

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02594

研究課題名（和文）前頭前野スパイン・シナプスの可塑性を制御する新規シグナル路の解析

研究課題名（英文）A molecular mechanism for spine enlargement in the prefrontal cortex

研究代表者

柳下 祥（Yagishita, Sho）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・講師

研究者番号：50721940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：グルタミン酸の2光子アンケーシングによるスパイクタイミング依存的可塑性（STDP）プロトコルを用いて、マウスの内側前頭葉皮質（mPFC）の急性スライス標本第5層錐体ニューロンの単一スパインにおける可塑性のシグナル伝達経路を調査した。結果、ノルアドレナリンがスパイン可塑性を増強するが、これにはミクログリアによる抑制機序の γ 2 受容体を介した脱抑制を介していることを新規に同定した。さらにこれらシグナルが制御する学習行動として観察性恐怖学習を同定した。以上より、前頭葉のシナプス可塑性を制御する機序と制御する行動について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前頭葉を含む新皮質のスパインの形態可塑性はin vivo研究で多く報告されてきた。しかし、実際にどのようなシグナル路を介してこの可塑性が生じているのかは不明であった。本研究によりこのシグナルを明らかにしたこと、の学術的な意義は高い。また、意外にもこのシグナル路にはミクログリアを介した細胞間コミュニケーションが関与していた。ミクログリアは多くの精神神経疾患に関与することが知られており、今後疾患における役割も明らかになる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：Using a spike timing-dependent plasticity (STDP) protocol with two-photon uncaging of glutamate, we investigated the signalling pathways of plasticity in a single spine of layer 5 pyramidal neurons in an acute slice of the medial prefrontal cortex (mPFC). We newly identified that noradrenaline enhances spine plasticity via γ 2 receptor-mediated disinhibition of inhibitory mechanisms by microglia. Furthermore, we identified observational fear learning as a learning behaviour regulated by these mechanisms. Overall, we show new mechanisms controlling synaptic plasticity and learning in the mPFC.

研究分野：神経科学

キーワード：前頭葉前野 スパイン ノルアドレナリン ミクログリア 観察性脅威学習

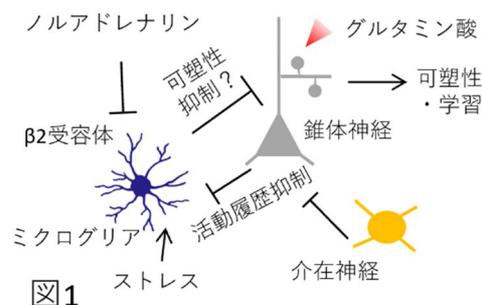
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の接続部であるシナプスは、シナプス可塑性により結合強度を変化することが可能であり、記憶などの脳機能に重要と考えられている。1つ1つのシナプス構造は1um 以下と微小であるが、2光子アンケーシング法によりシナプス後部構造である単一スパインの刺激することで探索が可能となった。これにより、スパイン形態可塑性(頭部増大)が電気的なシナプス可塑性の基盤となることが明らかにされてきた (Matsuzaki et al., Nature 2004)。場所記憶に関わる海馬において、錐体細胞のシナプスはグルタミン酸シナプス入力と細胞の発火の同期(spike-timing dependent plasticity, STDP)刺激によりスパイン頭部増大が生じ、この結果、頭部増大によりグルタミン酸受容体が増え、グルタミン酸受容体を介した電気的な応答も増強される(Tanaka et al, Science 2008)。この STDP 刺激で誘発される可塑性は海馬が場所経験を逐次記憶することに対応しえる。

申請者はこの技術を線条体側坐核に応用し、この領域のスパインは STDP 刺激に加えて一過性ドーパミン信号が可塑性成立要件であることを見出し、強化学習モデルとの対応をとった。さらにこの可塑性機序を元に行動実験において汎化・弁別学習という新たな原理を見出した (Yagishita et al Science 2014; Nature 2020)。このように海馬や線条体側坐核領域では脳領域の機能と対応したシナプス可塑性原理が明らかになってきた。

