111　空間弁別障害の基盤となる分子メカニズムの解明	上田（石原）奈津実

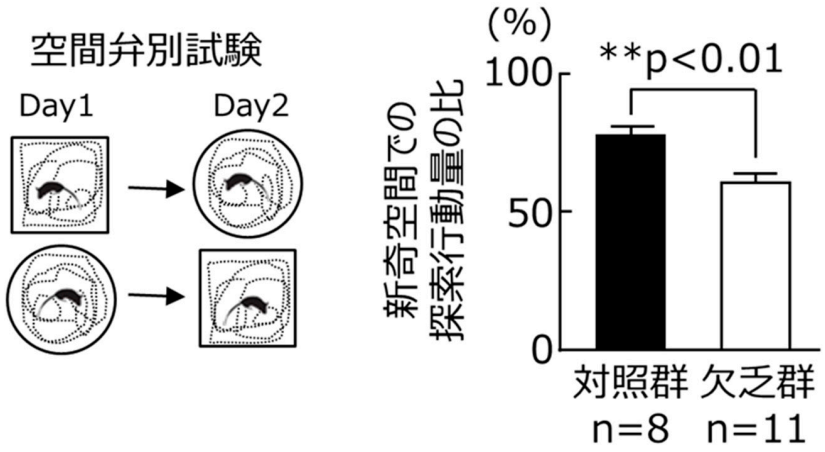
【目的】高齢化社会が進む中で、認知症患者の増加は社会問題となっている。認知症の中核症状は進行性の学習・記憶の障害であり、日常生活に支障をきたすこともある。初期の段階では記憶障害の程度は軽いため、この時点で進行を抑制することが望まれるが、頭部 MRI 画像や CT 画像などで異常を発見出来るのは中後期となってしまう。近年、認知症患者と診断される数年前の時点でも空間認知・空間弁別（短期記憶）などの高次機能が低下することが報告された。学習・記憶の基盤となる細胞レベルの素過程は神経細胞間の信号伝達が持続的に向上する現象、長期増強（LTP）である。神経細胞同士はシナプス結合を介して情報のやり取りをしており、LTP に伴い樹状突起棘（スパイン）の機能とその協調性が制御されることが重要であり、シナプス後部の分子構築が動的なアクチン細胞骨格と学習・記憶関連分子の活動依存的局在変化の相互作用により規定されることが示されている。セプチン細胞骨格は 14 種類のサブユニットからなる細胞分裂蛋白質として発見され、最終分化した神経系で最も高発現し、アルツハイマー病（Kinoshita et al., Am J Pathol 1998）のような神経疾患にも関与することが示唆されている。我々は、特定のセプチンサブユニットがニューロンの形態形成には関与しないものの空間弁別処理に重要な役割を持つことを見出した。空間弁別の中枢は海馬歯状回であることが組織破壊実験や LTP 阻害実験から示され（McHugh et al. Science 2007）、空間弁別の基盤となる分子メカニズムの解明が期待されている。しかしながら、これまでの実験結果はセプチン慢性欠損マウスを使用しており領域特異性については確認出来ていない。そこで本研究ではセプチン欠損／野生型マウスの歯状回における局所的セプチン補填／枯渇が空間弁別障害を救済／再現するかを精査することを目的とした。

【方法】歯状回選択的セプチン補填：セプチンと発現モニタリング用 GFP を共発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターと、GFP のみを発現する対照ベクターを調製し、セプチン欠損マウスの両側歯状回に脳定位固定装置を用いて注入した。歯状回選択的セプチン枯渇：セプチンを標的とする shRNA と発現モニタリング用 GFP を共発現する AAV ベクターと標的配列部分をスクランブルした対照ベクターを調製し、培養細胞での動作確認の後、野生型マウスの両側歯状回に注入した。空間弁別試験：Day1：実験群・対照群の各々を 2 群に分け、素材と床面積が共通で形状のみが異なる 2 つの箱（立方体、円筒）のいずれかにマウスを入れて箱の中を探索させ、移動距離を計測した。Day2：Day1 とは異なる箱での移動距離を計測した。移動距離の比を算出し検定を行った。

【結果】セプチン欠損マウスでの歯状回選択的セプチン補填実験では、新奇空間での探索行動はレスキュー群が有意に高かった（72±5.3% vs. 93±8.7%，$p < 0.05$，$n = 7$，7）。野生型マウスでの歯状回選択的セプチン枯渇実験では、セプチン欠乏群が有意に低かった（図：76±3.4% vs. 59±2.8%，$p < 0.01$，$n = 8$，11）。

