

図1 ニワトリ後根神経節細胞におけるCM-Dilにより標識された軸索内移動(輸送)粒子。図中、矢頭の標識粒子は移動していない。矢印で示す粒子は移動しているのがわかる(発表論文より転載)。

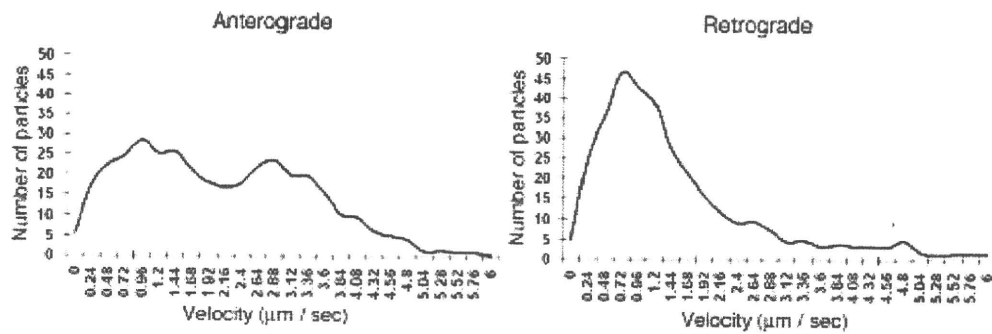


図2 順行性軸索輸送(Anterograde)および逆行性軸索輸送(Retrograde)の移動粒子のヒストグラム。縦軸、粒子数;横軸、粒子速度。順行性輸送における粒子の移動速度が二峰性を示すのに対し、逆行性輸送においては単峰性を示している。

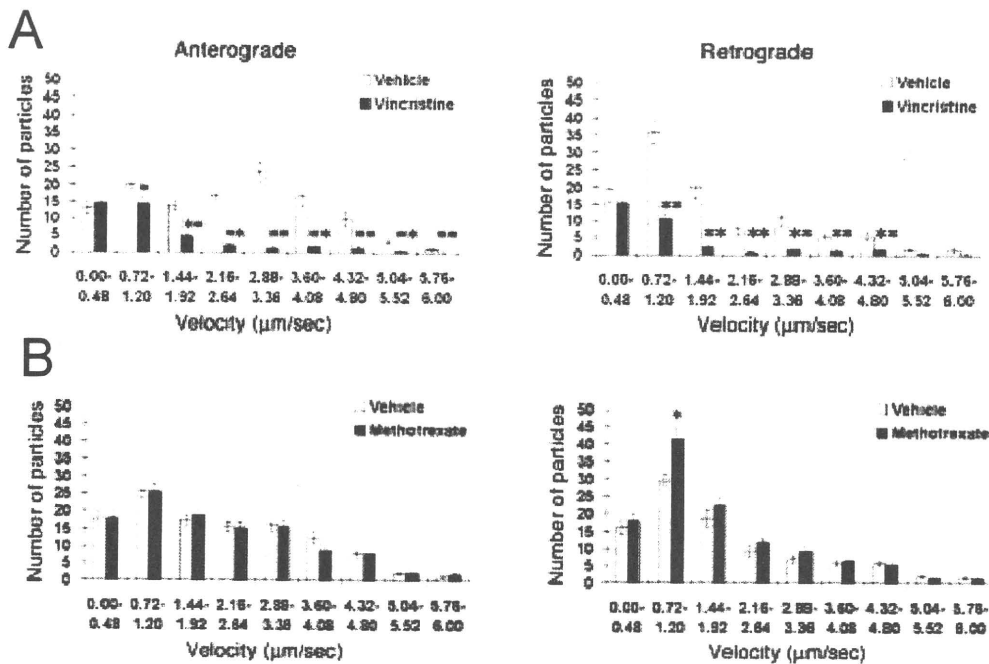


図3 ビンクリスチン(A)およびメトトレキサート(B)の軸索輸送に対する効果(発表論文より転載) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 対照と比較(Mann-Whitney's U -test).