前頭前野は高次機能の中核として様々な複雑な認知・行動に関わることが知られている。そして、シナプス可塑性はこのような高次機能を制御する際にも重要な基盤の一つと考えられる。実際、統合失調症やうつ病では前頭前野でシナプス後部構造である樹状突起スパインの密度減少がヒト死後脳で報告されており (Glantz et al., Arch Gen Psy 2000; Golden et al., Nat Med 2013)、動物モデルにおいてもストレスによりシナプス機能が減弱する(Duman et al., Nat Med 2016)ことなどから、シナプス機能や可塑性の障害が高次機能障害に関連付けられてきた。最近の2光子励起顕微鏡による *in vivo* イメージングの発達により動物個体の学習時における前頭葉のスパイン動態や細胞活動が観察可能になり、前頭葉でのスパインは学習に伴い日単位で変化(Lai et al., Nature 2012)して記憶痕跡となることが明らかになった (Hayashi-Takagi et al., Nature 2015)。特にスパイン形態は長期維持されるため (Yang et al., Nature 2009)、長期持続する記憶の実態である可能性が高い。また学習に伴い前頭葉の特異的な細胞集団の細胞活動が変化することも示されており (Otis et al., Nature 2017; Kitamura et al, Science 2017)、何らかのシナプス可塑性が起きることによって細胞活動変化が生じた可能性が考えられる。しかし、ドーパミン・強化学習モデルのような単純な学習モデルは存在しておらず、シナプス機能といった細胞機能と行動や認知の対応についてはほとんどわかっていない。



申請者はこれまでの若手研究により2光子励起顕微鏡を駆使することで前頭葉スパイン・シナプスの可塑性を制御する信号を探索してきた結果、興味深い現象を複数見出してきた。前頭葉において学習に伴い放出されるノルアドレナリン(Uematsu et al., Nat Neuro 2017)が神経細胞のスパイン頭部増大を調節するが、これが意外にもミクログリアによる制御を介している可能性である。ノルアドレナリンはこれまで電気刺激による長期増強を増強することは知られており、これと整合してスパイン・シナプスの頭部増大を増強したが、驚いたことにこの作用が錐体細胞に発現する β_1 受容体ではなく、ミクログリアに発現するとされる β_2 受容体を介していることが薬理的にわかった(図1)。加えて、神経細胞の活動履歴により可塑性が変化することがわかった(詳細は「2 本研究の着想に至った経緯など」参照)。さらには、ストレスにより可塑性が消失するが抗うつ薬ケタミンで回復することもわかっている。

これまでこのような脳スライス実験に加えて、可塑性がどのような学習行動を制御するのかという疑問に答えるため行動実験も行ってきた。可塑性の制御タンパク質である CaMKII の阻害ペプチドをアデノ随伴ウィルス・ベクターにより前頭葉に発現させると脳スライスでの可塑性は抑制される。こ

の操作を行動実験に応用し恐怖条件づけの消去や短期記憶課題、認知セット・シフト課題の遂行を障害することなどがわかってきた。

2. 研究の目的

本研究ではこの仮説を中心に脳スライスで検証し、さらにはこのノルアドレナリン・活動履歴がミクログリアを介して制御する可塑性機序がどのように学習行動を制御するのかを明らかにする。他の可能性として 1 受容体を介して錐体細胞を制御する可能性なども同時に検証していく。これによりこれまで得られてきた現象を統合し、前頭葉スパイン形態可塑性を制御する新規シグナル路を明らかにする。

3. 研究の方法

内側前頭葉を含むマウス脳急性スライスを作成し、第 5 層錐体ニューロンからパッチクランプ・全細胞記録をおこなった。この際、蛍光試薬 Alexa488 を灌流させることでスパインの可視化を行い、2 光子励起顕微鏡で 980nm の波長で観察した。観察とは異なる 720nm の 2 光子励起(0.6 ms)によりグルタミン酸の 2 光子アンケーシングを単一スパインでおこなった。このスパインのグルタミン酸刺激と電極からの活動電位を組み合わせるスパイクタイミング依存的可塑性(STDP) プロトコルを単一スパインに与えた。具体的にはグルタミン酸アンケーシングの 10ms 後 100Hz の活動電位を 3 回、これを 10Hz で 10 回与えた。これを 1 train として 10 秒間隔で 15 回繰り返した。刺激後 50 分間の間計測し、刺激前に対する体積の変化率を計算した。薬理や遺伝学、アデノ随伴ウイルスなどを用いてスパイン増大に必要なシグナル伝達経路を調査した。ミクログリア特異的に Cre を発現する Tmem119-Cre 遺伝子改変マウスと Cre 依存的に赤色蛍光タンパク tdTomato を発現する遺伝子改変マウス Ai14 をかけ合わせてミクログリアの可視化をおこなった。ミクログリア特異的に Cre を発現する Tmem119-Cre 遺伝子改変マウスと Cre 依存的に化学遺伝学プローブ hM4Di を発現する遺伝子改変マウスをかけ合わせてミクログリアの cAMP シグナルの操作をおこなった。観察性脅威学習課題を構築し、前頭葉におけるノルアドレナリンの観察と薬理阻害、CaMKII シグナルの操作、ミクログリアの操作を行い、学習への上記シグナルの役割を探索した。

