

論文の内容の要旨

論文題目 海馬シナプスの経験依存的形態変化の解析

氏名 北西 卓磨

【序論】

樹状突起スパインは、神経細胞の樹状突起に形成される微細な棘状構造である。スパインの多くは、軸索との間で興奮性シナプスを形成するシナプス後部構造である。物理的サイズが大きなスパインはより多くの AMPA 型グルタミン酸受容体を発現すること、シナプス入力によりスパインのサイズや数が双方向に制御されること等が報告されている。そのため、スパインの形態はシナプスの機能を評価する良い指標となるとともに、スパインの形態変化が神経回路上における情報の獲得を担うという仮説が提唱されている。

では個体動物においては、新奇な経験等により、スパインの変化として捉えられる神経回路の再構築は誘発されるのだろうか？既存のいくつかの研究は経験依存的に生じるスパイン数の変化を報告している。しかし、これらはみな多数回に渡る反復刺激によって長期間（24 時間～数ヶ月）の後に観察される変化を報告するに留まっている。そのため、短時間の生理的な経験がいかなるスパインの形態変化を誘発するかは不透明である。そこで私は、新奇経験の最中に急速に生じる形態変化の可能性を追究することを目的とし、新たな実験系を導入して研究を行った。

【本論】

1. 新奇環境提示によるスパイン数の急速な変化

経験依存的に生じる神経活動が、同じ脳領域でも細胞毎に異なる可能性が近年注目されてい

る。特定の神経活動を生じた細胞群において選択的にスパインの変化が生じる可能性を考え、スパイン形態と同時に神経活動の履歴を捉える手法を考案した。Thy1-mGFP マウスにおいて Arc の免疫染色を行う実験系である (図 1)。Thy1-mGFP マウスは Thy1 プロモーターの制御により少数の神経細胞にのみ細胞膜移行性緑色蛍光タンパク質 mGFP を発現する。そのため、個々の細胞の形態を、隣接した他の細胞等と入り混じることなく明瞭に可視化することが可能となる。Arc (activity-regulated cytoskeletal-associated protein, Arg3.1) は最初期遺伝子の一種であり、強い神経活動により一過的に発現する。両手法の組み合わせにより、経験依存的神経活動を反映して Arc を発現した細胞と、その他の Arc 非発現細胞のスパイン形態を、同一個体において比較解析することが可能となった。

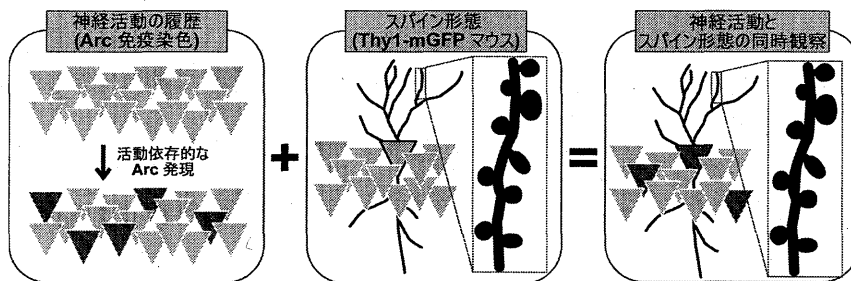


図 1. 実験パラダイム
Arc の発現と mGFP による細胞形態の可視化を組み合わせ、神経活動を生じた細胞におけるスパイン形態を解析した。

まず、Thy1-mGFP マウスに緩和な新奇経験を与えるため、15 分間 (N15 群) または 60 分間 (N60 群) にわたり新奇環境に提示し、自由に探索行動を行わせた。この環境提示により海馬 CA1 野神経細胞の 25% に Arc の発現が認められた。

続いて、新奇環境提示がシナプスに与える影響を解析するため、錐体細胞の基底樹状突起のスパインについて検討した (図 2B, C)。環境提示を行わなかった HC 群と、N15 および N60 群の比較において、群間に有意なスパイン密度の差は認められなかった。ところが、Arc の発現を活動履歴の指標と考え、N60 群において Arc(-) 細胞と Arc(+) 細胞を分けて別々に解析すると、Arc(+) 細胞のスパイン密度は Arc(-) 細胞のスパイン密度を下回ることを見出した (図 3D)。この Arc(-)、Arc(+) 細胞間でのスパイン密度の差は、環境への提示時間を短縮した N15 群では認められなかった (図 3A)。したがって、N60 群におけるスパイン密度の差は、環境提示中にスパイン