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業）
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」
平成 22 年度分担研究報告

－中枢神経シナプス機能の *in vitro* 分化レベル評価系の構築－

研究分担者：白尾 智明（群馬大学 教授）

研究要旨：脳機能の細胞生物学的基盤は神経回路網であり、その接合点であるシナプスの機能の分化異常は種々の脳機能異常をもたらすことが知られている。本研究では、アクチン結合蛋白ドレブリンのスパイン集積度に着目して、中枢神経シナプス機能の *in vitro* 分化レベルを免疫染色により簡便に評価する系の確立をめざし、バンカー法により作成した初代海馬培養細胞を用いて、免疫染色法により、複数のシナプス機能蛋白の有用性を検討した。その結果、アクチン結合蛋白ドレブリンの集積度はシナプス後部の分化レベルの評価に用いることが可能であることがわかった。ドレブリンの集積度は興奮性神経細胞ばかりでなく、抑制性神経細胞のシナプス後部の分化レベルを評価にも使用できるが、ただし、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞では、その集積度の絶対量が異なるため、シナプス後部の分化レベルの評価は興奮性神経細胞と抑制性神経細胞ではそれぞれの評価基準を別個に決定する必要があることが判明した。実際の評価基準の決定には現状の測定法よりもより定量的な測定法が必要であるが、ドレブリン集積度をスパイン基部の樹状突起シャフトに対するスパイン頭部のドレブリンの量比で測定することにより、より定量性を増すことができると考えられる。次に、従って、ドレブリン集積度を指標としてシナプス分化レベルを評価することは、十二分に可能であると考えられる。次に、種々の受容体機能活性を免疫染色により簡便に評価する系の開発を検討したところ、ドレブリンの集積度の変化に着目すれば、NMDA 受容体およびセロトニン IIA 受容体の活性を評価できることがわかった。また、評価時間のウィンドーを変えれば、NMDA 受容体およびセロトニン IIA 受容体の活性を選択的に評価できる可能性も示唆された。本研究成果は、種々の薬物がシナプス機能におよぼす影響を、迅速に且つ簡便に評価できる *in vitro* 系の開発につながり、脳機能に影響をおよぼす薬物を *in vitro* でスクリーニングを簡便に迅速に行えるようになることが期待される。

キーワード：シナプス分化、精神神経疾患、薬物スクリーニング

A. 研究目的

脳は、複数の樹状突起と一本の長い軸索有する大変極性の発達した神経細胞が構成する神経回路網の働きにより、学習や記憶などの高次機能を行うことができる。アルツハイマー病等の神経難病では、神経

細胞死によりこの神経回路網の機能異常惹起される結果であると考えられてきたが、最近では、神経回路網の接点であるシナプスの異常が注目されている。また、従来形態的異常がよくわかっていなかった精神神経疾患などでも、シナプスの形態・機能

異常が報告されている。本研究では、アクチン結合蛋白ドレブリンのスパイン集積度に着目して、中枢神経シナプス機能の *in vitro* 分化レベルを免疫染色により簡便に評価する系を確立する。さらに、この系を用いて、種々の受容体機能活性変化により惹起されるシナプス機能分化の遅延及び促進をどの程度定量的に評価できるかを解析し、中枢神経細胞を用いた *in vitro* の安全性薬理試験が開発可能であるかを検討した。

B. 研究方法

動物の取り扱い、動物実験指針に基づき実施した。なお、研究計画実施のすべてに必要な実験計画について、所属機関内の動物実験委員会の承認を得ている。

海馬初代分散培養にはバンカーらにより開発された培養方法を用いた。この方法により神経細胞のみをカバーグラス上で培養することが可能になるので、神経細胞同士のシナプス結合の発達を共焦点顕微鏡を用いることなく観察することが可能である。まず、妊娠16日目のマウスを深麻酔後断頭し、開腹後子宮から胎仔を取り出した。次に、胎仔脳より海馬を取り出し、トリプシン処理後単離神経細胞を調整し、ポリ L リジンでコーとしたカバーグラス上に低密度(約 5000 細胞/cm²)でまき、MEM 培地で培養した。3 時間後、神経細胞が付着したカバースリップを取り出し、グリアのフィーダー層の上に、上下逆にし、グリア細胞と神経細胞とを対面させるようにセットし、B27 サプリメントを含む MEM 培地で共培養を開始した。共培養開始後、4 日以降は 10 μ M の

cytosine-D-arabinofuranoside を加えてグリアの増殖を抑制した。

グリアのフィーダー層の作成は、生後1日のラットを氷冷麻酔の下、大脳皮質を取り出し、トリプシン処理後単離細胞を調整し、10%ウシ胎仔血清を含む MEM 培地で、コンフルエント状態になるまで培養した。