今回の実験から、歯状回においてセプチンが発現することが空間弁別に必要であることと、セプチン欠損マウスの空間弁別障害の正常化には歯状回に限局したセプチンの発現で十分であることが検証できた。

セプチンを海馬歯状回選択的に枯渇したマウスの空間弁別試験結果



111. 空間弁別障害の基盤となる分子メカニズムの解明

上田(石原)　奈津実

名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻 細胞制御学グループ

Key words：学習・記憶，細胞骨格，セプチン

緒　言

高齢化社会が進む中で、認知症患者の増加は社会問題となっている。認知症の中核症状は進行性の学習・記憶の障害であり、日常生活に支障をきたすこともある。初期の段階では記憶障害の程度は軽いため、この時点で進行を抑制することが望まれるが、頭部 MRI 画像や CT 画像などで異常を発見出来るのは中後期となってしまう。近年、認知症患者と診断される数年前の時点でも空間認知・空間弁別(短期記憶)などの高次機能が低下することが報告された。学習・記憶の基盤となる細胞レベルの素過程は神経細胞間の信号伝達が持続的に向上する現象、長期増強（LTP）である。神経細胞同士はシナプス結合を介して情報のやり取りをしており、LTP に伴い樹状突起棘（スパイン）の機能とその協調性が制御されることが重要であり、シナプス後部の分子構築が動的なアクチン細胞骨格と学習・記憶関連分子の活動依存的局在変化の相互作用により規定されることが示されている。

セプチン細胞骨格は 14 種類のサブユニットからなる細胞分裂蛋白質として発見された。分裂細胞においては収縮環や鞭毛のリングの構成成分として、多数の分子を集積し相互作用させる足場として、また、細胞の微小領域における分子の局在や非対称性を保証する拡散障壁としての役割が報告されている［1，2］。一方で最終分化した神経系で最も高発現し、アルツハイマー病のような神経疾患にも関与することが示唆されている［3］。我々は神経系におけるセプチンの役割を探索し、セプチンが HDAC6 による微小管脱アセチル化の物理的足場として働くことで、微小管の安定化レベルを最適化し神経突起伸長を制御することを見出した［4］。さらに成体小脳では、バーグマングリアにおいてセプチン-CDC42EP4（セプチン会合分子）複合体はグルタミン酸トランスポーターGLAST を平行線維-プルキンエ細胞間シナプス近傍に集積させる足場として機能し、グルタミン酸クリアランスと運動学習を促進することを見出した［5，6］。さらに、学習・記憶におけるセプチン細胞骨格の寄与を *in vivo* LTP 動物モデルや遺伝子改変動物を用いて検討し特定のセプチンサブユニットがニューロンの形態形成には関与しないものの空間弁別処理に重要な役割を持つことを見出した。

Pattern separation は類似した記憶を分離、差別化するために必須であり、計算論の立場から海馬歯状回がその役割を担う可能性が示唆された［7］。ヒトの脳機能画像研究からも異なる刺激を分離する際に歯状回が活性化されることが示され［8］、空間的な pattern separation タスクを用いて、学習後のラット歯状回を破壊すると類似した空間の分離が難しくなり CA 破壊では分離が可能であったことから歯状回が空間弁別に重要な役割を果たすことが示された［9］。さらに LTP 成立に関与する NMDA 受容体の歯状回特異的欠損マウスの解析より、歯状回 LTP は空間弁別に必要であり、空間認知・定位には必要でないことが示され［10］、空間弁別の基盤となる分子メカニズムの解明が期待されている。しかしながら、これまでの実験結果はセプチン慢性欠損マウスを使用しており領域特異性については確認出来ていない。そこで本研究ではセプチン欠損／野生型マウスの歯状回における局所的セプチン補填／枯渇が空間弁別障害を救済／再現するかを精査することを目的とした。まずは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを定位脳手術により注入して海馬歯状回選択的に遺伝子発現する一連の技術の導入と最適化を試みた。続いて、セプチン欠損マウスでの歯状回選択的セプチン補填実験を行い、空間弁別試験を行った。その結果、新規空間での探索行動はレスキュー群が有意に高くなることがわかった（72±5.3% vs. 93±8.7%，$p < 0.05$，$n = 7$，7）。さらに、野生型マウスでの歯状回選択的セプチン枯渇実験では、セプチン欠乏群の新奇空間での探索量が有意に低かった（76±3.4% vs. 59±2.8%，$p < 0.01$，$n = 8$，11）。今回の実験から、歯状回においてセプチンが発現することが空間弁別に必要

