

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293260

研究課題名(和文) シナプスイメージングに基づいた統合失調症モデルのニューロコンピューテーション

研究課題名(英文) Neurocomputation of schizophrenia pathophysiology based on the two-photon synaptic imaging in vivo

研究代表者

林 朗子(高木朗子)(Hayashi-Takagi, Akiko)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：60415271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：スパインは刺激に応じてシナプス伝達効率が変化するため、脳の基本素子と考えられている。統合失調症ではスパイン形態・密度異常が報告されているが、その病態生理への意義は、解明されていない。そこで、統合失調症モデルマウスである、DISC1 KDマウスやカルシニューリンKOマウスのin vivo 2光子励起イメージングを行った。2つのモデルで共通していた所見は、巨大スパインの出現が有意に高いことだった。単一スパインのNMDA-EPSC/AMPA-EPSC比を求め、この計測データを基に、回路モデリングを行った。シミュレーションの結果、巨大スパインがある場合、回路動態が不安定になるとの手ごたえを得た。

研究成果の概要(英文)：DISC1 is one of schizophrenia-related gene. We performed the longitudinal in vivo imaging analysis of the brain of DISC1 knockdown model, and we found this model exhibited decrease in the dendritic spine and the significant increase in the huge spines. The existent of the huge spines in this model mice is interesting because another schizophrenia model mice, Calcineurin knockout mice also exhibited this phenomenon. Given that there is the strong correlation between spine head size and its synaptic efficacy, the huge spine can generate larger synaptic current. Furthermore, multiple synaptic inputs are integrated in dendrite, resulting in the generation of NMDA spike, and simultaneous inputs within dendritic segment induces supralinear effect for the generation of NMDA spike. We are now demonstrating that the larger current through the huge spine would significantly change dendritic integration, resulting in disorganized firing.

研究分野：神経科学

キーワード：統合失調症 シナプス 2光子イメージング シナプス後電流

1. 研究開始当初の背景

神経細胞はグルタミン酸作動性シナプスを介した入力を多くの神経細胞より受けた結果、発火するか否かの演算を行い、発火した場合、多くの投射先神経細胞にシナプス入力を与える。大脳皮質においては、シナプスの約8割はスパインという小突起上に形成される。スパインは学習に応じてその形態・サイズが劇的に変化し、それに伴いシナプス伝達効率も変化するため、スパインは脳の基本素子と考えられている。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・密度異常が報告され、また精神疾患関連遺伝子の多くがシナプス関連遺伝子であるため、これら疾患の病因・病態生理と示唆されてきた。しかし、倫理的・技術的困難さより、ヒト脳におけるシナプス解像度の病態研究は、ほとんど進行しておらず、疾患関連遺伝子多型という分子が如何にしてシナプスの障害を惹起するのか、またシナプス障害は行動を制御する責任病態生理なのか、それとも付随する現象に過ぎないのかは全く未解明である。そこで本研究では、最先端技術を結集し、異常行動発症前後でのスパイン動態や神経発火を定量する。

2. 研究の目的

スパインは、その形態とシナプス伝達効率が非常に良い相関を示すため、形態を観察するだけで、そのシナプス機能を精度良く推測することができる。そこで2光子顕微鏡による *in vivo* イメージングと Ca^{2+} イメージングを組み合わせ、シナプス形態、シナプス入力、神経発火など膨大な情報を採取でき、さらには行動レベルの表現型を同一個体で繰り返し観察する。しかし、シナプス異常と個体レベルの行動とが如何に関連するかは実際のところ未解明であり、おそらく実験的に両者の直接的因果関係をメカニズムまで踏み込むことは困難と考えられる。そこで本申請では、統合失調症モデルマウスの *in vivo* イメージングや Ca^{2+} イメージングなどのウェットデータから特徴的な要素を抽出してモデル化する(シミュレーション)。これによりシナプス伝達効率を変え回路解析する等の仮想実験が可能になり、ウェットの実験系だけでは困難な仮説検証を試みる。そしてモデル動物の回路機能不全に寄与する要因が神経の演算機能なのか、受容体特性にあるのか、あるいは回路ダイナミクスかなどのシステムレベルの知見を蓄積し、回路病態に根差した創薬標的を探索する。

