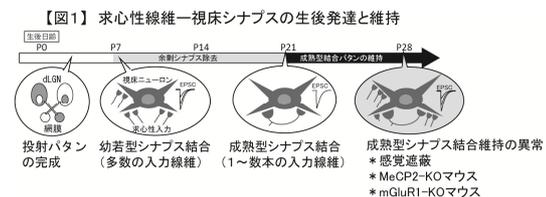
1. 研究開始当初の背景

レット症候群は出生から生後6 - 18ヶ月の発症までは正常な精神・運動発達を示すが、発症後は急速な神経・運動機能の退行がおり、重度の知的障害や運動失調を呈する疾患である。レット症候群の原因遺伝子であるメチル化 CpG 結合タンパク2 (MeCP2) は、千種類以上の遺伝子の転写を抑制・促進する役割を持つ (Science 320:1224-1229, 2008)。MeCP2-KO マウスでは、神経細胞のサイズの低下や形態異常、シナプス可塑性の異常がみられ (Neuropharmacology 38:212-219, 2013)、レット症候群の神経病態が発達期の神経回路網の異常にあると予想されている。しかし、退行現象をもたらす詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

近年、MeCP2 欠損マウスの網膜 - 視床外側膝状体 (dLGN) シナプスの解析から、成熟型のシナプス結合の維持に異常があることが報告された (Neuron 70:35-42, 2011)。発達初期のマウス網膜 - dLGN 間ではまず左右両眼からの視神経の投射領域が分離した後に、余剰シナプスの除去と必要なシナプスの強化が起き、生後20日齢までに成熟型の結合パターンが獲得される (図1)。一方、生後20日以降で暗室飼育すると幼若型の結合パターンに退行することから、視覚経験に依存した成熟型結合パターンの維持機構の存在が示唆されている (図1; Neuron 52:281-291, 2006)。MeCP2-KO マウスではシナプス除去および強化は正常に完了し、成熟型の結合パターンが形成されるにも関わらず、のちに再びシナプスが増加し、さらに両眼からの視神経の投射領域が混在して、幼若型の結合パターンに退行する (Neuron 70:35-42, 2011)。このため、レット症候群における神経機能の退行現象は、成熟型シナプス結合の維持

機構の破綻による可能性があることが示唆されていた。

申請者はこれまでの研究で、1型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) KO マウスの網膜 dLGN シナプスおよび体性感覚系の内側毛帯線維 視床 VPm シナプスで、MeCP2-KO マウスと同様の成熟型シナプス結合パターンの維持の異常を発見した。また、生体内で dLGN の mGluR1 を薬理的に活性化することで、視覚経験遮断 (生後20 - 30日齢) により誘発される幼若型結合パターンへの退行を抑制することに成功した。つまり、mGluR1 は成熟型の視床シナプス維持に必須の分子である可能性が高く、その機能を解明することで成熟型シナプス維持機構のメカニズムが明らかとなり、さらにレット症候群の病態理解につながると考えられる。



2. 研究の目的

これまでの研究から、MeCP2 と mGluR1 はともに感覚経験による求心性線維 視床シナプスの成熟型結合パターン維持に関わると考えられるが、これまで、2つの分子がシナプス維持にどのように関わり、どのように関連しているかについて着目した研究は行われていなかった。そこで本研究では、(1) 成熟型シナプス維持のメカニズムの解明 (2) MeCP2 と mGluR1 の関連の解明 を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では求心性線維 視床シナプスの機能的な発達・維持を解析するため、主にスライスパッチクランプ法を用いたシナプス伝達特性の解析を行った。これまでの研究では mGluR1-KO マウスを用いていたが、本研究では後天的な mGluR1 の機能を解析するため、micro RNA を用いて mGluR1 をノックダウン (KD) するため

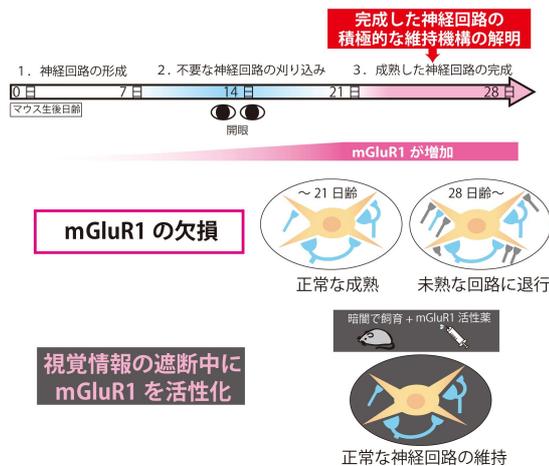
のウイルス、および mGluR1-KO マウスにおいて mGluR1 の発現をレスキューするウイルスを開発した。また、求心性線維の投射パターンを調べるためのトレーサーを用いた形態学的解析を行った。

4. 研究成果

これまで mGluR1 遺伝子欠損 (-KO) マウスを用いた解析を行ってきたが、本研究課題ではまず、新たに開発したウイルスベクターを用いて、野生型マウスの外側膝状体ニューロンに特異的な mGluR1 の発現抑制、および mGluR1-KO マウスの外側膝状体ニューロンの mGluR1 発現回復をもたらす効果を解析した。従来用いていた mGluR1-KO マウスは網膜を含むその他の領域でも mGluR1 が欠失していたが、mGluR1 の発現を阻害する短鎖 RNA を含むウイルスを使用することにより、ウイルスに感染した外側膝状体ニューロンでのみ mGluR1 の発現を抑制することができた。また、mGluR1-KO マウスの外側膝状体に、ウイルスにより mGluR1 を強制発現させることにより、外側膝状体ニューロンでのみ mGluR1 の発現を回復させることができた。その結果、網膜 - 外側膝状体シナプスの維持に外側膝状体ニューロンにおける mGluR1 の発現が必須であることを明らかにした。

