

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06788

研究課題名（和文）光作動性シナプス可塑性制御ツールを用いた海馬LTDの生理機能の探索

研究課題名（英文）Exploring physiological functions of hippocampal LTD using the PhotonSABER, a photo-activated synaptic plasticity control tool.

研究代表者

伊藤 政之（Itoh, Masayuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：20442535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究計画では、慶應義塾大学・柚崎研究室で開発された光作動性LTD阻害ツール（PhotonSABER、以下PS）を利用し、空間記憶・学習に関与している海馬での長期抑圧（long-term depression：LTD）と因果関係を示す行動レベルでの機能の解明を目的とした。本研究計画に必要なツール、前脳の興奮性神経細胞にPSを発現するマウスをノックインマウス、および静脈投与により全脳的にPSの発現が可能なAAVベクターを作製することはできたが、急性脳スライスレベルの実験で、海馬では光毒性の問題が解決出来ず、PSを用いて海馬CA3-CA1シナプスのLTDを抑制する条件を確立する事が出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間を通じて、光刺激による原因不明の毒性のためPhotonSABERの活性化に十分な強度の刺激を行えなえず、ex vivoのスライスレベルでの実験条件の確立が大きく停滞してしまい、その後のLTDの生理機能の解明に必要な行動実験に繋げることができなかった。しかしながら、ノックインマウスやAAVベクター等のツールの作製は完了しており、今後もこれらを利用し、他の脳部位、例えば扁桃体を標的として恐怖条件付けの行動実験をモデルとしてLTDと直接的な因果関係のある生理機能の解明に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：This research plan utilises a photo-activated LTD inhibition tool (PhotonSABER, hereafter "PS") developed in the Yuzaki Laboratory at Keio University to elucidate the functions at the behavioural level that are causally related to long-term depression (LTD) in the hippocampus, which is involved in spatial memory and learning. We were able to generate the necessary tools for this research plan, knock-in mice expressing PS in excitatory neurons in the forebrain, and AAV vectors capable of whole-brain expression of PS by intravenous administration. But we could not be established the experimental condition that PS inhibit the LTD of hippocampal CA3-CA1 synapses, because we were unable to solve the problem of phototoxicity in the hippocampus.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：海馬 シナプス可塑性 LTD 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

記憶・学習という魅力的な課題との関連からシナプス可塑性は長らく、そして今も尚、神経科学の中心的な研究課題の一つである。Bliss & Lomo により海馬における長期増強 (Long-Term Potentiation: LTP) が報告されて (Bliss & Lomo, JP 1973) 以降、およそ半世紀にわたって精力的に研究が進められ、分子・細胞レベルでの理解が進んできた。今日ではシナプス可塑性の分子実体は例外はあるものの、主にシナプス後部に発現する AMPA 受容体の数の変化として理解されている。LTP は AMPA 受容体がエキソサイトーシスによりシナプス後部に輸送され、シナプス伝達に關与する受容体の数が増加することにより引き起こされ、一方、LTP の逆過程とされる長期抑圧 (Long-term depression: LTD) は、シナプス後部に存在する AMPA 受容体の選択的なエンドサイトーシスによる受容体数の減少によって引き起こされる。また 1990 年代からは遺伝子改変マウス作製技術の進歩により、シナプス可塑性に關連する遺伝子群の遺伝子改変マウスの解析が精力的になされ、これらのマウスのシナプス可塑性の異常と、個体レベルでの記憶や学習等の障害の報告が数多く蓄積されてきた。これにより、あくまで仮説としての記憶・学習の細胞レベルでの基盤であったシナプス可塑性は、その個体レベルでの生理的役割を確立しつつある。しかしながら、これらの研究では遺伝子の改変により引き起こされた LTP や LTD の異常が“直接的”に個体のレベルでの記憶や学習の能力に障害をおよぼしたのか、他の要因 (神経発生や回路形成の異常等) による副次的な異常なのかについては議論の余地がある。また、急性スライス標本でシナプス可塑性を誘導するような人工的な誘導刺激が *in vivo* で実際に生じているのかどうか等、不明な点も少なくない。よって今後、シナプス可塑性と記憶・学習等の高次脳機能との間の関係を直接的に關連付けしていくような更なる研究望まれている (Humeau & Choquet, *Nat. Neurosci.* 2019)。

2. 研究の目的

申請者の所属する慶應義塾大学・柚崎研究室では光作動性の LTD 障害ツール PhotonSABER を新たに開発し (Kakegawa ら, *Neuron* 2018)、これを用いて光依存的に LTD を障害することで小脳の平行繊維—プルキンエ細胞間シナプスで觀察される LTD の障害が視機性眼球反応 (OKR) および前庭動眼反射 (VOR) の障害を引き起こすことを明らかにし、小脳 LTD と小脳依存的な運動学習の間の直接的な因果關係について示した。そこで本研究計画では対象とする脳部位を空間記憶・学習に關わる海馬かえ、海馬 CA3-CA1 シナプスで見られる LTD とそれに対応する個体レベルでの生理機能の探索を目指した。実験計画について以下に 2 点にまとめ、詳細に示す。

(1) PhotonSABER により海馬 LTD は障害されるのか?

