

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460283

研究課題名(和文) 眼優位可塑的变化における一次視覚野IV層内シナプスのコネクトミクス解析

研究課題名(英文) Connectomics analysis of the synapse in the primary visual cortex layer IV in the ocular dominant plasticity

研究代表者

中舘 和彦 (Nakadate, Kazuhiko)

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80372895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は神経回路再編のメカニズムを網羅的な形態学的に明らかにすることを目的とし、コネクトミクス解析を確立した。単眼遮蔽に伴い視覚入力の違いが引き起こされた結果、視覚野内神経細胞はより入力を受ける側のシナプスに移行する。この変異を解析するため、Activity依存性に発現するc-FosならびにFosB、CREBを用いて解析した結果、経時的に発現誘導される細胞数の増加が観察された。発現誘導されてきた細胞を同定後、コネクトミクス解析により網羅的にシナプス解析を行った。その結果、入力が減弱したシナプスが衰退したのち、3日目以降に入力が増強したシナプスがより増加する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of the neural circuit reorganization, we have established connectomics analysis of visual cortex. After monocular deprivation, the neurons in the visual cortex were more received from open eye input. As a result of having immunohistochemically analyzed using c-Fos, FosB and CREB, these activity dependence induced proteins were resulted to detect the changes of ocular dominance plasticity. Using connectomics analysis, synaptic connections were cyclopedically analyzed in layer IV of visual cortex. As a result, we detected that first the synapses received from deprived eye input were reduced, next the synapses received from opened eye input were increased.

研究分野：シナプス可塑性

キーワード：コネクトミクス解析 視覚野 シナプス 眼優位可塑性 電子顕微鏡 三次元再構築

1. 研究開始当初の背景

我々の脳にある神経回路は、様々な外来の刺激を受け、その刺激に適応するように神経回路を修飾、そして変化(可塑性)させている。この神経回路調節機構の解明は、我々人間社会の質の向上に直結する重要な課題であるため、これまで国内外で様々な検討がなされてきている。その中でも視覚野神経可塑性を対象とした研究は、左右の眼からの光刺激を増減(単眼遮蔽)させることで比較的容易に神経回路網を変化させることが出来ることから、神経可塑性研究の基盤としても多くの研究がなされている。この神経回路調節にはセロトニン、ノルアドレナリンといった生体アミン類が関与していること(Nakadate et al, 2001, Matsukawa, Nakadate et al, 2003, Nakadate et al, 2006, Nakadate et al, 2006, Nakadate et al, 2013)を報告してきた。この視覚野神経可塑性研究は、これまで主に電気生理学的手法を用いて解析されてきたが、電気活動の解析だけでは高感度に解析結果が得られる反面、神経回路網の形態学的変化、特にシナプス構造の変化を証明するには至っていない。さらに、神経回路地図(コネクトーム)解析(コネクトミクス)は、神経回路網の複雑さとその解析手法の困難さから詳細な解析が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

脳神経回路網の解析(コネクトミクス)は我々人間社会にとって重要な課題である。申請者がこれまでに習得した電子顕微鏡の連続切片像による三次元再構築法と、新規に開発した c-Fos activity mapping 法を組み合わせ、両眼からのシナプス競合の形態学的メカニズムを明らかにすること、そして神経可塑性を引き起こす調節メカニズムの解明が本研究目的である。

本目的を達成するために、コネクトミクス解析により神経細胞に起源の異なるシナプスがどのように結合しているのか明らかにする。単眼遮蔽によりシナプス可塑性変化を形態学的に明らかにし、機能との相関を解明する。

このシナプス競合は脳において普遍的に用いられている可能性が高く、将来、記憶のメカニズム解明や種々の脳神経疾患の治療法確立へと繋がる裾野の広い研究の礎とする。

3. 研究の方法

本研究は、視覚野神経可塑性に伴う両眼からのシナプス競合のメカニズムを明らかにすることを研究目的とする。そのために、これまで未知であった左右の眼から投射を受ける単一神経細胞上シナプス結合部位のシナプス競合に伴う変化を網羅的に明らかにすることが必要である。本研究目的を達成するため、次の研究を行う。