形態観察のために、一部の神経細胞には共培養開始後7日目に、GFP 発現ベクターを、リン酸カルシウム法を用いて導入した。

シナプス機能の分化レベルを判断するタンパクマーカーとして樹状突起スパインの機能蛋白に注目し、それらの樹状突起スパインへの集積を免疫細胞化学的に可視化して評価した。シナプス機能タンパクとしては、シナプス前部に関しては、シナプシン I を分化マーカーとして用いた。またシナプス後部に関しては、シナプス後部が形成されるスパインの二大主要構造であるシナプス後肥厚 (PSD) とアクチン細胞骨格に着目し、PSD に特徴的な蛋白 PSD-95 とスパインのアクチンに特徴的なアクチン結合蛋白ドレブリンをマーカーとして用いた。またアクチン細胞骨格に関しては重合化したアクチン (F アクチン) の一般的標識方法であるファロイジン染色による検討も併せて行った。機能タンパクのスパイン部位への集積度は、樹状突起シャフトの当該蛋白の免疫染色濃度を測定した上で、その2倍の濃度を持つ領域をクラスターとして同定してクラスター数とクラスターの平均濃度を測定することで定量化した。また、種々の受容体の機能的集積レベルを評価するために、興奮性神経伝達物質であるグル

タミン酸受容体、またそれらを修飾するセロトニン受容体のアゴニスト、アンタゴニスト投与によるシナプス反応をドレブリンの集積度を指標として解析することが可能かを検討した。

C. 研究結果

我々はシナプス機能の分化レベルとしては、アクチンの集積、ドレブリンの集積、PSD の集積を指標として用いた。従来の研究により、興奮性神経細胞における樹状突起スパインの分化・発達は、まずドレブリン結合アクチン繊維の集積が起こり、それに引き続き PSD-95 の集積が起こることがわかっている (Takahashi et al., *J. Neurosci* 23: 6586-6595, 2003)。そこで、抑制性神経細胞におけるシナプス後部の分化・発達においても同様な現象が分化レベルの指標になり得るかどうかを、glutamate decarboxylase 67 (GAD67)-GFP knock-in mice を用いて解析したところ、抑制性神経細胞においても、興奮性シナプス後部にはドレブリン、アクチン、PSD-95 の集積が認められることがわかった。しかしながら、個々のシナプス後部における各蛋白の集積度を定量すると、アクチンと PSD-95 の集積度は興奮性シナプス後部と有意差はないが、ドレブリンの集積度は有意に減少していることがわかった。ところで、抑制性神経細胞医には、樹状突起に多くのスパインを持つスパイニー神経細胞とほとんどスパインを持たない明日パイニー神経細胞があることが知られているので、シナプス後部におけるドレブリンの集積度の減少を、スパイニー(樹状突起スパインを持つタイプの)抑制性神経細胞とアスパイニー(樹状突起スパインのないタイプの)抑制性神経細胞とで比較したところ、有意差は検出されなかつ

た。また、スパイニー抑制性神経細胞ないでも、スパインシナプス(樹状突起スパイン上に形成されるシナプス)とシャフトシナプス(樹状突起幹上に形成されるシナプス)では、ドレブリン集積度の減少に相違がある可能性があるため、両者を比較検討したところ有意な差が検出されなかった。従って、ドレブリンの集積度の減少は、抑制性神経細胞における興奮性シナプス後部の一般的な性質であることが判明した(図1、発表論文より転載)。このことは、ドレブリン集積を指標としてシナプスの分化レベルを評価する場合には、現状では、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞と区別して解析する必要があることがわかった。

上記ドレブリン集積度の減少の起因として(1)ドレブリンを樹状突起シャフトからシナプス後部に集積させるメカニズムが興奮性神経細胞と抑制性神経細胞とで異なる可能性と、(2)集積メカニズムそのものには相違はないが、集積後に分解やスパイン外への流出の促進により、集積度が減少している可能性が、考えられる。またさらには(3)細胞あたりのドレブリン発現量の相違が関与している可能性もある。今後これらの要因の関与を明らかとすることにより、細胞種によるドレブリン集積度の絶対値の相違を補正することが可能となれば、種々の神経細胞におけるシナプス機能分化度をより正確に評価できるようになることが期待される。