海馬 CA1 錐体細胞に PhotonSABER を発現させ (詳細は後述)、急性海馬スライスを用いた電気生理学的な解析により、光照射による PhotonSABER の活性化により海馬 CA3-CA1 シナプスの LTD が抑制できるか検証を行う。また PhotonSAER の活性化による副次的な作用がないかどうか定常状態のシナプス特性 (微小興奮性シナプス後電流: mEPSC, 入力—出力關係, ペアパルス比等) LTP について確認を行う。更にこのシナプスで觀察されることが知られている 2 種の

LTD (NMDAR 依存性 LTD、mGluR 依存性 LTD) が実際に PhotonSABER により阻害できるか検証を行う。

(2) PhotonSABER による海馬 LTD の阻害が行動試験に与える影響の解析

海馬 CA1 錐体細胞に PhotonSABER を発現させたマウスに光刺激用カニューレを留置し、光刺激下で海馬機能と特に関連のあると考えられている行動試験を行う。計画段階では空間学習を担う背側海馬との関連が深いモリスの水迷路またはバーンズ迷路で、かつ LTD との関連が予想される逆転学習課題について (Awasthi ら, *Science* 2019) および情動や社会性記憶を担う腹側海馬との関連が深い社会性識別テストと侵入者テスト (Okuyama ら, *Science* 2016) を用いて解析を行うことを計画した。

3. 研究の方法

本研究計画では、急性スライスを用いた電気生理学解析の結果を最終的に個体レベルの行動解析の結果と対応させる事が必須であるため、PhotonSABER を海馬 CA1 錐体細胞の大部分に効率的に発現させることが望まれる。その為に以下の2種の検討を行った。

(1) 前脳の興奮性細胞特異的に PhotonSABER を発現するノックインマウス (KI) の作製

計画段階で既に Cre 依存的に PhotonSABER を発現可能なノックインマウス (PhotonSABER-LSL) が樹立済みであったため、前脳の興奮性神経細胞特異的に Cre を発現する CaMKII-Cre マウスを交配させ、前脳の興奮性細胞特異的に PhotonSABER を発現するノックインマウス (CaMKII-Cre;PhotonSABER-LSL) を作製した。免疫染色により PhotonSABER が実際に前脳の興奮性細胞に発現することを実際に確認した。

(2) 静脈投与により全脳的に PhotonSABER を発現可能な AAV ベクター (PHP.eb) の作製

上述のノックインマウスでは PhotonSABER の発現量が足りない可能性に直面し、より高発現させるため AAV ベクターを用いた方法も検討した。これについても最終的な行動実験での使用を考慮し、静脈投与によって全脳的な遺伝子発現が可能な AAV-PHP.eb カプシドを使用した。興奮性細胞に発現させるため CaMKII プロモーターを使用した AAV ベクターを作製 (AAV-PHP.eb-CaMKII-PhotonSABER-P2A-EGFP) し、これをマウスに静脈投与、または局所投与によって外来的に PhotonSABER を発現させる系を確立できた。免疫染色による概算ではノックインマウスに比べて静脈投与では部位にもよるが数倍以上、海馬への局所投与では少なくとも10倍以上高発現させる事ができた。

4. 研究成果

(1) 前脳の興奮性細胞特異的に PhotonSABER を発現する KI マウスでの LTD 阻害実験

前脳の興奮性細胞特異的に PhotonSABER を発現するノックインマウス (CaMKII-Cre;PhotonSABER-LSL) の急性海馬スライスを作製し、光照射による PhotonSABER の活性化により CA3-CA1 シナプスの LTD が阻害できるか検証を行った。結果、予想外かつ非常に残念な事に PhotonSABER の発現に関わらず光照射に伴い、CA3-CA1 シナプスの誘発性 EPSC が急速かつ顕著に生じる事が判明した。原因は完全には不明であるが、光毒性なのではないかと想像された。この光毒性は 500 lux 程度まで光強度を低下させるとある程度まで軽減できたが、PhotonSABER

