

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03343

研究課題名(和文) 外界刺激へ応答するCbInファミリーを介した脳回路制御機構

研究課題名(英文) The roles of CbIn-family proteins in activity-induced neuronal circuit changes

研究代表者

石田 綾 (Ito-Ishida, Aya)

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

研究者番号：40424171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、外界の刺激に応じてシナプス・神経回路が変化する過程をCbInファミリー分子がどのように制御するのか明らかにするためParabrachial Nucleus (PBN) の痛み応答に着目し研究を推進した。PBNでCbInを発現する細胞種を特定するために、HAタグをCbIn1/2遺伝子座に挿入したノックインマウスを作成し、免疫組織化学法を用いて各分子をS/N比高く検出することが可能となった。さらに、PBNの投射領域でのシナプス機能に果たす役割を明らかにするため、各種ノックアウトマウスの電気生理学的解析を行い、CbInファミリーが重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神神経疾患の多くは、中枢神経系のシナプス機能が破綻し、外界刺激への応答性が障害されるために惹起されると考えられている。本研究では、シナプスの形成を強力に誘導するCbInファミリー分子が痛みを司る神経領域に高いレベルでは存在することに着目し、その局在と生理的意義を明らかにすることを目的とした。慢性的な痛みは長期的な情動変化を引き起こすが、その分子基盤解明に必須な基礎的知見が得られたと考えられている。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to clarify the functional significance of CbIn family proteins in synapses targeted by the parabrachial nucleus (PBN), which regulates emotional responses to chronic pain. In order to identify cell types that express CbIn, we generated knock-in mice with an HA tag inserted into the CbIn1/2 locus. These mice allowed us to characterize the localization of CbIn1/2 with a high spatial resolution. Furthermore, electrophysiological recordings from the brain regions innervated by PBN suggested that CbIns play an important role in synapse formation in these areas.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 神経活動 CbInファミリー分子

## 1. 研究開始当初の背景

Cbln1 は主に小脳の神経細胞から放出される分泌タンパクだが、強力なシナプス形成誘導因子として作用する (Ito-Ishida, *J Neurosci*, 2008; Matsuda, *Science*, 2010)。これまでに、申請者らの研究から、Cbln1 の小脳での発現量が神経活動によって変化し (Iijima, *J Neurosci*, 2009; Ibata, *Neuron*, 2019)、Cbln1 が受容体 ( $\delta 2$  型グルタミン酸受容体; GluD2 と Neurexin) との相互作用を介し小脳顆粒細胞の軸索の形態変化を起こすことでシナプスの成熟化を促進することや (Ito-Ishida, *Neuron*, 2012)、小脳の興奮性・抑制性バランスを制御することが明らかにされてきた (Ito-Ishida, *Eur J Neurosci*, 2014)。また、Cbln1 は小脳だけでなく海馬や大脳皮質など他の脳領域にも存在し、マウスの行動制御に関わることや (Otsuka, *J Neurosci*, 2014)、Cbln1 と高い相同性を持つファミリー分子が各脳領域に発現することが明らかにされている。以上の結果は、Cbln ファミリー分子が小脳以外の領域でも、シナプスの機能を調節し、神経回路網の機能的変化を引き起こすことを示唆する。そこで本研究ではマウスを用い、Cbln ファミリー分子が小脳以外の脳領域において、外的な刺激に応じシナプスの変化を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目指す。Cbln2 が侵害刺激に応答する結合腕傍核 (Parabrachial Nucleus; PBN) に強く発現することに着目し、刺激により惹起されるシナプスの形態学的・機能的変化と Cbln ファミリーの役割を明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究では、外界からの刺激入力に応じてシナプスの機能と神経回路網が変化する過程で、Cbln ファミリー分子の果たす役割を明らかにすることを目的とした。シナプスの入力依存的な変化を捉えるために、モデル領域として結合腕傍核 (PBN) に焦点を当てた。PBN には Cbln1 と Cbln2 の両者が高いレベルで発現するが、PBN は痛みや各種ストレスなどの侵害刺激に強く応答し、慢性的な侵害刺激は PBN とターゲット領域間のシナプス機能の変容を引き起こす。この過程に着目し、Cbln ファミリー分子の担う役割を明らかにすることで、神経活動依存的に神経回路が変化する分子基盤の解明を目指した。