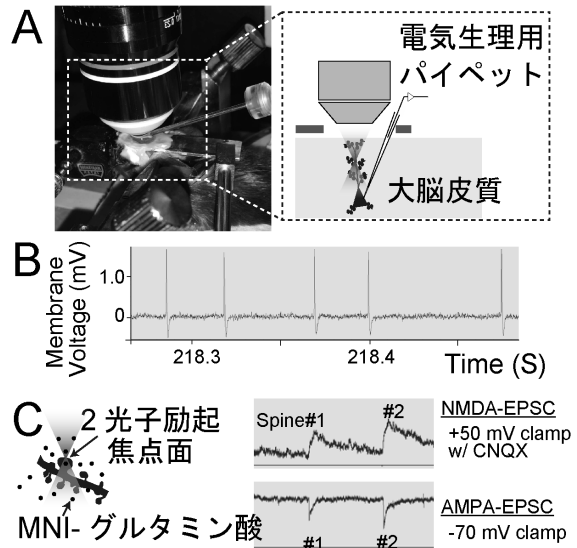
3. 研究の方法

表面的・構成的・予測的妥当性を満たす有力な統合失調症モデルモデルとして、

DISC1 ノックダウン、カルシニューリンノックアウトマウス、PolyIC 投与モデルを用い、異常行動発症前後の縦断的 *in vivo* 2光子顕微鏡イメージングや、固定標本作成し共焦点イメージングを行うことで、神経発達に伴うスパインの体積分布の変化を観察する。

4. 研究成果

DISC1 KD マウスやカルシニューリン KO マウスなどの統合失調症モデルマウスの神経発達後期の *in vivo* 2光子励起イメージングを行い、実際に脳内で生じているスパイン動態を蛍光イメージングした。DISC1 KD マウスでは神経発達期の過剰なシナプス刈り込み現象とともに巨大なスパインが出現し、成体期には精神疾患様行動異常が観察された。カルシニューリン KO マウスにおいても巨大スパインの出現は有意に高いことが見出された。巨大スパインの病態生理への意義を見出すために、スパイン体積イメージングと共に神経発火パターンや樹状突起イベントを計測するための実験系を立ち上げた(図1)。その目的により GCaMP6f による Ca^{2+} イメージング、ホールセル記録およびセル・アタッチ記録を使い分ける。

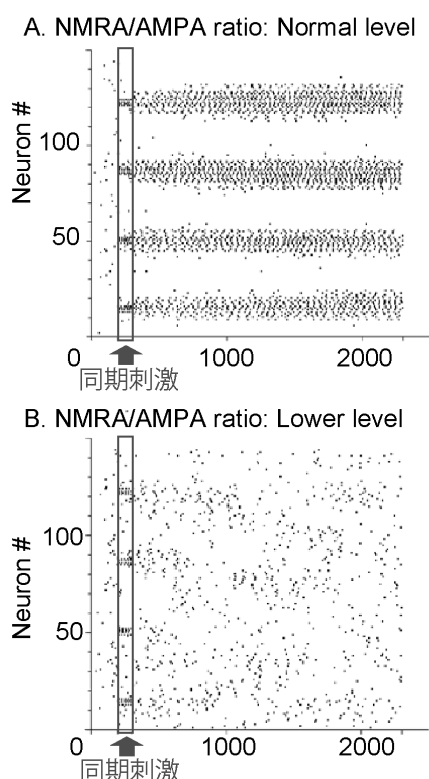


【図1】 *in vivo* 観察・光刺激用2光子顕微鏡

(A) 実際の設備と、模式図。(B) *in vivo* セルアタッチ記録による神経発火計測。(C) MNI-グルタミン酸 uncaging による単一スパイン刺激と刺激スパイン誘発された EPSC 計測(上段 NMDA 成分、下段 AMPA 成分)

