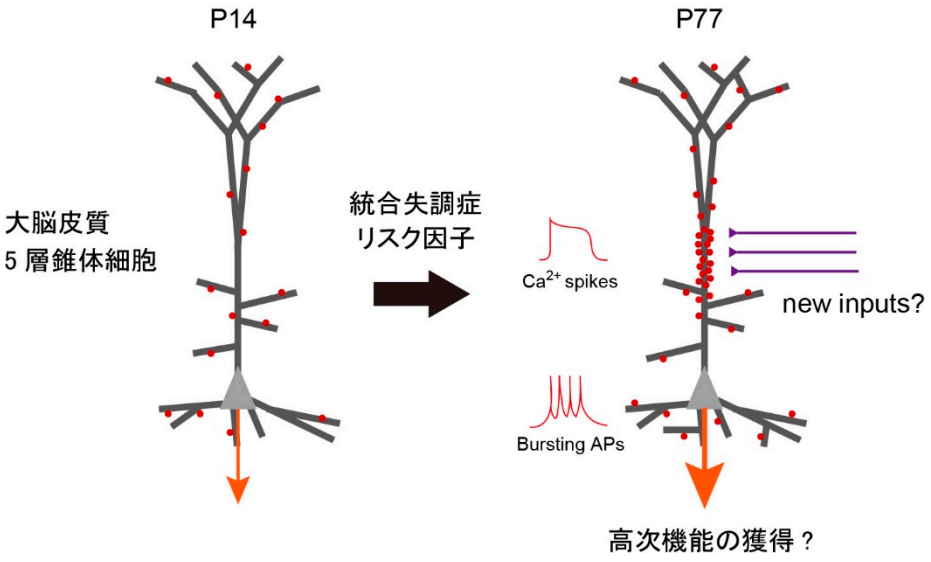
25　統合失調症モデルにおけるシナプス異常の包括的解析	今井　猛

【目的】統合失調症は人口の約 1%に発症することが知られているが、その原因については未だ不明な点が多く、根本的な治療法の開発には至っていない。統合失調症は思春期以降に発症することが良く知られており、思春期における神経回路の再編成と関連している可能性が指摘されてきた。従来、思春期には大脳皮質のシナプスが刈り込まれて減少すること、思春期におけるシナプスの過剰刈り込みが統合失調症の発症に関与していることが提唱されていた。しかしながら、我々が独自に開発した透明化法と超解像蛍光イメージングを駆使し、発達期における樹状突起スパインの大規模高精細解析を行ったところ、思春期にはむしろ 5 層ニューロンの尖端樹状突起において、スパインの密度が顕著に増加していることが見出された。そこで本研究では、複数のモデルマウスを用いることにより、思春期におけるスパイン形成の異常が統合失調症に関連している可能性について検討を行った。

【方法】統合失調症のモデルとして、Schnurri-2 ノックアウトマウス、DISC1 ドミナントネガティブ変異体発現ニューロン、時期特異的 NMDAR ノックアウトニューロンの解析を行った。SeeDB2 法による脳スライスの透明化を行い、超解像顕微鏡によって樹状突起の分布を解析した。

【結果】Schnurri-2 ノックアウトマウスおよび NMDAR 時期特異的ノックアウトニューロンにおいて、5 層ニューロンにおけるスパインの密度を解析したところ、尖端樹状突起においてのみスパインの密度上昇の障害が観察された。基底樹状突起や思春期前のニューロンではスパイン密度に異常は見られなかった。これらのことから、思春期における樹状突起部位特異的なスパイン形成が統合失調症の発症に関与している可能性が示唆された。今後、思春期特異的に形成されるスパインが樹状突起演算にどのような影響を与えるかを調べることで、統合失調症における大脳皮質機能の異常を明らかにすることができると期待される。

