

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03294

研究課題名（和文）シナプス可塑性による脳損傷後の機能代償回路の形成機構

研究課題名（英文）The mechanism for the formation of compensatory circuits after brain injury by synaptic plasticity

研究代表者

實木 亨 (Jitsuki, Susumu)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10546675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,100,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに研究代表者は、大脳皮質損傷後においてリハビリテーション依存的にAMPA受容体シナプス移行を促進することで機能回復を誘導することを明らかにした。しかしながら、AMPA受容体がシナプスに集積することでどのように運動機能を補ったのかについては不明である。このようなAMPA受容体の機能を明らかにするため、光照射依存的に分子機能を不活化する手法（CALI法）を用いて動物個体で時空間的に操作することを試みた。本研究においてGluA1/1やGluA2/3といったAMPA受容体サブユニットを特異的に機能阻害する光照射依存的機能不活性化法をin vitroおよびin vivoのレベルにおいて確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、脳損傷からの回復のための薬剤等による治療介入が注目されてきているが、正常に機能が回復するためには適切な回路が形成される必要がある。一方で不適切な回路の形成が誘導されることにより筋の緊張が亢進する痙縮を引き起こしたり、自律神経過反射を呈することもある。このようなことから機能回復を誘導するためには、単に薬剤等による介入で特定の標的分子の制御や標的部位の活動を制御するだけでは不十分であり、適切な回路を形成することが重要となる。本研究結果により将来的に脳損傷による機能低下だけでなく、神経変性疾患で機能が低下した状態からの機能回復の促進技術への発展も期待できる。

研究成果の概要（英文）：It has previously shown that rehabilitation-dependent delivery of the AMPA receptor into synapses leads to functional recovery after cortical injury. However, it is unclear how the synaptic accumulation of AMPA receptors compensates for motor function. To elucidate the function of AMPA receptors accumulated in the peri-injury area, we attempted to manipulate them spatiotemporally in individual animals using an optogenetic approach (CALI method). In this study, we established a subunit-specific optical inactivation of AMPA receptor subunits such as GluA1/1 and GluA2/3 in vitro and in vivo.

研究分野：神経科学

キーワード：AMPA受容体 機能回復 CALI法

1. 研究開始当初の背景

事故や脳卒中などで脳が損傷を受けた際にどのように回復をもたらすのだろうか？脳損傷後の回復過程において、失われた機能にそれぞれ関連した脳領域が機能的地図を再構成して代償するといわれているが実体は未だ明らかではない(Nudo Science 1996; Winship & Murphy J. Neurosci. 2008)。脳の可塑性の分子基盤としてAMPA受容体のシナプス移行(集積)が世界的に認められている。AMPA受容体はGluA1-4サブユニットが存在し、海馬や大脳皮質においてはGluA1/1・GluA1/2・GluA2/3といった組み合わせの複合体によりイオンチャネルが形成され、GluA1を含む複合体は神経活動依存的にシナプス移行するが、GluA2/3複合体は恒常的にシナプスに存在する(Shi et al., Science. 2000, Takahashi et al., Science. 2003, Rumpel et al., Science. 2005)。これまでに研究代表者は、大脳皮質損傷周囲においてリハビリテーション依存的にAMPA受容体のシナプス移行を促進することにより損傷後の機能回復を誘導することを明らかにした(Abe*, Jitsuki* et al., Science 2018 *co-first author)。しかしながら、どのような神経回路を担う神経細胞にどのようなタイミングで、さらにはどのようなサブユニット複合体がシナプスに移行し、失われた運動機能を回復したのかということについては全く不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、AMPA受容体を動物個体で時空間の高い分解能を以て操作するため、光照射依存的に活性酸素を放出する光増感物質を用いた分子機能不活化法(Chromophore-assisted light inactivation: CALI法)を用いて、脳損傷後の機能回復過程における各AMPA受容体のサブユニット複合体の役割を明らかにすることが当初の目的である。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、AMPA受容体のサブユニット複合体特異的な光依存的分子操作技術を開発し、先行研究に倣い動物の学習機能を操作することを試みた。

①In vitroにおけるGluA2/3のCALI法による機能阻害

AMPA受容体のサブユニット複合体特異的な光依存的分子操作技術としてCALI法を用いた。CALI法は光照射依存的に活性酸素を放出する光増感物質を用いた分子機能不活化法である(Jay DG et al. PNAS 1988)。例えばエオシン等の光増感物質で標識した抗体を標的分子に反応後に光照射すると、産生した活性酸素によりごく近傍の標的分子が特異的かつ迅速に酸化・不活性化されるといったものである。

培養15日目の海馬培養神経細胞にエオシン標識GluA2/3抗体を添加する。その後抗体をwashoutし、培養液を人工脳脊髄液に置換してwhole cellパッチクランプ記録を実施する。パッチクランプ記録はAMPA受容体を介した応答とNMDA受容体を介した応答を光照射(CALI)前後において記録した。光照射後に応答の減弱が見られた際には、その受容体がCALIにより機能阻害をもたらしたと評価することができる。