具体的な実施項目としては、PBN において Cbln2 が発現する細胞種を同定し、Cbln の発現量・局在が痛み刺激に反応してどのように変化するのか定量するため、HA タグノックインマウスを作成した。また、PBN→ターゲット領域間のシナプスにおいて Cbln ファミリーの役割を検証するため、形態学的解析と電気生理学的解析を行った。さらに、Cbln の役割を個体レベルで明らかにするため、各種遺伝子改変マウスを用い、疼痛刺激に伴う情動・学習行動を解析した。

## 3. 研究の方法

(1) CRISPR/ Cas9 による HA-タグノックインマウスの作成と Cbln 発現細胞種の同定  
Cbln2 の存在部位については免疫染色反応に適した抗体がないため、タンパク質として実際

にどの脳領域のどのシナプスに存在するかについては不明である。感度・特異性よくシナプス・細胞体の両方で Cbln を検出するために、HA タグを Cbln 遺伝子の N 末端にノックインしたマウスを CRISPR/Cas9 法により作成する。作成したマウスの脳切片を抗 HA 抗体で染色し、PBN において Cbln が発現する細胞種を明らかにする。PBN の投射領域では、シナプスに局在する HA-Cbln を可視化し、Cbln ファミリー分子の受容体である  $\delta$  型グルタミン酸受容体や各種シナプスマーカーとの関係を明らかにする。さらに、 $\delta$  型グルタミン酸受容体の欠損マウスと HA-Cbln マウスを交配し、Cbln の局在パターンがどのように変化するのか解析する。

#### (2) 侵害受容領域におけるシナプス形成制御: Cbln の役割

課題1で得られた結果から、PBN において Cbln を発現する細胞種と、これらの細胞種のターゲット領域が明らかになり、各ターゲット領域における Cbln と受容体の関係を明確にすることができる。この結果を踏まえ、ターゲット領域のシナプス形成における Cbln の役割を明らかにするため、各種欠損マウスや、受容体欠損マウスを用いてシナプスの形態学的解析と電気生理学的解析を行う。マウス脳切片を免疫染色法により各シナプスマーカーで染色し、各脳領域におけるシナプス密度の変化を定量する。

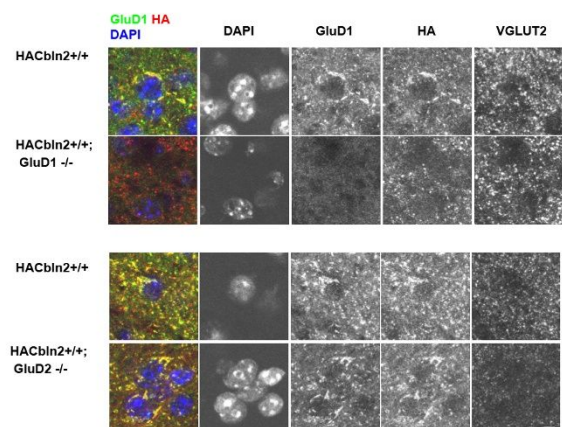
### 4. 研究成果

#### (1) HA-タグノックインマウスの作成と Cbln2 の局在解析:

PBN に発現する Cbln1/2 のシナプス局在を明らかにするため、Crispr/Cas9 法を用い、HA タグノックインマウスを作成した。その結果、各分子を S/N 比高く検出することが可能となり、PBN 内部での発現細胞の詳細な解析が可能となった。Cbln2 については内在性分子を検出する抗体が存在せず、免疫染色法で確実なシグナルを検出できなかったが、今回作成した HA タグノックインマウスを用いることで、扁桃体中心核だけ

でなく他の脳領域でも両分子の観察が可能となった。ターゲット領域のシナプス内における分子局在を高解像度で観察した結果、扁桃体中心核および BNST の興奮性シナプスにおいて、Cbln2、GluD1 が強く局在することを見出した。さらに HA タグノックインマウスを GluD1 ノックアウトマウスと交配し、Cbln1/2 の局在が受容体である GluD1 に依存することを確認した(図 1)。