思春期における樹状突起スパインの発達と統合失調症に関する仮説



25. 統合失調症モデルにおけるシナプス異常の包括的解析

今井　猛

九州大学 大学院医学研究院 疾患情報研究分野

Key words：透明化，超解像イメージング，樹状突起スパイン，統合失調症，思春期

緒　言

ヒトの脳は1000億個もの神経細胞からなる複雑なネットワークである。個々の神経細胞は、多数の樹状突起を伸ばしており、樹状突起上に分布するに多数のシナプスから入力を受け取る。例えば、大脳皮質においては、1個の神経細胞に入力するシナプスの数は数万にも上る。しかしながら、こうしたシナプス入力はランダムに生じている訳ではない。最近の研究によると、樹状突起のコンパートメントごとに入力の局所統合が行われ、適切な重み付けがなされた上で演算・出力が行われると考えられている。個々の神経細胞における演算原理を理解するには、異なる軸索からの入力が樹状突起のどこにどのように分布しているのかを明らかにすることが重要である。究極的には、脳内のシナプス結合の全貌（コネクトーム）を明らかにすることが、脳機能の理解の基盤になると考えられている。

現在のところ、コネクトーム解析におけるゴールドスタンダードは電子顕微鏡である。シナプス間隙は20 nm程度しかなく、全ての神経細胞のシナプスを同定するにはnmスケールの分解能を必要とするからである。近年、3次元的に撮像可能な電子顕微鏡が登場したことで、この流れは加速している。しかしながら、現在の最新鋭の電子顕微鏡を用いても、1 mmスケールに及ぶマウスの大脳皮質の全層の結合を明らかにすることは容易ではない。コネクトーム解析のハイスループット化を実現するには、実験目的に応じて異なるアプローチをとることが重要であると考えられる。

我々は、光学顕微鏡を用いた神経回路解析を加速するため、10年ほど前から脳透明化技術の開発に取り組んできた。特に、2013年に発表したSeeDB法は、ほぼ同時期に発表されたScale法、CLARITY法などとともに、透明化イメージングのさきがけとなった［1］。我々は、光学顕微鏡を用いてシナプススケールの解析を実現するため、更に改良を進め、超解像顕微鏡に最適化したSeeDB2法も開発した［2］。この方法を用いると、GFP等の蛍光タンパク質で標識された神経細胞については、120～300 nm程の分解能で、しかも神経細胞の全体に亘って解析することが可能となった。電子顕微鏡の分解能には及ばないものの、興奮性シナプスが局在する樹状突起スパインの直径が数100 nmであることを考えると、標識された神経細胞に限っては、全てのシナプスを同定可能である。更に、シナプスマーカーを蛍光標識すれば、抑制性シナプスも容易に同定可能である。

こうした独自の手法を用いて、我々は大脳皮質の神経細胞におけるシナプス分布の全体像の解明に取り組んだ。大脳皮質の神経細胞の中でも、とりわけ5層ニューロンは、皮質からの出力を担う重要な神経細胞である。5層ニューロンは、水平方向に伸びる基底樹状突起（basal dendrite）と表層に伸びる尖端樹状突起（apical dendrite）の2種類の異なるタイプの樹状突起を有しているが、それらにどのようなシナプス入力の違いがあるかについては明らかになっていない。我々はシナプス分布の網羅的解析を行ったところ、基底樹状突起におけるスパインの分布は一様であるが、尖端樹状突起においてはスパインが極端に（10倍程度）集積している部位（ホットスポット）が存在することを見いだした（未発表データ）。ホットスポットは尖端樹状突起の中央部に位置しているが、この部位は、異なる樹状突起の枝からの入力を統合してスパイクを生じる部位であることが以前から知られており、シナプス入力の統合・演算において特別な意味を持つものと考えられる。

そこで我々は、さらにこうしたスパイン分布の偏りが発達過程でどのように生じるのかについて解析を行った。2週齢マウスにおいてはスパインはどの樹状突起でも一様に分布していたが、思春期以降では尖端樹状突起のホットスポットでのみスパインの集積が生じ、その結果偏ったスパイン分布が生じることが判明した（未発表データ）。従来、樹状