マウス前頭野を標的として子宮内穿孔法で大脳皮質 II/III 層の錐体細胞に各種遺伝子を導入し、生後 60 日のマウスより前頭前野を含む冠状断急性スライスを作

成し、グルタミン酸アンケーシング法による単一スパイン刺激を行い、EPSCをホールセルパッチクランプ法により記録し、単一スパインのNMDA-EPSC/AMPA-EPSC比を求め、この計測データは分担・田中により、前頭前野神経回路モデリングが行われた(図2)。ワーキングメモリーなどの認知機能には前頭野錐体細胞の持続発火が重要と考えられているが、回路シミュレーションの結果、予備モデリングでNMDA-EPSC/AMPA-EPSC比がその持続性に重要であり、巨大スパインがあると回路動態が不安定になるとの手ごたえを得ており、今後、より詳細なデータを組み込んでのモデリングを行う。



【図2】*in silico* ラスタープロット

NMDA-EPSC/AMPA-EPSC比が正常値であるAに対して、この比が低いBでは方向選択性のある持続発火活動が障害される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計18件)

- (1) Okazaki H, Hayashi-Takagi A, Nagaoka A, Negishi M, Ucar H, Yagishita S, Ishii K, Toyozumi T, Fox K, Kasai H. *Calcineurin knockout mice show a selective loss of small spines.* *Neuroscience Letters* 671 (2018) 99-102. 査読あり

- (2) Zhang JC, Yao W, Qu Y, Nakamura M, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, Han M, Shirayama Y, Hayashi-Takagi A, Hashimoto K. *Increased EphA4-ephexin1 signaling in the medial prefrontal cortex plays a role in depression like phenotype.* *Scientific Reports*. 7 (2017) 7133. 査読あり
- (3) Hoshiba Y, Wada T, Hayashi-Takagi A (CA). *Synaptic ensemble underling for selection and consolidation of neuronal circuits during learning.* *Frontiers in Neural Circuits* 11: 12 (2017) 査読あり
- (4) Shirai F, Hayashi-Takagi A (CA). *Optogenetics: Applications in psychiatric research.* *Psychiatry Clin Neurosci* 71 (2017) 7133. 査読あり
- (5) Hayashi-Takagi A (CA). *Synapse pathology and translational applications for schizophrenia.* *Neuroscience Research* 114 (2017) 3-8. 査読あり
- (6) Nagaoka A, Takehara H, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, Ishii K, Shirai F, Yagishita S, Akagi T, Ichiki T, Kasai H. *Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo.* *Scientific Reports* 6:26651 (2016) 査読あり
- (7) Miyazaki J, Iida T, Tanaka S, Hayashi-Takagi A, Kasai H, Okabe S, Kobayashi T. *Fast 3D visualization of endogenous brain signals with high-sensitivity laser scanning photothermal microscopy.* *Biomed Opt Express* 7 (2016) 1702-1710. 査読あり
- (8) Takahashi N, Sawada W, Noguchi J, Watanabe S, Ucar H, Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Ohno M, Tokumaru H, Kasai H. *Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and β cells.* *Nature Commun* 6 (2015) 333-8. 8531. doi: 10.1038/ncomms9531. 査読あり
- (9) Hayashi-Takagi A (CA), Yagishita S,