であることと、セプチン欠損マウスの空間弁別障害の正常化には歯状回に限局したセプチンの発現で十分であることが検証できた。

方　法

1. 脳定位手術を用いたウイルスベクター注入

脳定位手術によりマウスの海馬歯状回にウイルスベクター液を注入した。まず 4%抱水クロラール 0.35 ml を腹腔内投与した後、0.04%キシラジン 0.05 ml を大腿筋内投与してマウスを深麻酔した。電動剃刀を用いてマウス頭部の毛を除き、マウスの頭をマウス固定用アダプターに固定した。次に、頭部の皮膚を切開し、2%キシロカインゼリーを用いて切開部を表面麻酔し、頭蓋骨上の薄膜を綿棒でこすって除去した。マウス固定用アダプターを脳定位装置に装着した後、マウスの頭を地面と垂直にするために、頭蓋骨の縫合点であるブレグマとラムダの高さの差が 0.1 mm 以内になるように調整した。頭蓋骨の大きさは個体により差がある。個体差を可能な限り考慮して海馬歯状回の位置を決定するため、ブレグマとラムダの距離を測定し、マイクロピペット刺入位置を決定した。歯科用ドリルで刺入位置の頭蓋骨の厚さを 35 mm 程度まで薄くし、精密ピンセットで残った骨片を除去して脳表を露出させた。マイクロシリンジポンプを用いてマイクロピペットにウイルスベクター液を充填し、マイクロピペットを片側の刺入位置の脳表から 2 mm 腹側に刺した。ウイルスベクターを注入した後、5 分間静置し、ウイルスベクター液の逆流を防ぐためにマイクロピペットを 0.01 mm/s の速さで抜いた。同様にして、逆側の刺入位置にもウイルス注入を行った。手術が終わったマウスの頭部を縫合糸で縫合した。縫合部分に瞬間接着剤をつけて固定し、麻酔から回復させた。本研究では、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた。本研究における組み換え AAV に用いる供与核酸はすべてその構造と蛋白発現の機能がすでに知られており、病原性および伝達性等はないと考えられる。また、実験で用いたウイルスは実験終了後オートクレーブ処理（120℃，20 分）により不活性化した。

2. 空間弁別試験

明暗サイクルを 12 時間（明期 8:00～20:00）とした SPF 施設で飼育を行い、行動実験は 8:00～18:00 の間に防音室内で実施した。行動実験室内では、装置内が 100 lux になるように調光した。実験の最低 30 分前にはマウスを防音室内に入れて実験室内の環境に慣らした。マウスを新奇実験室環境、実験者による捕獲、拘束などに馴化させるために、5 分間のハンドリングを 5 日間連続で行った。空間弁別能力を評価するために、空間弁別試験を行った。この試験には、容器 S（白い四角箱 縦横 30 x 30 cm，高さ 30 cm）と、同素材、同色、同面積である容器 C（白い円筒形 直径 34 cm，高さ 30 cm）を用いた。Day 1 に容器 S もしくは容器 C にマウスを 6 分間入れ、探索行動量（移動距離）を測定した。翌日（Day 2）、1 日目と異なる容器に 3 分間マウスを入れ探索行動量（移動距離）を測定した。Day 2 の探索行動量を Day 1 の前半の 3 分間の探索行動量でそれぞれ割り、100 を掛け、パーセンテージで表したものを用いて探索行動量の比較を行った。データ取得及び解析は、Ethovision と、ソフトウェア Statcel3 を利用した。各データの解析は、t 検定で行った。グラフは平均値と標準誤差で示した。統計解析によって求められた p 値が 0.05 以下であることをもって有意であると判断した。すべての実験は、名古屋大学の動物実験委員会のガイドラインに従って行った。

結果および考察

1. 脳定位手術を用いたウイルスベクター注入法の導入および改善

まず、脳定位手術を用いた海馬歯状回へのウイルスベクター注入法の導入および手法の改善に着手した。従来の方法ではマイクロピペット刺入位置を骨の縫合点であるブレグマから後方に 2.2 mm、側方に 1.35 mm の点としていた。しかし、個体によって頭蓋骨の縫合（ブレグマを特定するための目安）の形状にばらつきがあり、特殊な形状の縫合をもつ個体は本来のブレグマの位置を推測しにくいこと、およびマウスの頭蓋骨の大きさに個体差があるという理由から、この方法では安定的に正確に刺入位置を決定することはできなかった。そこで、本研究ではブレグマと、ブレグマの後方に位置するラムダとの距離が平均約 3.8 mm であることから、刺入位置をブレグマから後方に 2.2 x（ブレグマとラムダの距離）/3.8 mm、側方に±1.35 mm とすることで、個体差による影響を可能な限り除外した。従来の方法では、