突起スパインは幼児期に急激に増えた後、思春期に減少するという考えが定説であったが［3]、我々の結果は、むしろ思春期に局所的にスパインが増えることが思春期の脳発達に重要である可能性を示している。このような局所的なスパインの集積は、大脳皮質の神経回路が徐々に発達し、高次認知機能が獲得されるプロセスに関与している可能性がある。興味深いのは、多くの精神疾患が思春期以降に発症するという点である。従来、思春期以降に発症する統合失調症の原因は、思春期におけるシナプスの過剰刈り込みが原因であるとされてきた［3]。しかしながら、我々はむしろ、思春期に特異的なシナプス形成の障害が精神疾患の発症に関与しているのではないか、と着想し、精神疾患のモデルマウスにおけるスパイン分布の包括的解析に着手した。

本研究においては、思春期以降に発症することが知られている統合失調症の様々なモデルマウスに着目し、思春期におけるホットスポットの形成不全が統合失調症に共通したエンドフェノタイプである、という可能性について検証を行った。この結果、統合失調症のモデルにおいてはいずれもホットスポット形成に障害が見られること、これが特に思春期以降に生じていることが判明した。これらの結果は統合失調症の発症機構に関する新たなメカニズムを示唆するものであり、今後、統合失調症の回路病態解明につながることが期待される。

方　法

1. マウス

本研究にかかる動物実験については、審査を受けた上で九州大学総長の承認を受けており、学内の動物実験規則に則って行った。野生型の実験については、C57BL/6N マウス（雄および雌）を使用した。L5 PT 細胞の標識にあたっては、Thy1-YFP-H ラインマウス（JAX #003782）を使用した。NMDAR の conditional KO には Floxed Grin1（JAX #005246）を使用した。Schnurri-2 KO マウスは、C57BL/6J バックグラウンドのヘテロ KO マウスと BALB/cA バックグラウンドのヘテロ KO マウスを掛け合わせることで得た。いずれも、同腹仔をコントロールとした。

2. ウイルスベクター

AAV は pAAV ベクターと pHelper ベクター、pRC ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションさせ、AAVproPurification Kit（Takara）を使用して精製した。タイターには SYBR Green による qPCR を用いた。DISC1 の操作にあたっては、AAV-DJ-hsyn1-iCre と AAV-DJ-FLEX-DISC1cc-P2A-mRuby3 を感染させることで、まばらに DISC1cc を発現させた。コントロール実験では AAV-DJ-hsyn1-Cre と AAV-DJ-FLEX-mRuby3 を用いた。Grin1 の時期特異的 KO にあたっては、AAV-DJ-hsyn1-iCre-P2A-mRuby3 を感染させた。ケタミン・キシラジン麻酔下、頭蓋骨に歯科用ドリルで穴を空け、$1\sim5\times10^{11}$ gc/mL のウイルス液を 200 nL 程度感染させた。

3. SeeDB2 による透明化と超解像イメージングを用いたスパインの定量解析

マウスは過剰量のペントバルビタールで麻酔し、4%パラホルムアルデヒド/PBS で潅流固定を行った。取り出した脳はアガロースに包埋したのち、ビブラトーム（堂阪 EM）で 220 μm 厚のスライスを作製した。これを SeeDB2G [2] で透明化し、封入した。共焦点顕微鏡 TCS SP8 および LIGHTNING ユニット（Leica Microsystems 社）を用いて蛍光イメージングを行った。対物レンズにはグリセリン浸レンズ（HC PL APO 63x GLYC CORR CS2、NA 1.3、WD 0.28 mm）を使用し、ピンホールサイズは 0.5 AU とした。取得した蛍光画像は Neurolucida（MBF Biosystems 社）を用いて再構成し、定量を行った。

結　果

1.　統合失調症モデルマウス Shn2 KO の解析

本研究においては、まず Schnurri-2（Shn2）ノックアウトマウス（KO）の解析を行った。先行研究において、様々な変異マウスを用いた行動実験スクリーニングにおいて、統合失調症様の顕著な行動異常を示す系統として同定されたものである［4]。具体的には、作業記憶の異常、聴覚性プレパルス抑制の異常、巣作り行動の異常、多動などが観察される。そこで、Shn2 ノックアウトマウスにおいて 5 層ニューロンにおけるスパイン密度の解析を行った。