光学顕微鏡、電子顕微鏡三次元再構築法

による網羅的コネクトミクス解析を用いて、左右の眼からの入力を受ける単一神経細胞上全シナプス部位を同定する。c-Fos など Activity に依存し発現する神経細胞マーカーを併用し、単眼遮蔽後に引き起こされるシナプス競合部位を同定し、シナプス可塑性に伴う形態変化を詳細に、かつ経時的変化を明らかにする。

4. 研究成果

本研究課題の遂行により、条件の整備や以下に示す多くの知見を得ることができた。

Activity 依存性のマーカーを用いた単眼遮蔽後の神経細胞の同定研究において、sensitive period 内では、視覚野第 IV 層で有意な発現変化をする数種のタンパク質を同定した。中でも c-Fos、FosB は western blot 法においても免疫組織化学法においても顕著な変化を示した。さらに免疫組織学的解析では図 1 (c-Fos の例)に示すように、発現誘導される単一神経細胞が同定する可能とした。

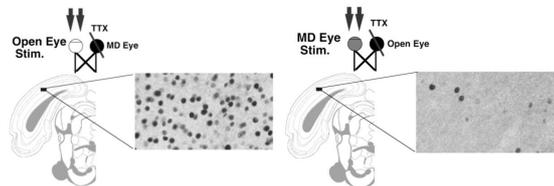


図 1 c-Fosを用いた免疫組織化学法

これらの研究の他に、新規 Activity 依存性に発現するシナプス特異的マーカーを検討したが、本研究期間内には同定には至らなかった。

電子顕微鏡を用いた超微形態学的解析では、単一神経細胞全域を対象とした網羅的な解析を立案し解析した。その研究のために、まず神経細胞体を三次元再構築可能かどうか検討した。これまで用いていた連続超薄切片法を用いた解析では、70nm 厚の連続切片、約 1000 枚を用いて三次元再構築可能となった。その結果、細胞内を詳細に観察可能なレベル(図 2)