②In vivoにおけるGluA2/3のCALI法による機能阻害

先行研究(Takemoto et al. Nat. Biotechnol. 2017)に従い、エオシン標識GluA2/3抗体を海馬CA1領域両側に脳定位的に注入し、光照射用カニューラを設置

する。次に海馬依存的学習課題である受動的回避学習（IA学習）を動物に経験させた後、いくつかのタイムコース（1時間後、2時間後、4時間後、24時間後）で光照射後にIA学習における記憶の維持について行動実験により評価した。IA学習の評価については学習用Boxでショックを受けた動物がショックを受けた部屋に入る時間を計測しており、入るまでの時間が短いと記憶が阻害されていることを示す。光照射により記憶機能が阻害されたタイミングについてはその時期がGluA2/3がシナプスに移行し、それにより記憶が維持されたと評価することができる。

4. 研究成果

①In vitro における GluA2/3 の CALI 法による機能阻害

海馬初代培養細胞を用いた In vitro の実験において、エオシンラベル化された GluA2/3 抗体を用いた CALI により NMDA 受容体を介したシナプス応答には影響は無く、AMPA 受容体を介した応答の減弱が示された。

②In vivo における GluA2/3 の CALI 法による機能阻害

動物個体を用いた In vivo の行動実験において、海馬依存的学習課題である IA 学習実施後 1 時間・2 時間における GluA2/3 の CALI により動物がショックを受けた部屋へ入る時間の低下は見られなかった。一方で IA 学習実施後 4 時間・24 時間において GluA2/3 の CALI を導入することによりショックを受けた部屋へ入る時間の有意な低下がみられた。このことから IA 学習実施後 1 時間・2 時間ではなく、4 時間・24 時間において GluA2/3 がシナプスに移行し、それにより記憶が維持されたということが示された。さらに、GluA1/1 の CALI についても実施したところ、GluA2/3 とは異なり、IA 学習実施後 1 時間・2 時間の時点で光照射を施すことにより記憶機能の低下が見られ、4 時間・24 時間における CALI ではそのような低下は見られなかった。

これらの結果から In Vitro・In Vivo において有効な GluA1/1・GluA2/3 といったサブユニット特異的な光不活性化法を確立することができた。また、海馬において GluA1/1 は記憶の獲得、GluA2/3 は学習後 4 - 24 時間における記憶の維持を担っていることが示唆された。このような成果をもとに脳損傷後の機能回復過程のモデル動物に上記のサブユニット特異的な AMPA 受容体に対する CALI を実施し、脳損傷後の機能回復機構を明らかにする研究を発展させていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Shidara Hisashi, Jitsuki Susumu, Takemoto Kiwamu | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Chromophore-assisted light inactivation of target proteins for singularity biology | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v21.s009 | 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 - |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Jitsuki Susumu | 4. 巻 157 |
| 2. 論文標題 CRMP2 binding compound accelerates functional recovery from central nervous system damage | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica | 6. 最初と最後の頁 244 ~ 247 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.22011 | 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10件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨 |
| 2. 発表標題 サブユニット特異的なAMPA受容体の光操作 |
| 3. 学会等名 第46回 日本神経組織培養研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨 |
| 2. 発表標題 AMPA 受容体サブユニット特異的な記憶の制御 |
| 3. 学会等名 第8回 脳と心の研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨、高橋 琢哉、竹本 研 |
| 2. 発表標題 海馬GluA2/3 AMPA受容体に対する光不活性化 |
| 3. 学会等名 第46回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨 |
| 2. 発表標題 海馬GluA2/3 AMPA受容体に対する光不活性化 |
| 3. 学会等名 第7回 脳と心の研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨、高橋 琢哉、竹本 研 |
| 2. 発表標題 Optical inactivation technology for GluA2/3 AMPA receptor. |
| 3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨、高橋 琢哉、竹本 研 |
| 2. 発表標題 Optical inactivation of hippocampal GluA2/3 AMPA receptor. |
| 3. 学会等名 第100回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨、高橋 琢哉、竹本 研 |
| 2. 発表標題 GluA2/3 AMPA受容体に対する光不活性化技術の開発と応用 |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨、高橋 琢哉、竹本 研 |
| 2. 発表標題 GluA2/3 AMPA受容体複合体に対する光不活性化技術 |
| 3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨、高橋 琢哉、竹本 研 |
| 2. 発表標題 GluA2/3 AMPA受容体複合体に対する光不活性化技術 |
| 3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 實木 亨 |
| 2. 発表標題 シナプス可塑性による脳損傷後の機能代償回路の形成機構 |
| 3. 学会等名 第43回神経組織培養研究会（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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|