数が変化したために生じたと考えられる。以上の結果は、Arc の発現により分類された細胞集団において選択的に、かつ、急速 (60 分以内) にスパイン数の変化が生じたことを示唆する。

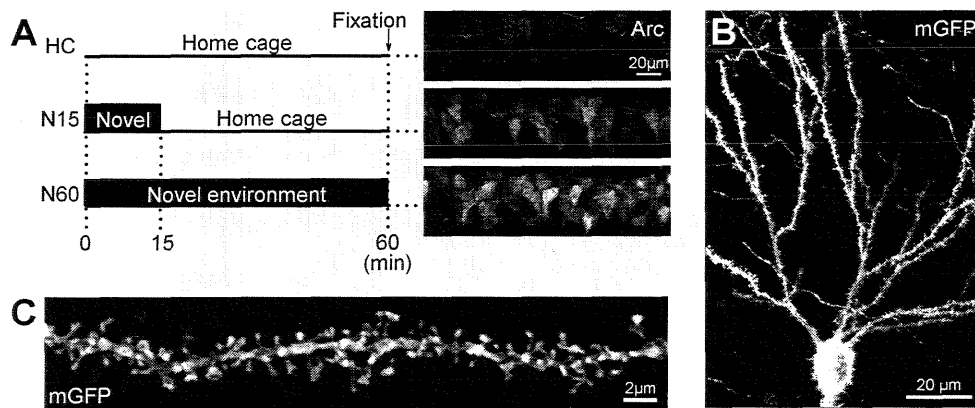


図 2. 新奇環境提示後の Arc 発現およびスパイン形態の観察 (A) 環境提示のタイムコースと、提示後の CA1 野錐体細胞層における Arc 免疫染色像。(B) 細胞膜移行性 GFP (mGFP) により観察した錐体細胞の形態。(C) 基底樹状突起上に多数存在するスパイン。

2. 小さなスパインの変化

スパインは形態的多様性に富んだ構造であり、大きささまざまなスパインが存在する。スパインのサイズは AMPA 型グルタミン酸受容体の発現量と正の相関を持ち、シナプス個々の機能の評価において重要である。そこで、サイズ別にスパイン密度の解析を行った。その結果、上述の N60 群におけるスパイン密度の差は、主に頭部直径が $0.5 \mu\text{m}$ 以下の小さなスパインの密度の差によることが明らかとなった。すなわち、Arc(+) 細胞は小さなスパインの密度のみが選択的に Arc(-) 細胞のスパイン密度を下回った (図 3E)。一方で、N15 群ではサイズの分布に差は認められなかった (図 3B)。

3. 大きなスパインの変化

N60 群では小さなスパインだけでなく、大きなスパインにも変化を生じたことが明らかとなった。N60 群の Arc(-), (+) 細胞、および HC 群の Arc(-) 細胞の 3 群の全解析スパインをプールし、サイズの上位 5% に含まれる大きなスパインがどの群に属するか解析した。その結果、大きなスパ

インの内、Arc(+) 細胞のスパインが均等な分布 (33%) を大きく超えて全体の 46% を占めた (図 3F)。N15 群では、各群の分布は 33% に近い値を示した (図 3C)。また、スパインサイズの順位をシャッフルしたサロゲートデータから、N60 群における分布の偏りは統計的に有意であることが示された。これらの結果は、大きなスパインの分布が N60 群の Arc(+) 細胞に偏ったことを示している。すなわち、N60 群の Arc(+) 細胞上の一部のスパインが肥大した、または、新たに大きなスパインが誕生したことを示唆する。