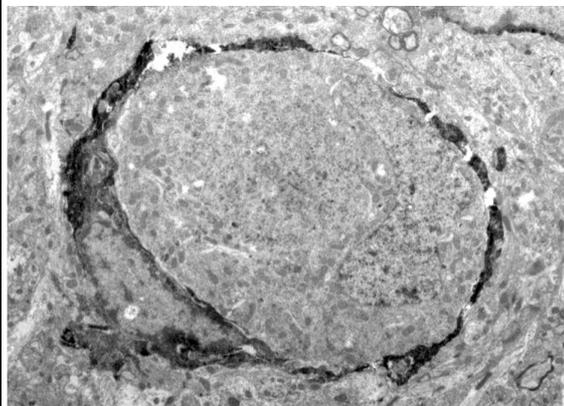


図 2 電子顕微鏡写真の一例

で、細胞内の様相を示す三次元再構築(図 3) さらに細胞間に及ぶ三次元再構築

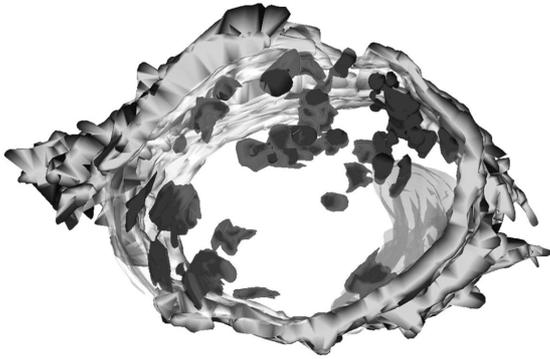


図3 細胞内の三次元再構築像

(図4) も可能とした。これらの手法を組み合わせることで、Activity 依存的な変化を網羅的に解析可能な手技を確立した。

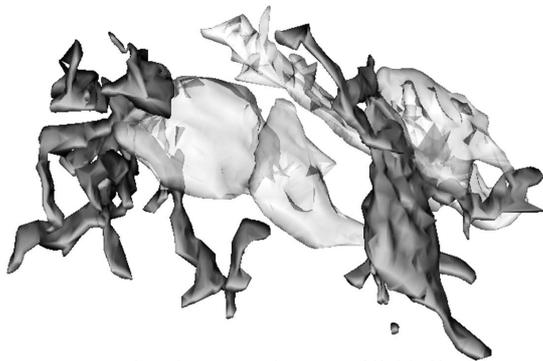


図4 細胞間三次元再構築像

FIB-SEM を用いた三次元解析では、当初使用する予定の機器では神経細胞全域を解析が困難であることが明らかとなった。さらに、脳ブロックの段階で高濃度のオスミウム酸での処理が必要であることから、Activity 依存性に発現誘導されるマーカーの使用が困難であることが分かった。それらを打開するため、脳の軟組織固定を行い Activity 依存性に発現誘導されるマーカーの使用後に再固定し、FIB-SEM にて広範囲に解析する手法の確立に着手した。脳組織の軟組織では安定した条件検討が困難であったため、比較的均質な小腸組織での条件検討を行った。その結果、図5に示すように細胞レベル

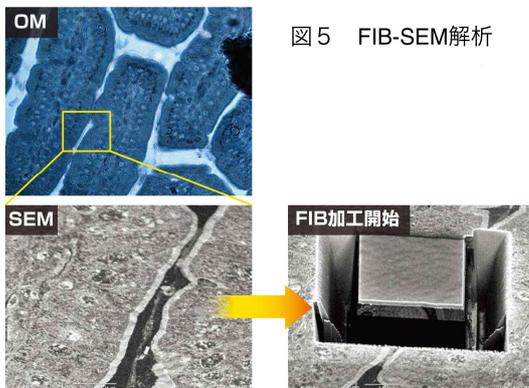


図5 FIB-SEM解析

での発現量の変化を光学顕微鏡下同定した細胞を、FIB-SEM で解析可能な新たな手法を確立できた。本研究期間内には脳での解析間で至らなかったが、この新たに確立した手法を用いて、容易に単一神経細胞の変化、特に生理学的変化と形態学的変化の連関を明らかにすることが可能と考えられる。

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 16 件)

Nakadate K, Motojima K, Hirakawa T, Tanaka-Nakadate S. Progressive Depletion of Rough Endoplasmic Reticulum in Epithelial Cells of the Small Intestine in Monosodium Glutamate Mice Model of Obesity. Biomed Res Int. 査読有, 2016;2016:5251738. doi: 10.1155/2016/5251738.

Hikita M, Motojima K, Kamata S, Yoshida T, Tanaka-Nakadate S, Nakadate K. Protective Efficacy of the Ingestion of Mandarin Orange Containing -Cryptoxanthin on Lipopolysaccharide-induced Acute Nephritis. Yakugaku Zasshi. 査読有, 2016;136(7):1031-40. doi: 10.1248/yakushi.15-00284.

Yang Y, Zhong N, Imamura K, Lu S, Li M, Zhou H, Li H, Yang X, Wan Z, Wang G, Hu B, Li K. Task and Resting-State fMRI Reveal Altered Salience Responses to Positive Stimuli in Patients with Major Depressive Disorder. PLoS One. 査読有, 2016 May 18;11(5):e0155092. doi: 10.1371/journal.pone.0155092.

Akiyama H, Sakakibara S. Cytoskeletons in neuronal development. J Phys Fitness Sports Med, 査読有, 5 (2): 131-142. 2016. DOI: 10.7600/jpfsm.5.131.

Sasaki KS, Kimura R, Ninomiya T, Tabuchi Y, Tanaka H, Fukui M, Asada YC, Arai T, Inagaki M, Nakazono T, Baba M, Kato D, Nishimoto S, Sanada TM, Tani T, Imamura K, Tanaka S, Ohzawa I. Supranormal orientation selectivity of visual neurons in orientation-restricted animals. Sci Rep. 査読有, 2015 Nov 16;5:16712. doi: 10.1038/srep16712.

