

論文の内容の要旨

論文題目 *In vivo* brain imaging for synapse remodeling in developing mouse cortex
and its application to the analysis of autism model mice
(発達期大脳皮質シナプスリモデリングの *in vivo* 観察と
自閉症モデルマウスへの応用)

氏名 一色 真明

脳が高次機能を獲得するためには適切な神経回路網の形成が重要である。哺乳類の生後発達過程において、分化した神経細胞は軸索を伸展させ、標的となる神経細胞とシナプスを形成し始める。そして、その後のシナプスの柔軟なつなぎ替えが学習や認知機能に重要となる。従って、生体内のシナプス結合の挙動を計測することは脳の発達や機能的成熟あるいは機能異常を理解するための重要な研究課題である。近年、二光子励起顕微鏡により生きたマウスの大脳皮質内の樹状突起スパインを観察することが可能となった。こうした研究によって成熟マウスのスパインは数か月にわたり非常に安定であることが示された。また、最近では学習や感覚処理を加えることでこのスパイン動態が亢進することが報告され、神経接続の変化と認知機能の変化が強く関連していることが示された。しかし、大部分のスパインが安定であるというこうした報告は、これまでの培養系で調べられてきた速いシナプス動態とは合致しない。この点について、*in vitro* のシナプス動態は *in vivo* のシナプス発達初期の状態を反映している可能性が考えられる。実際に齧歯類の新皮質では生後 6 日から 21 日にかけて約 7 倍もシナプス数が増加することが知られている。そこで、本論文前半部では生後発達期のシナプス動態を二光子励起顕微鏡を用いて計測し、上記可能性の検討を行った。従来の大部分の *in vivo* 観察では樹状突起スパインが構造的なシナプスの指標として用いられてきたが、未成熟な神経細胞ではシナプスを持たない突起構造も見られ

ている。そこで本研究ではより正確にシナプスの挙動を測定するために、シナプス後部に特徴的な分子に蛍光タンパク質を付加し、これをシナプスの指標とした。まず興奮性シナプス後部に特徴的な分子である PSD-95 を指標として、生後 2, 3, 8 週齢マウスの大脳皮質 2/3 層錐体細胞上のシナプス動態を計測した。その結果、生後発達初期は活発に PSD-95 を持つスパインの形成と除去が繰り返されており、成熟した個体では既報通りシナプスは安定に存在していた。また、発達期のシナプス数の増加は活発に生じるシナプスの形成と除去のバランスで制御されていることが示された。従って、これまでの *in vitro* の結果と合致してシナプス数の増加する発達期ではシナプス動態が亢進しており、個体が成熟するにしたがってシナプス動態は安定することが分かった。更に、別のシナプス後部マーカーとして *gephyrin* を用いてスパインを分類したところ、視床からの入力と受ける 2/3 層錐体細胞のスパインは大きく安定で、皮質からの入力を受けるスパインとは動態が異なることが示された。

本論文後半部ではさらに、上記の観察手法を用いて発達障害の一種である自閉症の病態解析を行った。自閉症スペクトラム障害(ASD)は神経の発達や接続と密接な関係があると考えられている。ASD は発達初期に発症し、ヒトでは 3 歳までに診断が下される。神経病理学的研究では ASD 患者の脳構造には僅かな変化しかなく、神経変性もほとんど見られていない。こうした状況から、ASD の病態はシナプスの形成や接続性、神経回路の安定性などの異常による可能性が指摘されている。また近年の遺伝学的研究や遺伝子改変マウスを用いた研究からもシナプス発達に関わる分子の異常やシナプス機能の障害と ASD との関連が示唆されている。しかし、生後発達期での脳内のシナプスの形成や改変についてほとんど知られていない。ASD は生後発達期に発症することから、発達期にシナプスの形成や動態の異常を検出することは ASD 発症時の神経回路レベルでの異常を抽出する上で重要となる。そこで本研究では前半部で行った発達期大脳皮質の *in vivo* シナプス観察を自閉症モデルマウスに適応し、モデルマウスの発達期のシナプス動態を計測した。本研究では ASD 患者の

大部分を占める非症候性自閉症のモデルとして PatDp/+マウスと Neuroligin-3 R451C マウス、BTBR マウスという 3 種類のモデルマウスを用いた。この 3 種類のモデルマウスに共通して変異型マウスでは野生型に比べ、発達期での PSD-95 を含むスパインの動態が有意に亢進していた。更に、こうしたスパイン動態の亢進は視床から入力を受けるスパインでは見られなかった。

以上の結果は、個体内のシナプス動態が活発な発達期とシナプスが安定化した成熟期の 2 期に分けられる事を示している。本研究ではシナプス後部分分子 PSD-95 を指標とする事により正確にシナプスの動的な形成と除去バランスが発達期のシナプス増加に寄与していることが明らかとなった。自閉症モデルマウスではこの形成と除去のバランスは変わらないまま、形成・除去が共に亢進している異常が複数の異なるモデルマウスに共通して見られた。この結果は興奮性シナプス動態の亢進が ASD に共通する病態である事を示唆している。また、gephyrin を指標とする事で皮質から投射を受ける特定のスパインの動態に異常が見られた。こうした異常は ASD でみられる皮質内接続の異常が発達期から生じていることを示唆していると考えられる。こうした異常が自閉症発症時の重要な要素であり、今後の治療介入の標的となるかもしれない。本研究は今後の発達期の神経回路形成機構と自閉症の発症機構の更なる解明につながる知見を与えると考えられる。