P14 においては野生型と KO とでスパイン密度の差は見出されなかったが、成獣（P77）においては、特に尖端樹状突起において顕著な差が見出された（図 1）。基底樹状突起では有意な差は見出されなかった。従って、Shn2 KO マウスにおいては、思春期に尖端樹状突起においてスパインが集積する過程が特異的に障害されていることが示唆された。

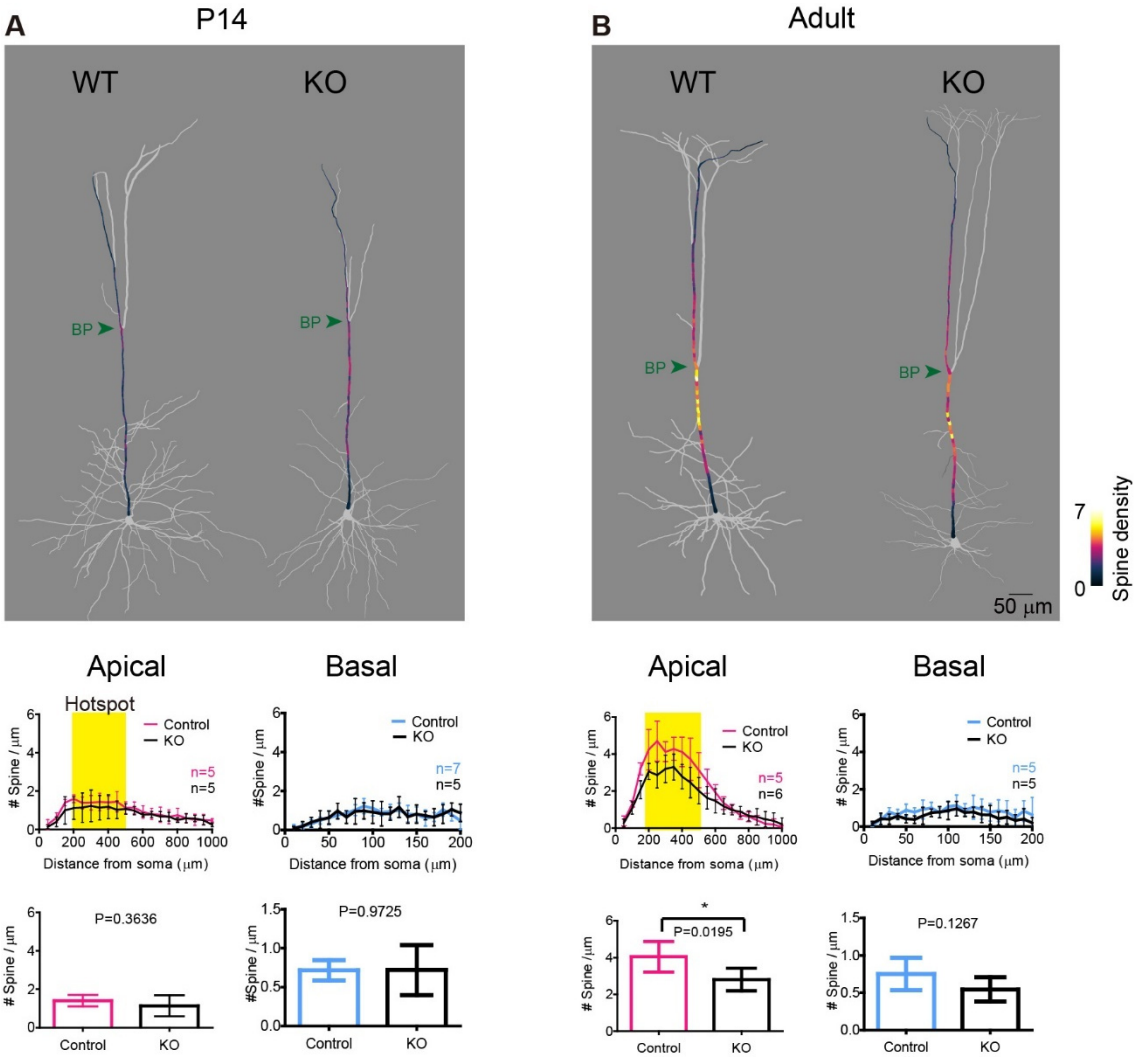


図 1. Shn2 KO の 5 層ニューロンにおけるスパイン密度の変化

いずれも Thy1-YFP-H マウスを用いて 5 層ニューロンを標識した。

A）P14 におけるスパイン密度分布。コントロールと差は見られない。

B）成獣（P77）におけるスパイン密度。基底樹状突起（basal）においては有意差が見られないが、尖端樹状突起（apical）のホットスポット領域（黄色で示す）においてより顕著な違いが観察される。

P 値は Student's t-test による。データは平均±標準偏差。

2. DISC1 ドミナントネガティブ変異体発現による影響の解析

そこで、他の統合失調症モデルマウスにおいても尖端樹状突起のホットスポットにおけるスパイン集積の異常が見られるか、検討を行った。先行研究において、ヒトの統合失調症家系で見出されたのと同じ DISC1 ドミナントネガティブ変異体（DISC1cc）を発現するマウスにおいて、統合失調症様の行動異常が観察されている［5］。そこで、DISC1cc を過剰発現させた 5 層ニューロンにおけるスパイン密度分布の解析を行った。ここでは、AAV-DJ-hsyn1-iCre と AAV-