Nakadate K, Tanaka-Nakadate S. Three-Dimensional Electron Microscopy Reconstruction of Degenerative Dopaminergic Neurons Surrounded by Activated Microglia in Substantia Nigra. *Ultrastruct Pathol.* 査読有, 2015;39(6):369-77. doi: 10.3109/01913123.2015.1042609.

Nakadate K. Developmental changes in the flotillin-1 expression pattern of the rat visual cortex. *Neuroscience.* 査読有, 2015 Apr 30;292:101-11. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.035. Epub 2015 Feb 27.

Iwasaki Y, Yumoto T, Sakakibara S. Expression profiles of inka2 in the murine nervous system. *Gene Expr Patterns.* 査読有, 2015 Sep-Nov;19(1-2):83-97. doi: 10.1016/j.gep.2015.08.002.

Nakadate K, Motojima K, Tanaka-Nakadate S. Dilatation of sinusoidal capillary and swelling of sinusoidal fenestration in obesity: an ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol.* 査読有, 2015 Feb;39(1):30-7. doi: 10.3109/01913123.2014.947010.

Kai N, Nishizawa K, Tsutsui Y, Ueda S, Kobayashi K. Differential roles of dopamine D1 and D2 receptor-containing neurons of the nucleus accumbens shell in behavioral sensitization. *J Neurochem.* 査読有, 2015 Dec;135(6):1232-41. doi: 10.1111/jnc.13380.

Itoh M, Nakadate K, Horibata Y, Matsusaka T, Xu J, Hunziker W, Sugimoto H. The structural and functional organization of the podocyte filtration slits is regulated by Tjp1/ZO-1. *PLoS One.* 査読有, 2014 Sep 3;9(9):e106621. doi: 10.1371/journal.pone.0106621. eCollection 2014.

Nakadate K, Motojima K, Kamata S, Yoshida T, Hikita M, Wakamatsu H. Pathological changes in hepatocytes of mice with obesity-induced type 2 diabetes by monosodium glutamate. *Yakugaku Zasshi.* 査読有, 2014;134(7):829-38. PubMed PMID: 24989474.

Yoshimoto K, Namera A, Arima Y, Nagao T, Saji H, Takasaka T, Uemura T, Watanabe Y, Ueda S, Nagao M. Experimental studies of remarkable monoamine releases and neural resistance to the transient ischemia and reperfusion. *Pathophysiology.* 2014 査読有, Nov;21(4):309-16. doi: 10.1016/j.pathophys.2014.08.005.

Hussain MS, Battaglia A, Szczepanski S, Kaygusuz E, Toliat MR, Sakakibara S, Altmüller J, Thiele H, Nürnberg G, Moosa S, Yigit G, Beleggia F, Tinschert S, Clayton-Smith J, Vasudevan P, Urquhart JE, Donnai D, Fryer A, Percin F, Brancati F, Dobbie A, Smigiel R, Gillissen-Kaesbach G, Wollnik B, Noegel AA, Newman WG, Nürnberg P. Mutations in CKAP2L, the human homolog of the mouse Radmis gene, cause Filippi syndrome. *Am J Hum Genet.* 査読有, 2014 Nov 6;95(5):622-32. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.10.008.

Hasegawa Y, Yoshida D, Nakamura Y, Sakakibara S. Spatiotemporal distribution of SUMOylation components during mouse brain development. *J Comp Neurol.* 査読有, 2014 Sep 1;522(13):3020-36. doi: 10.1002/cne.23563.

Wang W, Nakadate K, Masugi-Tokita M, Shutoh F, Aziz W, Tarusawa E, Lorincz A, Molnár E, Kesaf S, Li YQ, Fukazawa Y, Nagao S, Shigemoto R. Distinct cerebellar engrams in short-term and long-term motor learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, 2014 Jan 7;111(1):E188-93. doi: 10.1073/pnas.1315541111.