次に、抑制性神経細胞においても興奮性神経細胞と同様に、NMDA 受容体の活性化をドレブリン集積度の減弱を指標として評価できるかどうかを検討した。培養21日目に 100 μ M のグルタミン酸を培養神経細胞に10分間投与後、そのまま固定し、抗ドレブリン抗体で免疫染色を行った。

その結果、抑制性神経細胞においても興奮性神経細胞と同様に、グルタメート投与後はドレブリンの集積度が減じることを見出した(図2)。コントロールとしてはシナプス全部に局在する蛋白シナプシン I に対する抗体を用いて免疫染色を行い、シナプス数には変化がないことを確認した。

次に、神経修飾物質セロトニン IIA 受容体活性をドレブリン集積度の減弱を指標として評価できるかどうかを検討した。セロトニン IIA 受容体の特異的アゴニストとしては (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI) を用いた。培養 21 日目に 1 μ M DOI を 10 分間投与後、そのまま固定し、抗ドレブリン抗体で免疫染色を行ったところ、10 nM、100 nM の DOI 濃度では、ドレブリン集積の減弱は検出できなかったが、500 nM、1 μ M では有意な減弱を検出できた(図3)。興味深いことに、従来の GFP をトランスフェクションしたラット海馬培養神経細胞を用いた形態的解析では、1 μ M の DOI を 10 分間投与しても、スパインの形態そのものには有意な変化が検出できないことが知られているので、今回検出できたドレブリン集積の減弱は、形態的変化の結果ではなく、セロトニン IIA 受容体の活性化の直接の影響であると考えられた。

D. 考察

興奮性神経細胞の樹状突起スパインにおいては、スパインの分化・発達にともない、ドレブリン集積度が増加することが報告されていたが、本研究により、ドレブリンの集積度は樹状突起スパインに限らず、より広く、樹状突起シャフト上のシナプスなどを含めた、シナプス後部一般の分化レベル

の評価に用いることが可能であることがわかった。ドレブリンの集積度は興奮性神経細胞ばかりでなく、抑制性神経細胞のシナプス後部の分化レベルを評価にも使用できるが、ただし、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞では、その集積度の絶対量が異なるため、シナプス後部の分化レベルの評価は興奮性神経細胞と抑制性神経細胞ではそれぞれの評価基準を別個に決定する必要があることが判明した。実際の評価基準の決定には現状の測定法よりもより定量的な測定法が必要であるが、ドレブリン集積度をスパイン基部の樹状突起シャフトに対するスパイン頭部のドレブリンの量比で測定することにより、より定量性を増すことができる(論文投稿中)。従って、ドレブリン集積度を指標としてシナプス分化レベルを評価することは、十二分に可能であると考えられる。

また、神経伝達物質グルタメートは NMDA 受容体を介してスパインにおけるドレブリンの集積度を減弱させることが既に示唆されている(Sekino et al. *Mol Cell Neurosci.* 31:493-504, 2006)。本研究成果により、興奮性神経細胞においても、抑制性神経細胞においても、ドレブリンの集積度の減弱レベルにより、NMDA 受容体活性化度を評価することができることが示唆された。さらに、神経伝達物質よりもゆっくりとした反応を神経細胞に引き起こすことが知られている神経修飾物質セロトニンの受容体活性度もドレブリンの集積度変化で評価できる可能性が示唆された。最近の研究で、ドレブリンの集積度はスパイン内のカルシウムイオン濃度により制御される可能性が示唆されているので、今回の研究成果により、カルシウム濃度変化が下流にあるような

