

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07068

研究課題名(和文) 樹状突起スパインの形態変異を伴う統合失調症モデルマウスの電気生理学的解析

研究課題名(英文) Electrophysiological analysis in mouse models of schizophrenia accompanied by morphological changes of dendritic spines

研究代表者

鈴木 紀光 (Suzuki, Norimitsu)

群馬大学・生体調節研究所・特任講師

研究者番号：10322207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症脆弱性因子を操作した統合失調症モデルマウスを作製したところ、前頭前野の樹状突起スパインの形態異常を確認した。急性脳スライス標本を作製し、錐体細胞から興奮性シナプス電流を観察、さらに2光子顕微鏡、ケイジド試薬を利用して単一スパイン上のグルタミン酸受容体の動態、または樹状突起上の複数スパインによるシナプス入力演算を観察したところ、形態異常スパインがシナプス入力の亢進、さらには超加算的シナプス入力演算の亢進を引き起こすことを確認した。またモデルマウスの行動解析によりこれらのスパイン形態異常と作業記憶の低下との関連が確認された。スパイン形態変異が統合失調症の病態生理に寄与することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症モデルで見られる樹状突起スパインの形態変異(巨大スパイン)の機能解析によって、スパインサイズと統合失調症の病態生理との関連を示した報告はこれまでにない。シナプスには統合失調症関連因子が集積することが知られており、潜在的な創薬標的因子が多く存在するとされる。本研究により得られたスパインサイズと神経興奮性との関連性についての知見は、認知機能障害の理解と治療に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found extra-large (XL) spines in prefrontal cortex in mouse models of schizophrenia. Electrophysiological recordings from pyramidal cells of acute brain slice preparation revealed significant increases in excitatory postsynaptic currents in mouse models of schizophrenia. By combining activation of an individual XL spine by two-photon glutamate uncaging with measurements of synaptic and dendritic Ca events as well as whole-cell patch-clamp recording of the same neuron, we demonstrate that the relationship between spine size and the integral of the synaptic responses is steeply sigmoidal, revealing that a distinct population of XL spines can boost neuronal firing. We experimentally and theoretically observed that XL spines negatively correlated with working memory, which can contribute to psychiatric pathophysiology.

研究分野：神経科学

キーワード：スパイン 統合失調症 電気生理 2光子顕微鏡 シミュレーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内の神経細胞はシナプスを介して連絡しており、大脳皮質のグルタミン酸作動性シナプスの多くは樹状突起上のスパインという小突起構造を形成する。スパインは学習、経験に応じてその形態やサイズが劇的に変化し、それに伴い電気的伝達効率を変化させるため、スパインは脳機能の記憶素子と考えられ、さらに興味深いことに多くの精神疾患やそのモデル動物でスパイン形態や密度異常が報告されており、これら疾患の病因、病態生理と想定されてきた。いくつかの統合失調症モデルマウスで、前頭前野においてスパイン密度は減少する一方で巨大なスパインが散在するという共通するシナプス特性が見出され、いずれも前頭前野認知機能を反映するワーキングメモリの障害が認められている。ワーキングメモリ課題実行中にはグルタミン酸作動性錐体細胞が同期的発火し、同期発火の程度と課題実行能力には相関があることが知られており、ドーパミンをはじめとする神経伝達物質の影響、これらとグルタミン酸受容体機能との相互作用、GABA 作動性介在ニューロンの機能、そして、錐体細胞の神経生理学的な性質より制御されている。ワーキングメモリ障害の分子、細胞、システム基盤を見出すことは統合失調症の病態生理の解明にとって1つの重要なキーと考えられる。しかしながらどのようなメカニズムでワーキングメモリ障害、神経回路障害、その結果としての個体レベルの行動異常を誘発するのかは全く解明されていない。本研究では統合失調症とシナプス異常に焦点をあて、この疾患のモデルマウスが示す樹状突起シナプス形態異常が神経細胞活動へどのように寄与しているのかを電気生理学的に直接的な評価することにより統合失調症の病態生理に迫る。

2. 研究の目的

統合失調症モデルマウスが示すスパイン形態異常が神経細胞活動へどのように寄与しているのかを電気生理学的に直接的な評価することにより、モデルマウスの病態生理の解明に挑戦する。一般的な電気生理学的手法ならびに2光子励起顕微鏡を用いた電気生理学的手法を中心に *in vitro*、*in vivo* 両面から実験を展開する。スパインの異常動態の詳細を *in vitro* 実験で確認し、それに基づいて *in vivo* 実験で観察される動態との関連を追求する。さらに *in vitro* パッチクランプ、アンケーシング、Ca²⁺イメージングを組み合わせ、異常スパインとシナプス入力演算の関連を観察し、最終的に統合失調モデルマウスでのスパイン形態異常と発火パターンとの関連を明らかにする。