MeCP2 はマウスを暗室飼育することで生じる網膜 - 外側膝状体シナプス維持機構の破綻に関わることが報告されている (Noutel et al., 2011)。そこで暗室飼育中に mGluR1 を薬理的に活性化する実験を行ったところ、シナプスの異常な再編成を防ぎ、正常なシナプスを維持することができた。つまり、mGluR1 は視覚経験依存的な網膜 - 外側膝状体シナプスの維持に中心的な役割を果たす分子であり、同様の機能を持つ MeCP2 と相互作用している可能性が示唆された。平成28年度に代謝型グルタミン酸受容体1型 (mGluR1) の欠損がレット症候群のモデルマウスと同様の表現型を示すこ

とを報告した論文を Neuron 誌 (Impact Factor 13.97) に発表した (Narushima et al., Neuron 91, 1097-1109, 2016)。



次に、mGluR1 のシナプス維持における役割をより一般化するために、外側膝状体と同様に発達期のシナプス除去・維持が報告されている体性感覚系視床 (後内側腹側核) の求心性シナプスを対象に mGluR1 の機能解析を行った。その結果、外側膝状体では mGluR1 の発現を阻害したマウスの求心性シナプスはレット症候群モデルマウスと類似した正常発達後に起きる異常なシナプス再編成が見られたのに対し、後内側腹側核ではシナプスの発達期から、シナプス応答の振幅の低下やシナプス除去の異常が起こることを見出した。一部のシナプスは成熟に従っていったん強化されたが、その後外側膝状体と同様にシナプス再形成や個々のシナプス応答の減弱など、幼若型結合への退行が見られた。以上の結果から、mGluR1 はシナプスの正常な形成・強化・除去・維持の全過程に関わる分子であることが示唆される一方、mGluR1 発現阻害による後内側腹側核・求心性シナプスの異常はレット症候群モデルマウスの表現型とは異なるため、mGluR1 とレット症候群の原因遺伝子 MeCP2 との関連性については、より詳細な解析が必要となった。現在は発達の各時期で mGluR1 発現阻害時における MeCP2 の発現レベルを免疫組織化学的

染色およびウェスタンブロットング法にて確認中である。

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 2 件)

1. Narushima M.

Comparison of the role of metabotropic glutamate receptor subtype 1 in developmental refinement of neuronal connectivity between the cerebellum and the sensory thalamus.

Review, *Neurosci. Res.*, 129:24-31, 2018.

(published online on 2017 July)

査読あり

DOI: 10.1016/j.neures.2017.06.004.

2. Narushima M., Uchigashima M., Yagasaki Y., Harada T., Nagumo Y., Uesaka N., Hashimoto K., Aiba A., Watanabe M., Miyata M. and Kano M.

The metabotropic glutamate receptor subtype 1 mediates experience-dependent maintenance of mature synaptic connectivity in the visual thalamus.

Neuron, Vol 91(5):1097-1109, 2016

査読あり

DOI: 10.1016/j.neuron.2016.07.035.

[学会発表](計 6 件)

1. Narushima M.

Activation of the metabotropic glutamate receptor subtype 1 is necessary for visual experience-dependent maintenance of synaptic connectivity in the dorsal lateral geniculate nucleus. 第95回日本生理学会大会 2018年

2. Narushima M., Uchigashima M., Yagasaki Y., Harada T., Nagumo Y., Uesaka N., Hashimoto K., Aiba A.,

Watanabe M., Miyata M. and Kano M.

The metabotropic glutamate receptor subtype 1 mediates visual experience-dependent maintenance of synaptic connectivity in the dorsal lateral geniculate nucleus.

Neuroscience 2017 (北米神経科学学会) 2017年

3. Narushima M.

The metabotropic glutamate receptor subtype 1 mediates experience-dependent maintenance of mature synaptic connectivity in the dorsal lateral geniculate nucleus.

The 48th NIPS International Symposium (招待講演) 2017年

4. Narushima M., Takeuchi Y. and Miyata M.

The metabotropic glutamate receptor subtype 1 contributes to developmental refinement of afferent lemniscal synapses in the somatosensory thalamus.

第40回日本神経科学学会 2017年

5. Narushima M., Takeuchi Y. and Miyata M.

Cortical activity regulates refinement of afferent lemniscal synapses in the somatosensory thalamus.

第94回日本生理学会大会 2017年

6. Narushima M., Takeuchi Y. and Miyata M.

The metabotropic glutamate receptor subtype 1 contributes to developmental refinement of afferent lemniscal synapses in the somatosensory thalamus.

第39回日本神経科学学会 2016年

[その他]

ホームページ等

成熟した神経回路を維持する仕組みを解明 ~ 自閉症の病態解明に期待 ~

<http://www.twmu.ac.jp/univ/news/index.p>

hp?kbn=1&ym=201608

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鳴島 円 (NARUSHIMA, Madoka)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・准教授

研究者番号：30596177