DJ-FLEX-DISC1cc-P2A-mRuby3 を大脳皮質体性感覚野に感染させ、まばらに DISC1cc を発現させた。EYFP と mRuby3 を両方発現する 5 層ニューロンに着目し、スパイン密度の解析を行った。ここでは、尖端樹状突起と基底樹状突起の両方でスパイン密度の減少が観察されたが、その減少率は尖端樹状突起においてより顕著であった（data not shown）。DISC1cc は CAG プロモーターを用いて大過剰に発現させていたため、基底樹状突起におけるスパイン密度減少はその影響である可能性がある。今後、発現量を押さえることで、尖端樹状突起への影響の特異性がより顕著になる可能性を検討する予定である。

3. NMDAR の時期特異的ノックアウトの解析

次に、NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDAR）の関与について、検討した。古くから、統合失調症には NMDAR が関与しているという仮説がある[6]。まずはじめに、NMDAR の必須サブユニット NR1 をコードする *Grin1* の floxed マウスを用いて、子宮内エレクトロポレーション法を用いて胎児期から一部の 5 層ニューロンで NMDAR をコンディショナル KO する実験を行った。その結果、思春期以降のスパイン密度増加が抑えられることが確認されたが、同時に、生後発達期における樹状突起発達も損なわれていることが判明した（図 2）。そこで、思春期以降に特異的に NMDAR をノックアウトした場合により 5 層ニューロンの尖端樹状突起特異的な異常が観察されるかについて、検討を行った。

具体的には、floxed *Grin1* マウスを用いて、2 週齢で体性感覚野に AAV-hsyn1-iCre-P2A-mRuby3 を感染させた。スパイン密度は 11 週齢で観察した。その結果、5 層ニューロンにおいて、尖端樹状突起において特異的にスパイン密度の減少が観察された。基底樹状突起では有意な変化は見出されなかった。