の活性化には約 1000 lux の光強度が必要なため、この条件で PhotonSABER を活性化させる事は困難であると判断した。そのため光毒性による影響を最小限にするため抗酸化剤の還流液への添加を検討した。結果、アスコルビン酸、ビタミン E 誘導体、N-アセチルシステインの単独添加や混合添加を検討し、PhotonSABER の活性化に必要な 1000 lux の光照射で、光毒性が生じない条件を見出す事ができた。しかしながら、この条件で PhotonSABER 発現細胞に光照射を行ったところ、光依存的に LTD を抑制する事が出来なかった。そこで、このノックインマウスの発現量では不十分な可能性を考え、後述のように AAV ベクターを用いて PhotonSABER を高発現させられる実験系に切り替えた。

(2) AAV ベクターを用いた PhotonSABER 高発現細胞での LTD 阻害実験

上述のようにノックインマウスを用いた実験系では PhotonSABER の発現量が足りない可能性に直面したため、より高発現が期待できる AAV ベクターを用いた方法を検討した。海馬 CA1 領域に AAV-PHP.eb-CaMKII-PhotonSABER-P2A-EGFP を局所投与し、発現を誘導するため 2 週間程度マウスを飼育後、急性海馬スライスを作製し、光照射による PhotonSABER の活性化により CA3-CA1 シナプスの LTD が阻害できるか検証を行った。結果、大変残念な事にこの条件でも光依存的に LTD を抑制する事は出来なかった。免疫染色によるではノックインマウスに比べ海馬への局所投与で少なくとも 10 倍以上高発現しており、この条件で発現量が足りない可能性は低いと考えられた。したがって、光毒性回避のために添加した抗酸化剤が PhotonSABER を抑制してしまう可能性もあり、このまま海馬での実験を進行させる事が困難であると想像された。

以上のように、海馬では小脳では見られなかった光毒性の問題を解決出来ず、計画通りの研究の遂行ができなかった。しかしながら、PhotonSABER を発現させるためのツールについては少なくとも 2 種類作製済みであり、今後これらを用いて他の脳部位に焦点を変え引き続き LTD の生理機能の探索を続けていく予定である。現時点ではまだ検討中ではあるが、例えば扁桃体での恐怖記憶の消去学習 (Fear extinction) への LTD の関与等、比較的迅速に着手できる標的はいくつかピックアップ済みであるため、まずはこれらの脳部位での LTD 阻害実験について早々に着手したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Dewa K, Arimura N, Kakegawa W, Itoh M, Adachi T, Miyashita S, Inoue YU, Hizawa K, Hori K, Honjaya N, Yagishita H, Taya S, Miyazaki T, Usui C, Tatsumoto S, Tsuzuki A, Uetake H, Sakai K, Yamakawa K, Sasaki T, Nagai J, Kawaguchi Y, Sone M, Inoue T, Go Y, Ichinohe N, Kaibuchi K, Watanabe M, Koizumi S, Yuzaki M, Hoshino M	4. 巻 15
2. 論文標題 Neuronal DSCAM regulates the peri-synaptic localization of GLAST in Bergmann glia for functional synapse formation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-44579-z	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 Itoh Masayuki, Yuzaki Michisuke	4. 巻 34
2. 論文標題 The hidden face of GluD1 at inhibitory synapses	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Research	6. 最初と最後の頁 405 ~ 406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41422-024-00931-6	査読の有無 無
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 Ojima Kento, Kakegawa Wataru, Yamasaki Tokiwa, Miura Yuta, Itoh Masayuki, Michibata Yukiko, Kubota Ryou, Doura Tomohiro, Miura Eriko, Nonaka Hiroshi, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Yuzaki Michisuke, Hamachi Itaru, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 13
2. 論文標題 Coordination chemogenetics for activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30828-0	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 Oota-Ishigaki Akiko, Takao Keizo, Yamada Daisuke, Sekiguchi Masayuki, Itoh Masayuki, Koshidata Yumie, Abe Manabu, Natsume Rie, Kaneko Masaki, Adachi Toma, Kaizuka Toshie, Suzuki Nami, Sakimura Kenji, Okuno Hiroyuki, Wada Keiji, Mishina Masayoshi, Miyakawa Tsuyoshi, Hayashi Takashi	4. 巻 47
2. 論文標題 Prolonged contextual fear memory in AMPA receptor palmitoylation-deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 2150 ~ 2159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41386-022-01347-9	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 政之、掛川 涉、柚崎 通介
2. 発表標題 GluD2ラーチャー変異体のチャネル活性の種間差により明らかとなったイオンチャネル型グルタミン酸受容体のM4ヘリックス上部の機能的役割
3. 学会等名 日本生理学会第101回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊藤 政之、掛川 涉、柚崎 通介
2. 発表標題 Differential effects of the Lurcher mutation on the channel activity of human and mouse GluD2 receptors.
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023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
---------	---------