受容体活性一般の活性レベル評価にドレブリン集積度が応用できると考えられ、中枢神経細胞を用いた *in vitro* の安全性薬理試験の開発の可能性が示唆された。

E. 結論

我々は、シナプスの分化レベルの評価系およびシナプス後部受容体活性の評価系として、従来の方法とは全く異なる、ドレブリン集積度の定量的測定を用いた簡便な免疫染色による評価系の可能性を示すことができた。この評価系は、*in vitro* 系を用いた新たな薬物スクリーニング方の開発に有用であり、今後ヒト由来神経細胞の終末分化である機能的シナプス結合の形成のマーカーとして利用した試験法の開発が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kojima N, Hanamura K, Yamazaki H, Ikeda T, Itohara S, Shirao T. "Genetic disruption of the alternative splicing of drebrin gene impairs context-dependent fear learning in adulthood" *Neuroscience* 165: 138-150 (2010)
2. Mercer JC, Mottram LF, Qi Q, Lee YC, Bruce D, Iyer A, Yamazaki H, Shirao T, Choe MH, Peterson BR, August A "Chemico-Genetic Identification of Drebrin as a Regulator of Calcium Responses." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:337-345 (2010)
3. Pérez-Martínez M, Gordón-Alonso M, Cabrero JR, Barrero-Villar M, Rey M, Mittelbrunn M, Lamana A, Morlino G,

Calabia C, Yamazaki H, Shirao T, Vázquez J, González-Amaro R, Veiga E, Sánchez-Madrid F. "F-actin-binding protein drebrin regulates CXCR4 recruitment to the immune synapse" *J. Cell Sci.* 123:1160-1170 (2010)

4. Hanamura, K, Mizui T, Kakizaki T, Roppongi TR, Yamazaki H, Yanagawa Y, Shirao T. "Low accumulation of drebrin at glutamatergic postsynaptic sites on GABAergic neurons" *Neuroscience* 169: 1489-1500 (2010)
5. Kaminuma T, Suzuki Y, Shirai K, Mizui T, Noda S, Yosida Y, Funayama T, Takahashi T, Kobayashi Y, Shirao T, Nakano T. "Effectiveness of carbon-ion beams for apoptosis induction in rat primary immature hippocampal neurons" *J Radiat Res (Tokyo)* 51:627-631 (2010)
6. 山崎博幸、白尾智明「シナプスの細胞骨格」*Clinical Neuroscience* 28:858-861 (2010)

2. 学会発表

1. The 10th Biennial Meeting of the APSN Meeting, 2010. Shirao T, Hanamura K. "Low accumulation of drebrin at glutamatergic postsynaptic sites on GABAergic neurons." Phuket, Thailand, October 17-20
2. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2010, Kojima N, Yasuda H, Hanamura K, Shirao T. "Neuron-specific drebrin isoform is necessary for hippocampus-dependent learning

- in adulthood but not in young age of mice” San Diego, USA, November 13-17
3. 花村 健次、柳川右千夫、白尾智明
「Low accumulation of drebrin in the postsynaptic sites of glutamatergic synapses formed on GABAergic neurons」第 87 回日本生理学会大会、2010 年 5 月 19 日～21 日、盛岡
 4. 六本木 T 麗子、花村健次、白尾智明
「樹状突起スパイン細胞骨格に対する neuromodulator の効果」日本分子生物学会第 10 回春季シンポジウム、2010 年 6 月 7 日～8 日、松島
 5. 六本木 T 麗子、花村健次、白尾智明
「Inhibitory effect of 5-HT_{2A} receptor activity on drebrin accumulation in dendritic spines」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
 6. 謝敏かく、猪口徳一、八木秀司、白尾智明、佐藤真「LL58 は樹状突起スパインの形態形成および成熟を制御する」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
 7. 児島伸彦、安田浩樹、花村健次、白尾智明
「Age-dependent impairments of hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning in drebrin A-specific knockout mice」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
 8. 花村健次、鎌田洋輔、山崎博幸、児島伸彦、竹田麗子、白尾智明「アクチン結合タンパク質ドレブリンのスパイン内動態を制御するメカニズムの解析」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
 9. 藤枝智美、朽名夏磨、上野正義、門真和音、三輪秀樹、白尾智明、馳澤盛一郎、渡邊俊樹、関野祐子
「Analysis of long-lasting hyperpolarization mediated by GABA_B receptors in the lateral amygdala of mice slice preparation using voltage-sensitive dye imaging」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
 10. 岡本武人、白尾智明、遠藤昌吾、永雄総一「小脳依存性運動記憶の獲得にはタンパク質合成が必要か」第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 2 日～4 日、神戸
 11. 六本木(竹田)麗子 白尾智明
「5-HT_{2A} 受容体の活性化によるアクチン細胞骨格の変化」第 57 回北関東医学会総会、前橋、2010 年 10 月 7 日～8 日
 12. 鎌田洋輔、小林孝安、白尾智明、花村健次「樹状突起スパインにおけるドレブリンのアイソフォーム特異的な動態の制御機構」第 57 回北関東医学