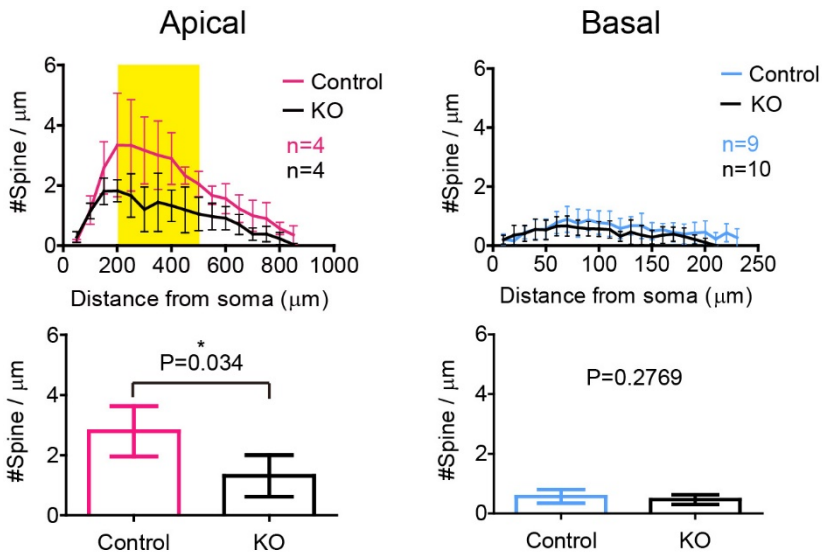


図 2. NMDAR コンディショナル KO 5 層ニューロンにおけるスパイン密度の変化

いずれも *Grin1 fl/fl; Thy1-YFP-H* マウスを用いて 5 層ニューロンを観察した。P14 で AAV-hsyn1-iCre-P2A-mRuby3 もしくはコントロールとして AAV-hsyn1-mRuby3 を感染させ、成獣（P77）において解析した。基底樹状突起（basal）ではスパイン密度に有意な差が見られないが、尖端樹状突起のホットスポット付近（黄色で示す）では有意な減少が見られる。P 値は Student's t-test による。データは平均±標準偏差。

考　察

本研究においては、Shn2 KO マウス、DISC1cc 発現ニューロン、NMDAR KO ニューロンにおけるスパイン密度変化について、透明化超解像解析によって行った。その結果、Shn2 KO および NMDAR KO においては、基底樹状突起では大きな変化が見られない一方で、尖端樹状突起のホットスポットではスパイン密度の顕著な減少が観察された。更に興味深いことに、Shn2 KO では、2 週齢では野生型と差が見られない一方、成獣で顕著な差が見出された。これら

の結果は、統合失調症の症状が思春期以降になって初めて表出することとも符合する。これらのことから、5 層ニューロンのホットスポット形成が大脳皮質神経回路の成熟過程に関わっており、その異常が統合失調症と関わっている可能性を示唆している。今後、5 層ニューロンのホットスポット形成を特異的に阻害し、樹状突起演算にどのような影響が生じるのか、行動レベルで統合失調症様の異常が見られるのか、などについて更なる解析を行う予定である。また、ホットスポットにどのような入力が入っているのかを同定することも今後の課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学当教室の江頭諒大学院生、藤田医科大学の宮川剛教授、理化学研究所の石井俊輔博士、鹿児島大学の田川義晃教授、玉川直助教である。

文　献

1) Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. Nat Neurosci. 2013 Aug;16(8):1154-61. doi: 10.1038/nn.3447. Epub 2013 Jun 23. PMID: 23792946.

2) Ke MT, Nakai Y, Fujimoto S, Takayama R, Yoshida S, Kitajima TS, Sato M, Imai T. Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. Cell Rep. 2016 Mar 22;14(11):2718-32. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.057. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26972009.

3) Forrest MP, Parnell E, Penzes P. Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. Nat Rev Neurosci. 2018 Mar 16;19(4):215-234. doi: 10.1038/nrn.2018.16. PMID: 29545546; PMCID: PMC6442683.

4) Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Toyama K, Nakamura HK, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, Yamaguchi S, Furuya S, Takagi T, Walton NM, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Suhara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S, Miyakawa T. Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. Neuropsychopharmacology. 2013 Jul;38(8):1409-25. doi: 10.1038/npp.2013.38. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23389689; PMCID: PMC3682135.

5) Hikida T, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Oishi K, Hookway C, Kong S, Wu D, Xue R, Andradé M, Tankou S, Mori S, Gallagher M, Ishizuka K, Pletnikov M, Kida S, Sawa A. Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 4;104(36):14501-6. doi: 10.1073/pnas.0704774104. Epub 2007 Aug 3. PMID: 17675407; PMCID: PMC1964873.

6) Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. Cell. 1999 Aug 20;98(4):427-36. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81972-8. PMID: 10481908.