4. 研究成果

ミクログリアの物理的な接触が可塑性抑制に関わる可能性の調査

これまでの実験から成体マウス(P35-45)では STDP 刺激のみではスパイン頭部増大が誘発されないが、ミクログリアを除去すると誘発されることがわかっている。過去の in vivo でミクログリア動態を観察した先行研究では形態可塑性を起こしたシナプスにミクログリアが接触することが観察され、これによりスパインが除去される可能性が考えられている。そこで本実験条件において、可塑性が起きない STDP 条件ではミクログリアが刺激したスパインに接触し、これが可塑性を抑制しているという仮説をたて、これを検証した。まず、ミクログリア特異的に Cre を発現する Tmem119-Cre 遺伝子改変マウスと Cre 依存的に赤色蛍光タンパク tdTomato を発現する遺伝子改変マウス Ai14 を掛け合わせ、このマウスから急性スライスを作成し、ミクログリアを観察できることを確認した(図 2)。

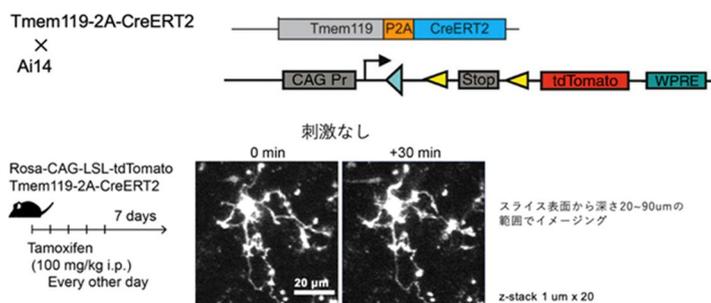


図 2. 遺伝子改変動物によるミクログリアの可視化

上段に遺伝子改変動物の発現する遺伝子の模式図を示す。下段左にタモキシフェンの投与プロトコルを示す。下段中央に急性スライスで経時的に観察したミクログリアを示す。

次に STDP 刺激の後に刺激したスパインにミクログリアが接近するかを調べた(図 3)。その結果、明らかなミクログリアの接近は見られなかった。ただし、tdTomato の蛍光は十分に明るいとは言えず、可視化できなかった微細構造の接近は否定できなかった。

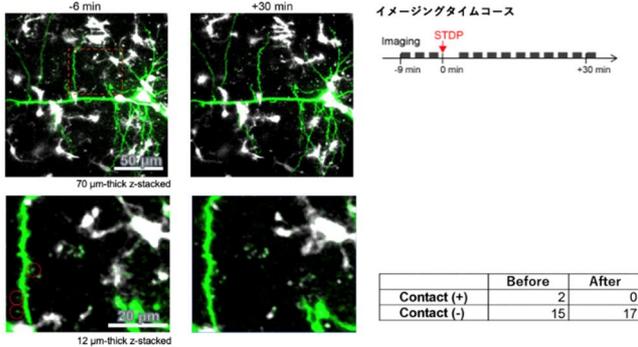


図 3. STDP 刺激後のミクログリアの観察
上段左に刺激前後のミクログリア(白)と刺激した神経(緑)を示す。下段左に拡大図を示す。赤は刺激したスパイン。上段右に撮像タイムラインを示す。下段右に刺激前および刺激後の全経過で刺激スパインの近傍にミクログリアシグナルが見えた数を示す。

ミクログリア内 cAMP シグナルの可視化と操作

上述の Tmem119-Cre マウスと hM4Di を発現する遺伝子改変動物を掛け合わせ、ノルアドレナリンと STDP 刺激によるスパイン頭部増大を抑制するかを調査した。まず実験系を構築し発現を確認した(図 4)。