[学会発表](計13件)

脳と頭痛-セロトニン神経系と脳神経系 -: 中館和彦、栃木県女性薬剤師会講習会、2016.

細胞組織学における超微形態学 : 中館和彦、細胞組織学研究の展開 2016.

電子顕微鏡で見る細胞の内部構造-神経系を中心に -: 中館和彦、基礎医学懇話会、2016.

明治薬科大学における「地域医療コース」の7年間の成果報告 : 山崎紀子、足立茂、飯田克己、石橋芳雄、井上元基、植沢芳広、菅野敦之、北原嘉泰、小関珠美、斎坂ゆかり、鈴木正、中館和彦、服部豊示、

深水啓朗、宮沢伸介、山田俊二、山田聖子、下川健一、石井文由、日本薬学会第131回大会、2016.

中枢神経系における SENP5 の局在解析：秋山博紀、野村美琴、中舘和彦、榊原伸二、第39回日本神経科学大会、2016.

ヒトの体内構造-超微細構造-：中舘和彦、基礎医学懇話会、2015.

2つの脳-セロトニン神経系を中心に-：中舘和彦、栃木県女性薬剤師会講習会、2015.

Involvement of excess neuronal nitric oxide synthase in the dopaminergic neurodegeneration in Zitter rats : Ayuka Ehara, Kazuhiko Nakadate, Kanji Yoshimoto, Nobuyuki Kai, Atsumichi Tachibana, Tsuyoshi Yamaguchi, Shuichi Ueda, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015.

Tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactive fibers unsusceptible to the degeneration occurring in the zitter mutant rat originate from the dorsal tier of the substantia nigra compact part (SNC) : Tsuyoshi Yamaguchi, Ayuka Ehara, Kazuhiko Nakadate, Shuichi Ueda, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015.

ヒトの体内構造-超微細構造の側面から-：中舘和彦、基礎医学懇話会、2014.

調剤薬局併設型ドラッグストアにおけるスイッチ OTC を用いたセルフメディケーションの推進：秋山静穂、齊藤哲、根本律子、山崎紀子、飯田克巳、中舘和彦、日本薬学会第134年会、2014.

Zitter ラットのドーパミンニューロン変性における神経型一酸化窒素合成酵素の作用：江原鮎香、中舘和彦、吉本寛司、甲斐信行、山口剛、上田秀一、第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014.

眼球運動学習前後のシナプス密度変化と定量的 SDS-FRL 法を用いた AMPA 受容体動態解析：中舘和彦、重本隆一、視覚科学フォーラム第18回研究会、2014.

〔図書〕(計 2 件)

Ehara A, Sakakibara S, Ueda S. The Role of Attractin in Neurodegeneration Caused by Oxidative Stress. *Biochemistry, Genetics and Molecular*

Biology. Chapter 9. ISBN 978-953-51-2747-5, Print ISBN 978-953-51-2746-8, Published: October 26, 査読有, 2016.

Ueda S, Ehara A, Inoue K, Masuda T, Sakakibara S, Yoshimoto K. (2014). Comparison of Neuroprotective Effect of Melatonin in the Nigrostriatal and Mesolimbic Dopaminergic Systems of the Zitter Rat. In *Melatonin: Therapeutic Value and Neuroprotection* (pp. 179-188). 査読有, CRC Press.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
https://www.my-pharm.ac.jp/education/kdb/kyoin/kyoin_115.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中舘 和彦 (NAKADATE Kazuhiko)
明治薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80372895

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

今村 一之 (IMAMURA Kazuyuki)
前橋工科大学・工学部・教授
研究者番号：30203326

榊原 伸一 (SAKAKIBARA Shin-ichi)
早稲田大学・人間科学学術院・教授
研究者番号：70337369

上田 秀一 (UEDA Shuichi)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：60150570

(4)研究協力者

重本 隆一 (SHIGEMOTO Ryuichi)
Institute of Science and Technology
Austria・教授