- Nakamura M, Shirai F, Wu YI, Loshbaugh AL, Kuhlman B, Hahn KM, Kasai H.
Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex.
Nature 525 (2015) 333-8. 査読あり
- (10) Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Urakubo H, Ishii S, Kasai H.
A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines.
Science 345 (2014) 1616-20. 査読あり
- (11) Hayashi-Takagi A (CA), Vawter MP, Iwamoto K.
Peripheral biomarkers revisited: integrative profiling of peripheral samples for psychiatric research.
Biol Psychiatry 75 (2014) 920-928. 査読あり
- (12) Hayashi-Takagi A, Araki Y, Nakamura M, Vollrath B, Duron SG, Yan Z, Kasai H, Haganir RL, Campbell DA, Sawa A.
PAKs inhibitors ameliorate schizophrenia-associated dendritic spine deterioration in vitro and in vivo during late adolescence.
Proc Natl Acad Sci USA 111 (2014) 6461-7, 査読あり
- (13) Miyazaki J, Tsurui H, Hayashi-Takagi A, Kasai H, Kobayashi T.
Sub-diffraction resolution pump-probe microscopy with shot-noise limited sensitivity using laser diodes.
Opt Express 22 (2014) 9024-32. 査読あり
- (14) Wei J, Graziane NM, Wang H, Zhong P, Wang Q, Liu W, Hayashi-Takagi A, Korth C, Sawa A, Brandon NJ, Yan Z.
Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by disrupted-in-schizophrenia-1.
査読あり
Biol Psychiatry 75 (2014) 414-424.
- (15) 河西春郎、長岡陽、葉山達也、野口潤、柳下祥、石井和彦、林(高木)朗子、樹状突起スパイン異常と精神疾患生体の科学、65巻、7-11、2014年、査読なし
- (16) Hayama T, Noguchi J, Watanabe S, Takahashi N, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Matsuzaki M, Kasai H.
GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local
Ca²⁺ signaling.
Nature Neuroscience 16 (2013) 1409-1416. 査読あり
- (17) 林(高木)朗子、**グルタミン酸作動性シナプスと統合失調症**
神経化学、52巻、5-12、2013年、査読なし
- (18) 林(高木)朗子、**統合失調症の発症契機としての Glutamatergic dysregulation**
日本生物学的精神医学会誌、23巻、91-96、2012年、査読なし
- [学会発表](計 件)
- (1) Hayashi-Takagi A. **Systemic response as a causal/exacerbating factor for psychiatric disorders**
日本生理学会(日本、高松)(シンポジウム) 2018年
- (2) Hayashi-Takagi A. **Development of innovative wide-view mapping of synaptic ensemble in the psychiatric model**
日本生理学会(日本、高松)(シンポジウム) 2018年
- (3) 林(高木)朗子、**精神疾患の神経回路異常の解明にむけた革新的な機能的コネクトミクス法の開発**
第1回三融会・武田神経科学シンポジウム(招待講演) 2018年
- (4) 林(高木)朗子、**大脳皮質シナプスと個体レベル行動との関連解析：新規光感受性シナプスプローブを用いた Synaptic optogenetics 法の開発**
千里ライフサイエンスセミナー、大阪、2016(セミナー)
- (5) 林(高木)朗子、**光感受性シナプスプローブ AS-PaRac1 を用いた精神疾患モデルマウス解析**
第59回神経化学大会、福岡、2016(シンポジウム)
- (6) Hayashi-Takagi A. **Visualization of altered dynamics of the dendritic spine in the rodent model of neuropsychiatric disorders**
第39回日本神経科学大会、横浜、2016

(シンポジウム)

(7) Hayashi-Takagi A. **Mapping of Hebbian synaptic potentiation using the synaptic optoprobes**
Janelia Conference, Virginia, 2016
(Conference)

(8) Hayashi-Takagi A. **Functional connectomics using synaptic optogenetics and an activity-dependent neuronal tracing**
Cold Spring Harbor - Asia Meetings, Suzhuo, 2016 (Conference)

(9) Hayashi-Takagi A. **Visualization of learning-related memory trace and its erasure by "Synaptic optogenetics"**
45th Society for Neuroscience, Chicago, 2015 (Minisymposium)

(10) Hayashi-Takagi A. **Visualization and optical erasure of synaptic memory traces in the cerebral cortex**
第38回日本神経科学大会, 神戸, 2015
(シンポジウム)

(11) Hayashi-Takagi A. **Synapse protection as a novel therapeutic strategy for psychiatric diseases**
第92回日本生理学会, 神戸, 2015 (シンポジウム)

(12) 林(高木)朗子. **シナプス保護を戦略とした精神神経創薬の可能性**
第10回日本統合失調症学会, 東京, 2015 (シンポジウム)

(12) 林(高木)朗子. **大脳皮質シナプスと個体レベル行動との関連解析**
第88回日本薬理学会, 名古屋, 2015
(シンポジウム)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://medical-neuro.imcr.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 朗子(高木 朗子)(Hayashi-Takagi Akiko) 群馬大学・生体調節研究所・脳

病態制御分野・教授

研究者番号: 60415271

(2)研究分担者

田中昌司(Tanaka Shoji) 上智大学・理工学部・教授

研究者番号: 30188304