

シナプス刈り込みに関わる遺伝子の新たなスクリーニング系を開発 ～発達障害や精神疾患に関わる遺伝子の網羅的な評価などに幅広く応用可能～

1. 発表者：^{かのう}狩野 ^{まさのぶ}方伸（東京大学大学院医学系研究科神経生理学分野 教授）

2. 発表のポイント

- ◆成果：発達期の脳における、必要な神経結合（シナプス）の強化と不要な神経結合の除去（シナプス刈り込み）に関わる遺伝子を効率よくスクリーニングできる新しい培養標本を開発した。
- ◆新規性：これまで、シナプス刈り込みの研究には、遺伝子改変動物や動物の脳内への薬物投与などの方法が使われていたが、これらの方法には長い時間と多くの手間がかかっていた。今回開発した培養標本により、シナプス刈り込みに関わる遺伝子を、格段に早く調べることが可能になった。
- ◆社会的意義：シナプス刈り込みは、発達障害や精神疾患に関連していると考えられており、これらの障害に関連する遺伝子のスクリーニングによる病因の解明や、これらの障害に対する新薬開発の過程に応用されることが期待される。

3. 発表概要：

社会性障害をきたす代表的な疾患である統合失調症や自閉症には神経回路発達の異常が関わりとされている。特に、生後間もない動物の脳の過剰な神経結合（シナプス）のうち、必要な結合を強めて不要な結合を除去する「シナプス刈り込み」の異常が、それらの疾患に関係すると考えられている。シナプス刈り込みの異常を分子レベルで理解するためには、関与する遺伝子を網羅的に調査する必要があるが、これまで、シナプス刈り込みの研究には、遺伝子改変動物や動物の脳内への薬物投与などの方法が使われており、長い時間と多くの手間がかかっていた。

今回、東京大学大学院医学系研究科の狩野方伸教授らは、小脳のシナプス刈り込みに関わる遺伝子を迅速に評価できる培養(注1)標本の開発に成功した。さらに彼らは、この標本を用いて *neuroligin-2* という遺伝子がシナプス刈り込みに関わることを突きとめた。

近年、全ゲノム解析などの技術革新により、統合失調症や自閉症などの社会性障害を引き起こす可能性のある遺伝子が他にも多数報告されている。今回開発された培養標本は、薬物投与や遺伝子操作(注2)が容易に行えるため、障害に関わる遺伝子の網羅的なスクリーニングや新薬候補の効果を試す際の網羅的なスクリーニングなど、幅広く応用可能である。

本研究は文部科学省脳科学研究戦略推進プログラムの一環として、また科学研究費補助金の助成を受けて行われた。

4. 発表内容：

①研究の背景・先行研究における問題点

生後間もない動物の脳には過剰な神経結合（シナプス）が存在するが、生後の発達過程において、必要な結合だけが強められ、不要な結合は除去されて、成熟した機能的な神経回路が

完成する。この過程は「シナプス刈り込み」と呼ばれており、生後発達期の神経回路に見られる普遍的な現象であると考えられている。統合失調症や自閉症では、発達期のシナプス刈り込みの過程がうまくいかないのではないかと考えられている。

これまでの研究により、シナプス刈り込みに関わるいくつかの遺伝子が同定されてきた。しかし、これらの遺伝子だけでは、シナプス刈り込みを分子レベルで理解できたとは到底言えない。これまで、関与する遺伝子を同定するために、動物の脳内に薬物を投与する、遺伝子組み換え動物を用いるといった方法がとられてきたが、これらの方法は一つの分子を同定するだけでもかなりの時間と手間を要する。また、これらの方法では任意の期間あるいは任意の組織・細胞で遺伝子の発現や機能を操作することは極めて難しく、因果関係が明確になりにくい。今回の研究では、これらの問題点を回避できるシナプス刈り込みを再現した培養標本を開発し、この標本で薬の投与や遺伝子操作が容易に行えることを証明した。