マイクロピペットを片側の海馬歯状回に刺入・抜去した後、同じマイクロピペットを対側の海馬歯状回に刺入をしていた。しかし、この方法では 1 回目のマイクロピペット刺入によりマイクロピペット先端に組織片や血餅などが詰まり、2 回目のマイクロピペット刺入後にウイルスベクター液を送液できなくなる場合がある。そこで本研究では、1 回目のマイクロピペット刺入・抜去後に送液を確認し、つまりがあれば滅菌水を用いて組織片を除去した。続いて、本研究で用いるセプチン発現ベクターおよびセプチンノックダウンベクターそれぞれの注入量・注入速度の検討を行った。AAV ウィルスはベクター液により粘度が異なり、常に同じ注入量、注入速度では投与領域の広がりにばらつきが発生し、感染領域を海馬歯状回内にとどめることができない。そこで、本研究ではベクターごとに注入量・注入速度の検討を行った。その結果、セプチン発現ベクターでは注入量を 0.5 µl、注入速度を 0.1 µl/min、セプチンノックダウンベクターでは注入量を 0.25 µl、注入速度を 0.05 µl/min とした際にウイルスベクターが海馬歯状回内にとどまることを見出した（図 1）。

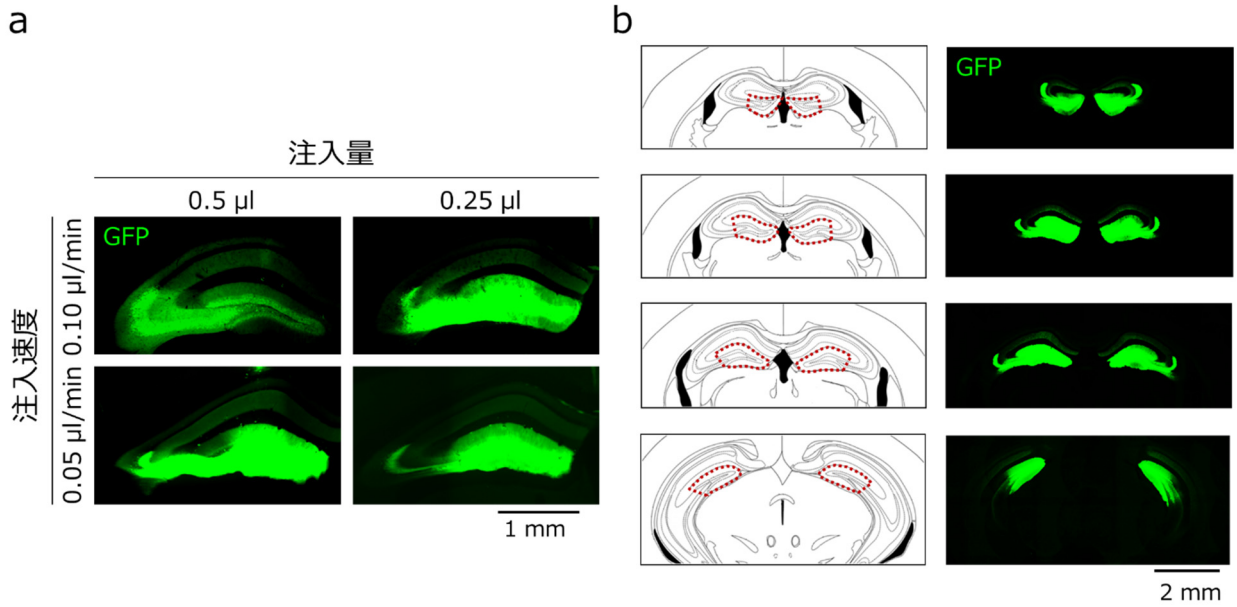


図 1. 脳定位手術を用いたウイルスベクター注入法の検討

a）セプチンノックダウンベクターにおける注入量・注入速度の検討結果。GFP を組み込んだセプチンノックダウンベクター（PGK-EGFP-shSEPT-H1 : shSEPT はセプチンを標的とする shRNA）を注入量を 0.5 µl または 0.25 µl、注入速度を 0.10 µl/min または 0.05 µl/min とした場合の GFP 発現領域を比較した。注入量を 0.25 µl、注入速度を 0.05 µl/min とした場合以外は海馬歯状回領域外での蛍光が見られ、ウイルスベクターが流出している。海馬歯状回から出ている線状の蛍光は海馬歯状回ニューロンが隣接する CA3 領域に投射している軸索を表している。b）マウスの脳切片のアトラス（左）およびウイルスベクター注入位置（右）。アトラスの赤点線は海馬歯状回の位置を表す。脳切片の断面位置は上から順に、Bregma 1.34 mm，1.70 mm，2.06 mm，2.80 mm。

2. セプチン欠損マウスの海馬歯状回セプチンレスキューにより空間弁別障害が回復する