3. 研究の方法

統合失調症モデルマウス(DISC1 KD マウス)の前頭前野神経回路の神経細胞の特性を調べる。本研究室ではDISC1 KD マウスの作製を確立している。DISC1 shRNA、形態マーカー(mRFP など)を発現する遺伝子を、胎生14日目に子宮内電気穿孔法により、または生後18-19日目にウイルスインジェクションにより大脳皮質2/3層の錐体細胞に導入する。神経細胞の発達が樹状突起形成まで完了した生後60日前後に前頭前野の冠状断スライスを作製し、遺伝子導入された錐体細胞のスパイン形態を確認する。本研究室では、DISC1 KD マウスにおいて巨大スパインを確認している。本研究では、同領域の急性脳スライス *in vitro* 標本作製し、第2/3層錐体細胞からパッチクランプ記録を行い、興奮性シナプス電流を観察し、さらにケイジド試薬を利用し単一スパイン上のAMPA-EPSC、NMDA-EPSCを計測し、巨大異常スパインの動態を明らかにす

る。in vivo 標本では第2/3層錐体細胞から Cell-attached 記録を行い、生理条件に近い錐体細胞の発火パターンを観察する。また、in vitro パッチクランプ、アンケーシング、Ca²⁺イメージングを組み合わせ、異常スパインとシナプス入力演算の関連を観察し、DISC1 KD マウスのスパイン異常が引き起こす電気生理学的特性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 統合失調症モデルマウス巨大スパインに伴うシナプス伝達の動態変化の観察

統合失調モデルマウスを作製後、急性脳スライス in vitro 標本を作製し、第2/3層錐体細胞からパッチクランプ記録を行い、電圧固定記録 (Voltage clamp recording) により、興奮性シナプス電流 (EPSCs) を観察した。さらにケイジド試薬を利用し、単一スパイン上の NMDA-EPSC、AMPA-EPSC を計測し、これらの実験でコントロール群との比較 (形態マーカー陽性細胞、陰性細胞の比較など) により、統合失調モデルマウスでのスパイン形態異常と、シナプス伝達またはシナプス後膜上の分子動態と関連があるかを直接的に検証した。

興奮性微小シナプス電流 (mEPSCs) の観察

TTX、GABAA 受容体アンタゴニスト Picrotoxin 存在下で、単一スパインの動態を反映する mEPSC を観察したところ、mEPSCs の振幅についてコントロール群より Disc1 KD 群の方が大きいことが確認された。Disc1 KD 群で誘発される巨大スパインの出現を反映しているものと推定された。

アンケーシングにより誘発される EPSC の観察

ケイジド試薬 MNI-グルタミン酸のアンケーシングにより測定される単一スパインレベルの各グルタミン酸受容体の成分 AMPA-EPSC、NMDA-EPSC を観察したところ、いずれの成分の振幅についてコントロール群より Disc1 KD 群の方が大きいことが確認された。これも Disc1 KD 群で引き起こされる巨大スパインの出現を反映しているものと考えられた。

(2) 電気生理学的特性の観察

第2/3層錐体細胞からパッチクランプ記録を行い、電位固定記録 (Current clamp recording) により、統合失調症モデルマウス (DISC1 KD マウス) 神経細胞の電気生理学的特性について観察した。静止膜電位、膜抵抗、膜時定数、発火頻度など基本的特性について記録したところ、いずれもコントロール群、Disc1 KD 群で有意な差を確認できなかった。

(3) 統合失調症モデルマウスで表出する前頭前野錐体細胞の発火パターンの同定

統合失調モデルマウスを作製後、in vivo 標本を作製し、2光子顕微鏡下で形態マーカー mRFP 陽性の第2/3層錐体細胞を同定し Cell-attached 記録を行い、生理条件下の錐体細胞の発火パターンを観察した。この実験でコントロール群との比較により、統合失調モデルマウスでのスパイン形態異常と、生理条件下での発火パターンの動態と関連があるかを検証した。in vivo 標本を作製し、2光子顕微鏡下で形態マーカー mRFP 陽性の第2/3層錐体細胞を同定し Cell-attached 記録を行ったところ、コントロール群より Disc1 KD 群の細胞の発火頻度が高くなっていることが観察された。

(4) 異常スパインとシナプス入力演算の関連の検討

個々の異常スパインがどのように神経興奮性に影響を与えているかを確認する目的で、in vitro パッチクランプ、アンケーシング、Ca²⁺イメージングを組み合わせ、異常スパインと樹状

突起上の複数スパインによるシナプス入力演算の関連を観察したところ、統合失調モデルマウスの形態異常スパインがシナプス入力の亢進、さらには超加算的シナプス入力演算の亢進を引き起こすことを確認した。

(5) 統合失調症モデルマウスの行動解析

さらにモデルマウスの行動解析によりこれらのスパイン形態異常と作業記憶の低下との関連が確認されたことから、スパインの形態的かつ生理的変異が統合失調症の病態生理に寄与することを示唆していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小尾紀翔、白井福寿、梅沢茉里、鈴木紀光、林（高木）朗子
2. 発表標題 統合失調症モデルマウスのシナプス病態の形態学的および機能的解析
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kisho Obi, Fukutoshi Shirai, Mari Umezawa, Norimitsu Suzuki & Akiko Hayashi-Takagi
2. 発表標題 Morphological and functional analysis of the DISC1 knockdown mice for understanding the relationship between synaptopathy and schizophrenia
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
連携研究者	林（高木） 朗子 (HAYASHI-TAKAGI Akiko) (60415271)	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・ チームリーダー (82401)	