②研究内容（具体的な手法など詳細）

脳において、シナプス刈り込みを定量的に評価するのは極めて困難であるが、脳幹から小脳へ興奮性の信号を送る登上線維（注3）と小脳のプルキンエ細胞（注4）の間のシナプス結合は、そのような定量的解析が可能な数少ない実験系であり、本研究ではその生後の変化を対象にした。生まれたばかりの動物のプルキンエ細胞では、5本以上の弱い信号を伝える登上線維がプルキンエ細胞の根元に相当する細胞体にシナプスを形成しているが、おとなの動物ではわずか一本の強力な信号を伝える登上線維が、細胞体から大木の枝のように張り出した樹状突起にシナプスを形成している。これは、まず生後7日までに、細胞体にシナプスを形成していた複数の登上線維のうち1本だけが強くなり（機能分化）、強くなった登上線維は、プルキンエ細胞の樹状突起に侵入してシナプスを作る（樹状突起移行）。一方で、弱い登上線維のシナプスはプルキンエ細胞の細胞体に残されるが、この不要な登上線維シナプスは、生後16日頃までの間に除去され（前期・後期除去過程）、結果として、1本の登上線維に由来するシナプスがプルキンエ細胞の樹状突起に残る。

研究グループは、小脳の登上線維とプルキンエ細胞の間のシナプスを培養下で再構築するために、胎生期のラットの脳幹と生後のラット（もしくはマウス）の小脳を脳から取り出し、これら2つの組織を接触させて、培養皿の上で培養した（添付資料参照）。すると、脳幹から登上線維が伸びて小脳へ侵入し、プルキンエ細胞とシナプスを作った（添付資料参照）。形成されたシナプスが刈り込まれるのか調べるために、個々のプルキンエ細胞から電流を記録し、登上線維を1本ずつ別々に電気刺激して引き起こされる電流応答（シナプス電流）を個々のプルキンエ細胞から記録することによって、プルキンエ細胞にどの程度の強さの登上線維が、何本結合しているかを調べた。その結果、培養下で形成されたシナプスは生体内と同様なプロセスを経て刈り込まれることがわかった。次に、これまで生体内でシナプス刈り込みに関わることが知られている遺伝子やその遺伝子から作られる蛋白質が、培養下のシナプス刈り込みにも関わるかを調べるために、それらの蛋白質の働きを抑える薬を投与するか、あるいはそれらの蛋白質の量を減少させる操作を行い、こうした蛋白質がシナプス刈り込みに影響を与えるかを解析した。その結果、薬の投与や蛋白質の量の減少により、シナプス刈り込みがおこらなくなった。このことより、培養下で起こるシナプス刈り込みに、生体内のシナプス刈り込みと同じ遺伝子やタンパク質が関与していることがわかった。さらに、この標本を用い、シナプス刈り込みに関わる新しい遺伝子を探した。neurologin-2というプルキンエ細胞に多く存在してい

る蛋白質の量を減少させたところ、シナプス刈り込みがおこらなくなることが明らかとなった。すなわち、neuroligin-2 は、シナプス刈り込みを促進させる遺伝子であると考えられる。

③社会的意義・今後の予定 など

近年、全ゲノム解析などの技術革新により、統合失調症や自閉症などの社会性障害を引き起こす候補遺伝子が報告されるようになってきた。今回開発した培養標本を用い、遺伝学的に疾患と関連する可能性が示されている多くの遺伝子の機能を調べることで、社会性の発達に重要な遺伝子や社会性障害の病態が解明され、さらに社会性障害の診断に有用なマーカーや治療薬の開発などに応用されることが期待される。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Journal of Neuroscience」(2012年8月22日号 掲載予定)

論文タイトル：

Organotypic coculture preparation for the study of developmental synapse elimination in mammalian brain

著者：Naofumi Uesaka, Takayasu Mikuni, Kouichi Hashimoto, Hirokazu Hirai, Kenji Sakimura and Masanobu Kano

6. 問い合わせ先： 東京大学 大学院医学系研究科 神経生理学分野

狩野 方伸 (かのう まさのぶ) 教授

Tel：03-5841-3538 Fax：03-5802-3315

Email：mkano-tky@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

(注1) 培養：細胞や組織を生体内と近い人工的な環境で維持あるいは育てること。

(注2) 遺伝子操作：遺伝子を人為的に組み替えたり、それを細胞に導入したりして細胞の状態を操作すること。

(注3) 登上線維：脳幹の延髄にある神経核（下オリーブ核）にある神経細胞の軸索で、小脳皮質のプルキンエ細胞の樹状突起に直接シナプス結合して、情報を伝える。グルタミン酸が神経伝達物質として放出される。

(注4) プルキンエ細胞：小脳皮質に存在する大型の神経細胞で、小脳皮質の信号を、小脳核を介して大脳、脳幹、脊髄に送り、円滑な運動を行うために重要な働きをしている。

8. 添付資料：