海馬歯状回特異的なセプチン補填がセプチン欠損マウスの空間弁別障害の回復に十分であるかを検証するため、脳定位手術を用いてセプチン欠損マウスの海馬歯状回選択的にセプチン発現ベクターを注入し、空間弁別の評価を行った。まず内在性発現量と同程度のセプチンを発現させるため、セプチン発現ベクターの配列（CaMKII-セプチン-P2A-EGFP-polyA または CaMKII-セプチン-P2A-EGFP-WPRE-polyA ; P2A は翻訳後、自己切断してセプチンと GFP を分離する役割をもつ ; WPRE は mRNA 安定化配列）およびセプチン発現期間（1 週間または 4 週間）の最適な組み合わせを検討した。その結果、セプチン発現ベクターを CaMKII-セプチン-P2A-EGFP-polyA、セプチン発現期間を 4 週間とした場合のセプチンレスキュー効率は免疫組織染色法での比較を行った結果、約 1.26 倍（n＝3，3，p＝0.16）であり、検討した条件の中で最も内在性発現量に近いことがわかった。これらの条件で 19～25 週齢のセプチン欠損マウスの海馬歯状回にセプチンを発現させ、空間弁別試験を行ったところ、セプチンレスキュー群はセプチン欠損群（対照

ベクターとしてCaMKⅡ-EGFP-polyAを注入）と比べて有意に高成績だった（72±5.3% vs. 93±8.7%，$p<0.05$，$n=7$，7）。

3. 野生型マウスの歯状回セプチン欠乏は空間弁別障害を引き起こす

海馬歯状回のセプチンが空間弁別に必要であるかを検証するため、脳定位手術を用いて野生型マウスの海馬歯状回選択的にセプチン欠乏ベクターを注入し、空間弁別の評価を行った。脳定位手術を用いて野生型マウスの海馬歯状回選択的にセプチン欠乏ベクター（PGK-EGFP-shSEPT-H1; shSEPTはセプチンを標的とするshRNA）を注入し、4週間後に免疫組織染色によるセプチン発現量の評価を行ったところ、セプチン欠乏群は対照群（標的配列をスクランブルした対照ベクターを注入した野生型マウス）と比べて海馬歯状回のセプチン発現量が約0.65倍になっていることが示された（n＝3，3，　p＝0.019）。空間弁別試験の結果、セプチン欠乏群は対照群に比べて有意に試験成績が低かった（図2; 76±3.4% vs. 59±2.8%，$p<0.01$，n＝8，11）。この結果は、セプチンレスキューによる空間弁別障害の回復の結果と併せて、セプチン欠損マウスに見られる空間弁別障害の責任領域が海馬歯状回であることを示唆している。