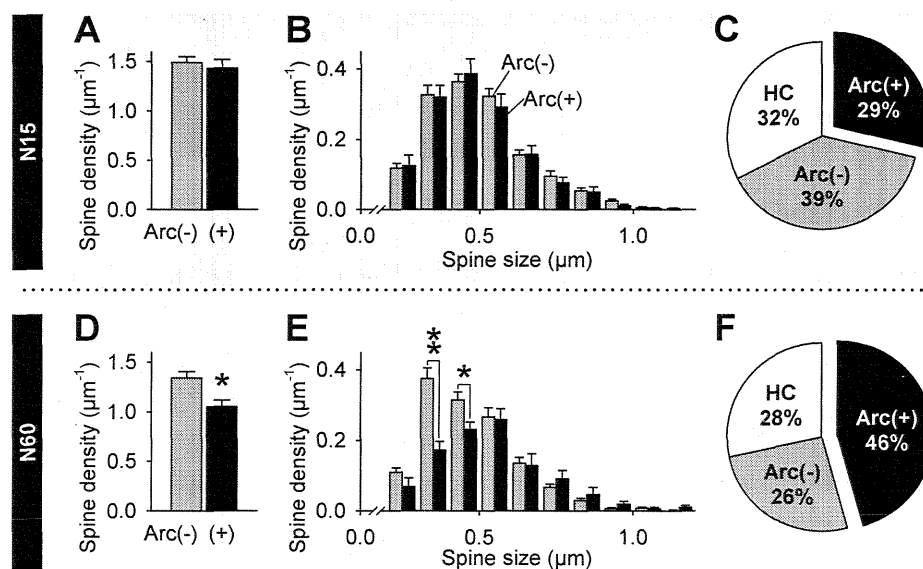


図 3. 新奇環境提示がスパイン形態に与える影響 (A, D) スパイン密度。* $p < 0.05$, Student's *t*-test. (B, E) スパインサイズの分布。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's *t*-test after repeated-measures 2-way ANOVA. (C, F) 上位 5% の大きなスパインの分布。各群に均等に分布すると 33% となる。 $p < 0.05$ in (F).

4. 環境の繰り返し環境提示によるスパインの形態変化

特定の環境に複数回提示すると、スパイン形態にはいかなる変化を生じるだろうか。1日1回60分間、6日間に渡り環境提示 (N60x6 群) を行った後の、スパイン形態について検討した。6日目の環境提示の直後でも、単回の環境提示 (N60 群) の場合と類似した割合・空間パターンの Arc 発現が認められた。まず、HC 群と N60x6 群全体のスパイン形態を比較したところ、スパイン形態に変化は認められなかった。したがって、たとえ 6 回環境提示を繰り返しても、CA1 野の細胞集団全般としては、スパインの形態に顕著な変化は生じないことが示唆された。

ところが、N60x6 群の細胞を Arc 発現の有無によって分離して解析すると、Arc(+) 細胞は Arc(-) 細胞とは異なるスパイン密度・形態を持つことが明らかとなった。すなわち、Arc(+) 細胞において、小さなスパインが顕著に減少していた。この結果は、単回の環境提示 (N60 群) の場合と定性的に類似であった。一方で、大きなスパインについては、単回の場合とは異なり、差は認められなかった。

5. 環境の繰り返し環境提示によるスパインの形態変化

繰り返し環境提示により生じたスパイン形態の変化が、その後、どれほどの期間維持されるかを検討した。6 日目の環境提示の後、1 時間 (N60x6+1h 群) または 48 時間 (N60x6+48h 群)、マウスをホームケージに戻した後に、スパインを検鏡・定量した。N60x6+1h (or 48h) 両群において CA1 野における Arc 発現の程度および頻度は N60x6 群と類似であった。次いで、スパイン密度および形態を定量したところ、両群いずれにおいても Arc(-)、Arc(+) 細胞間に顕著な形態の差は認められなかった。すなわち、N60x6 群において生じていたスパイン形態の変化は、1 時間以内に消失したことが示唆された。

【総括】

私は本研究において、既存のどの報告よりも急速で (<60 分)、一過的な (<60 分)、経験依存的なスパインの形態変化を見出した。この変化は、Arc の発現により分類された細胞集団に選択的であった。神経活動の多様性を考慮して細胞を別々に解析することで、初めて、一部の細胞で生じる速い変化を捉えることに成功したものと考えられる。また、動物経験により異なったスパイン形態変化の様式を示したことから、経験に対応した情報がスパインの形態変化として表象される可能性が示唆された。今後、本研究が見出した新しい型式のスパインの形態変化について、その機能とメカニズム、とりわけ記憶・学習との関係について追究したい。