図1: HA-Cbln2の扁桃体内核における局在

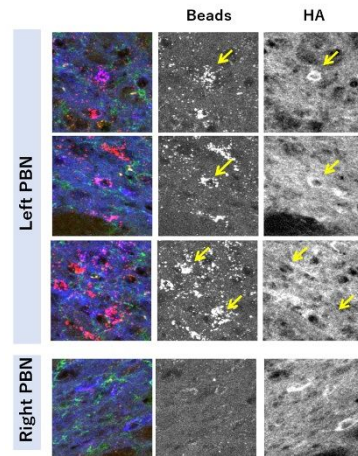


#### (2) 扁桃体内側核に存在する Cbln2 は PBN の軸索末端から分泌される:

同定された Cbln2 は軸索末端から分泌されると考えられる。その由来となる脳領域を同定する

ため、HA-Cbln2 マウスの扁桃体中心核に逆行性トレーサー (Retrobeads) を注入し、各脳領域を観察した。その結果、同側の PBN において HA 陽性の細胞体でトレーサーのシグナルが検出された (図 2)。この結果は、PBN で産生された Cbln2 が軸索末端から分泌され扁桃体中心核に存在することを示唆する。この点を明確にするため、Cbln2 を PBN 局所で欠損させ免疫組織化学実験を行うことを計画している。

図 2: HA-Cbln2 の結合腕傍核における局在



### (3) 侵害受容領域におけるシナプス形成制御: Cbln2 の必要性:

各種ノックアウトマウスを用い、シナプスの形態学的解析と電気生理学的解析を進め、各分子が PBN-扁桃体中心核間のシナプスの機能制御に必要なか、検証を進めた。解剖学的には、還流固定後の脳切片を用い、興奮性シナプスマーカー (VGLUT2/PSD95) に対する抗体により染色し、共焦点顕微鏡画像の定量解析を行った。また、シナプスの電気生理学的特性を解析するためには、PBN に Channelrhodopsin を導入し、扁桃体中心核から Whole-cell patch clamp 法による記録を行った。現在この結果の解析を進めている。

### (4) 疼痛関連行動における Cbln2 の役割:

痛みの受容反応における Cbln2 の必要性を調べるため、Cbln2 欠損マウスを用い行動実験を行った。急性刺激 (Foot shock) を与え、生理的反応を惹起する電流の閾値を定量したところ、Cbln2 欠損マウスではコントロールと比べ変化が認められなかった。この結果から、急性疼痛反応には Cbln2 は関与しないことが示された。一方で、恐怖条件付け試験を行ったところ、Cbln2 欠損マウスでは音に対する Cued fear が有意に低下していた。Cued fear には扁桃体が関与することが示されており、Cbln2 は PBN-CeA シナプスの興奮性シナプス機能を制御することで、疼痛の記憶形成に関わることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 石田綾	4. 巻 74
2. 論文標題 単一遺伝子疾患からアプローチする神経発達障害	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 23-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.2425201634	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石田綾	4. 巻 72
2. 論文標題 自閉スペクトラム症と小脳	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 74-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.2425201314	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Aya Ito-Ishida
2. 発表標題 Connecting molecules and circuitry to untangle developmental disorders.
3. 学会等名 IBRO-RIKEN CBS Summer Program 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aya Ito-Ishida
2. 発表標題 Connecting molecules and circuitry to untangle developmental disorders
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aya Ito-Ishida
2. 発表標題 Advancing the understanding of developmental disorders
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議 (教育講演)(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aya Ito-Ishida
2. 発表標題 Understanding brain development from molecules and behavior,
3. 学会等名 理化学研究所 第24回 異文化交流の夕べ(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田綾
2. 発表標題 脳発達のメカニズム：二つの分子から見えてきた世界
3. 学会等名 第5回子どものこころの分子統御機構研究センター令和3年度連続セミナー& 大阪大学神経科学懇話会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田綾
2. 発表標題 早期ライフステージにおける神経回路形成機構の解明
3. 学会等名 AMED-Prime 「早期ライフ」領域会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aya Ito-Ishida
2. 発表標題 Connecting Molecules and Circuitry to Untangle Developmental Disorders
3. 学会等名 RIKEN CBS and Monash BDI joint symposium, (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aya Ito-Ishida
2. 発表標題 Connecting Molecules and Circuitry to Untangle Developmental Disorders
3. 学会等名 RIKEN CBS Retreat (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田綾
2. 発表標題 レット症候群の病態メカニズム
3. 学会等名 生理研シンポジウム「幼・小児の成長期における脳機能と運動の発達に関する多領域共同研究」生理学研究所 (Hybrid) (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石田綾	4. 発行年 2023年
2. 出版社 新興医学出版	5. 総ページ数 280
3. 書名 精神医学領域の論文を読みこなすキーワード100! (各論)	

〔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
研究 分 担 者	石川 理子  (Ishikawa Ayako)  (60547991)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教    (32612)	
研究 分 担 者	坂内 博子  (Bannai Hiroko)  (40332340)	早稲田大学・理工学術院・教授    (32689)	

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