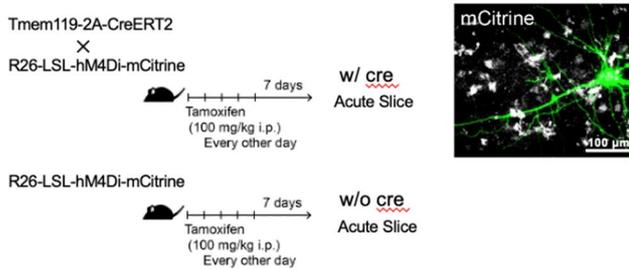


図 4. 遺伝子改変動物によるミクログリアの cAMP 操作系
左にタモキシフェンの投与プロトコルを示す。右に急性スライスで観察したミクログリア(白)と全細胞記録した神経(緑)を示す。

次に、すでに可塑性誘発がわかっているノルアドレナリン存在下で可塑性誘発をおこなった。DCZ100nM をバス灌流し、hM4Di を刺激することで Gi/o によりミクログリア内 cAMP を抑制した。ノルアドレナリンは Gs 共役の β_2 受容体を介していることがわかっているので、このノルアドレナリン作用と拮抗するという仮説を立てたが、実験結果はこの仮説を支持した(図 5)。

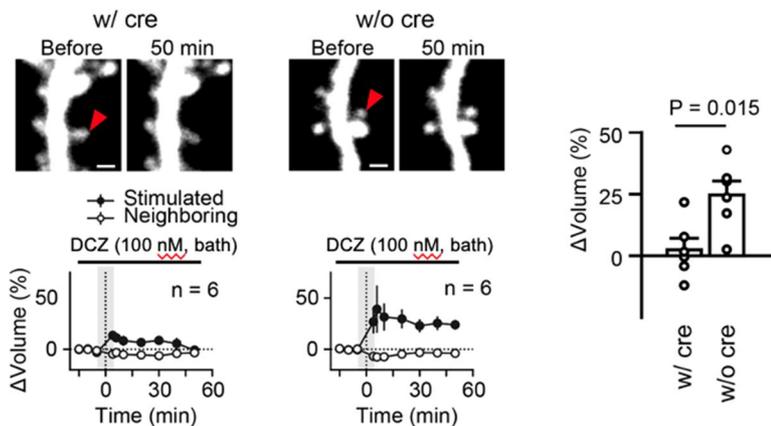


図 5. ミクログリア特異的 cAMP 抑制の可塑性への効果

Cre の発現があり hM4Di を発現した条件(左)と Cre の発現がなく、hM4Di が発現していない条件における刺激スパインの例(上段)と STDP に対する時系列(下段)を示す(スケールバー: 1 μ M)。1つの n は細胞数であり、3-4 スパインの平均した値である。40-50 分における平均を示す(右)。P 値はマン・ホイットニーの U 検定の結果である。

観察性脅威条件づけ学習における可塑性関連シグナルの調査

スライス実験で同定された新規可塑性制御シグナルが実際にどのような学習行動を制御しえるかを探索した。その結果、観察性脅威条件づけ学習における新規役割を同定した。観察性脅威条件づけ学習では Demonstrator が電気ショックをうけている様子を観察すると、その後、観察者も脅威応答を示すものである。本実験では音とともに電気ショックを提示した(図6)。この際、Demonstrator の存在が必要であることを確認した。この観察中に前頭葉においてノルアドレナリンが上昇することを GRAB-NA センサーにより観察した。薬理的に α_2 受容体を阻害すると学習が阻害された(図6)。加えて、CaMKII を阻害するペプチドをウィルスベクターにより発現させるとこの学習は阻害され、逆に可塑性を促進するマイクログリア除去を行うと学習が亢進した。これらのことから前頭葉においてノルアドレナリンによるマイクログリアを介した可塑性制御がこの学習を制御している可能性が考えられた。

Observational auditory threat conditioning (OATC)