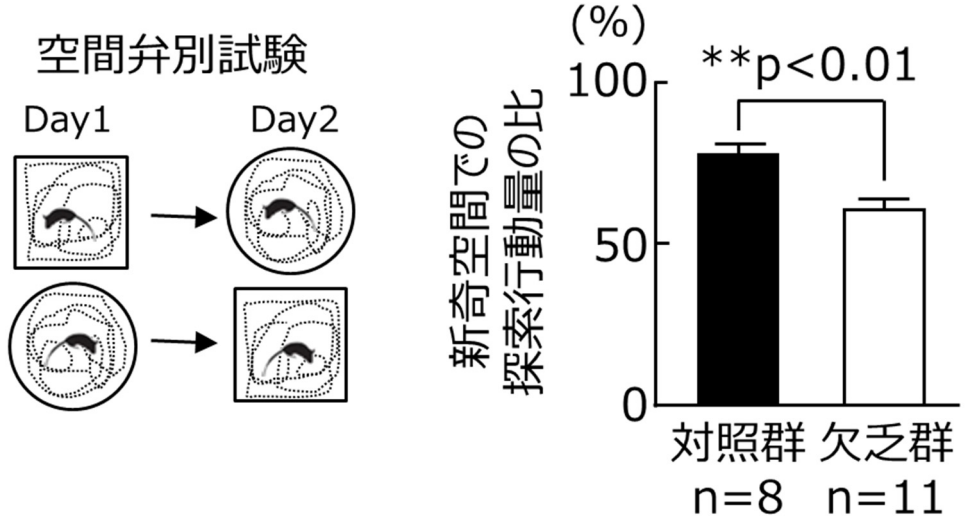


図2. セプチンを海馬歯状回選択的に枯渇したマウスの空間弁別試験結果
空間弁別試験の概要（左）。新奇空間での探索行動量の比（右）。新奇環境における探索行動量に群間有意差がないことはDay1（前半3分間）の移動距離において確認した（野生型対照群13±1.7 m vs.セプチン欠乏群13±0.9 m，$p=0.77$）。

本研究から、顆粒細胞が大多数を占める歯状回において特定のセプチンサブユニットが発現することが空間弁別に必要であることと、セプチン欠損マウスの空間弁別障害の正常化には歯状回に限局したセプチンの発現で十分であることが検証できた。併せて、セプチン欠損マウスの空間弁別障害が神経系発生・発達過程に起こる不可逆的な後遺障害ではなく、成熟後のセプチン補填で矯正可能であることも示された。成体においても例外的に分裂・増殖して神経回路に組み込まれる顆粒細胞の異常はヒトの認知・記憶障害、うつ病、PTSDなどとも関連する。顆粒細胞におけるセプチン機能の理解がこれらの現象の理解に寄与することを期待している。

共同研究者・謝辞

本研究は名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻細胞制御学グループで行った研究であり、教室主催者である木下専教授、技術支援員の大島智香さんをはじめ教室員の協力のもとで行いました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、AAV ウイルス作製の支援を頂きました共同研究者の東京大学大学院医学研究科神経生化学教室の尾藤晴彦教授、金亮特任助教、岡村道子様に厚く御礼申し上げます。最後に、多大な研究助成を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団ならびに関係者の皆様方に深く感謝申し上げます。

文 献

1) Sharma S, Quintana A, Findlay GM, Mettlen M, Baust B, Jain M, Nilsson R, Rao A, Hogan PG. An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca^{2+} entry. Nature. 2013 Jul 11;499(7457):238-42. Epub 2013 Jun 23. PMID: 23792561 DOI: 10.1038/nature12229.

2) Koch S, Acebron SP, Herbst J, Hatiboglu G, Niehrs C. Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation. Cell. 2015 Nov 19;163(5):1225-1236. PMID: 26590424 DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.029.

3) Kinoshita A, Kinoshita M, Akiyama H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kumar S, Noda M, Kimura J. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. Genes Dev. 1997 Jun 15;11(12):1535-47. PMID:9203580.

4) Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, Higashiyama T, Mazitschek R, Bito H, Kinoshita M. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. Nat Commun. 2015 Dec 10;6:10090. PMID: 26657011 DOI: 10.1038/ncomms3532.

5) Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K, Nishioka T, Kaibuchi K, Hattori S, Miyakawa T, Tanaka K, Huda F, Hirai H, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M. A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold facilitates glutamate clearance. Nat Commun. 2015 Dec 10;6:10090. PMID: 26657011 DOI: 10.1038/ncomms10090.

6) Ageta-Ishihara N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M. CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. Neurochem Int. 2018 Jan 9. pii: S0197-0186(17)30442-4. PMID: 29330091 DOI: 10.1016/j.neuint.2018.01.003.

7) Rolls ET. A theory of hippocampal function in memory. Hippocampus. 1996;6(6):601-20. PMID: 9034849

8) Gilbert PE, Kesner RP, Lee I. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. Hippocampus. 2001;11(6):626-36. PMID: 11811656

9) Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CE. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. Science. 2008 Mar 21;319(5870):1640-2. PMID: 18356518 DOI: 10.1126/science.1152882.

10) McHugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, Balthasar N, Coppari R, Elmquist JK, Lowell BB, Fanselow MS, Wilson MA, Tonegawa S. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. Science. 2007 Jul 6;317(5834):94-9. Epub 2007 Jun 7. PMID: 17556551