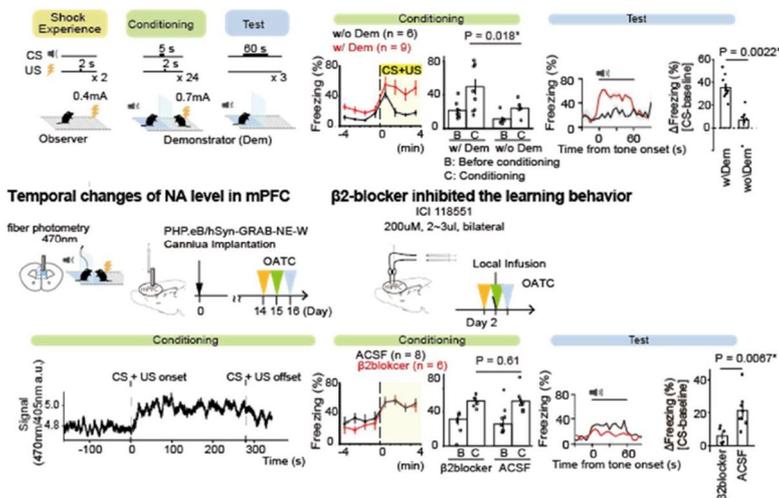


図6 観察性脅威条件づけ学習における前頭葉ノルアドレナリンの役割

まとめ

本研究により、活動依存的な前頭葉スパインの可塑性を誘発するシグナル路には STDP に加えてノルアドレナリンがあった場合に生じることがわかった。驚いたことにノルアドレナリンの制御はマイクログリア内 cAMP 制御を介していた。本研究により明らかにされた新しい可塑性制御機序はストレス脆弱性がある。このような知見をもとに動物実験を行うことで新皮質の学習原理の理解に大きく貢献すると考えられる。加えて幼若期には STDP のみでスパイン増大が生じるなど可塑性が高いが、それがマイクログリアにより可塑性が抑制されていくという細胞レベルでの知見は、発達期にどのように脳が情報を獲得しているのかという理解のためにも重要であると考えられる。さらにこのような新規可塑性制御シグナル路が観察性脅威条件づけを制御することを明らかにした。マイクログリアの機能が各種精神疾患モデルにおいて変化していることがこれまで多く報告されてきているためこの機序の理解は精神疾患理解へと発展する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yagishita Sho	4. 巻 188
2. 論文標題 Cellular bases for reward-related dopamine actions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.12.003	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 Yamaguchi Kenji, Maeda Yoshitomo, Sawada Takeshi, Iino Yusuke, Tajiri Mio, Nakazato Ryosuke, Ishii Shin, Kasai Haruo, Yagishita Sho	4. 巻 12
2. 論文標題 A behavioural correlate of the synaptic eligibility trace in the nucleus accumbens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05637-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ucar Hasan, Watanabe Satoshi, Noguchi Jun, Morimoto Yuichi, Iino Yusuke, Yagishita Sho, Takahashi Noriko, Kasai Haruo	4. 巻 600
2. 論文標題 Mechanical actions of dendritic-spine enlargement on presynaptic exocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 686~689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-021-04125-7	査読の有無 有
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8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 柳下祥
2. 発表標題 ドーパミン系ストレス負荷による新規統合失調症の発症モデル
3. 学会等名 第44回日本生物学的精神医学会年会（BPCNP/PPP4学会合同年会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sho Yagishita
2. 発表標題 Dopaminergic modulation of synaptic plasticity in generalization and discrimination learning
3. 学会等名 Computational Approaches to Memory and Plasticity Bangalore India (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳下 祥
2. 発表標題 D2受容体機能障害と社会環境相互作用による新しい統合失調症発症モデル
3. 学会等名 精神神経学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sho Yagishita
2. 発表標題 Disinhibitory gating of discrimination learning and spine enlargement by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens
3. 学会等名 SWEBAGS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳下 祥
2. 発表標題 ドーパミンによるシナプス可塑性と汎化弁別学習の制御
3. 学会等名 ドーパミン研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sho Yagishita
2. 発表標題 Dopaminergic modulation of synaptic plasticity in learning and psychiatric disorders
3. 学会等名 CBS Summer seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳下 祥
2. 発表標題 動物モデルにおける壁～身体医学の生物医学と精神医学の基礎科学の相違～
3. 学会等名 精神神経科学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳下 祥
2. 発表標題 小集団脳科学と大集団脳科学の相互トランスレーショナル科学への展
3. 学会等名 日本発達神経科学会第10回学術集 (招待講演)
4. 発表年 2021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
研究協力者	田尻 美緒 (Tajiri Mio) (80908575)	東京大学・医学系研究科・特任研究員 (12601)	

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
---------	---------