- 会総会、前橋、2010年10月7日～8日
13. 花村健次、鎌田洋輔、山崎博幸、児島伸彦、白尾 智明 「海馬ニューロンの樹状突起スパインにおけるドレブリンのアイソフォーム特異的な動態の制御機構」第19回海馬と高次脳機能学会、金沢、2010年11月20日～21日
 14. 児島伸彦、安田浩樹、花村健次、白尾 智明 “Isoform conversion of drebrin is required for hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity in the elderly.” 第 84 回日本薬理学会年会、誌上開催
 15. 花村健次、鎌田洋輔、白尾智明 “Isoform-dependent regulation of drebrin turnover in dendritic spines of hippocampal neurons.” 第 84 回日本薬理学会年会、誌上開催
 16. 鎌田洋輔、花村健次、山崎博幸、児島伸彦、白尾智明 「ドレブリン動態のアイソフォーム特異性とその特異性に関与する分子内アミノ酸配列の解析」第 88 回日本生理学会大会、誌上開催
 17. 白尾智明, 水井利幸、関野祐子、児島伸彦 「cLTP 誘導初期に起こるドレブリン結合型アクチン線維の樹状突起スパインからの脱出」第 88 回日本生理学会大会、誌上開催
 18. 六本木 T 麗子、山崎博幸、白尾智明 “5-HT_{2A} receptor activation decreases the number of drebrin clusters at dendritic spines” 第 88 回日本生理学会大会、誌上開催
- G. 知的所有権の取得状況
- 無し

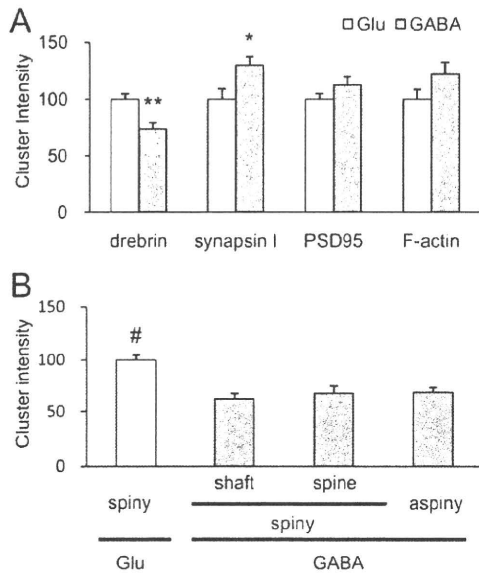


Figure 1 Immunofluorescence intensities of synaptic molecule clusters in GABAergic and glutamatergic neurons. (A) Cluster intensities for drebrin, synapsin I, PSD95, and F-actin. Less drebrin—not synapsin I, PSD95, or F-actin—accumulated on GABAergic neurons. (B) Comparison of drebrin cluster intensities on dendritic shafts and spines of GABAergic neurons. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ versus Glu. # $P < 0.01$ versus shaft, spine, aspiny of GABA. (発表論文4より転載)。

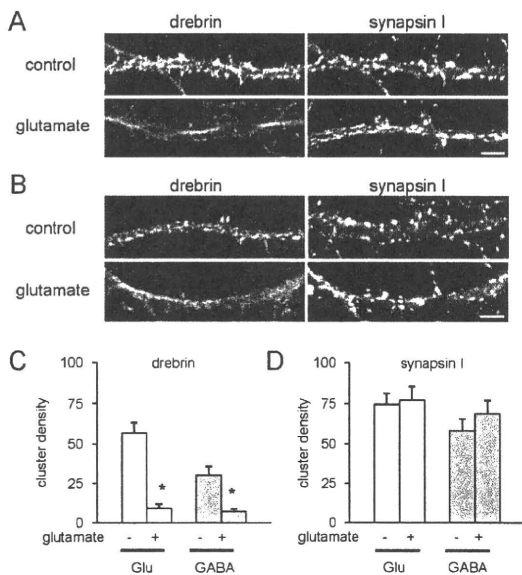


Figure 2 Effect of glutamate stimulation on drebrin localization. (A, B) Immunostaining of drebrin and synapsin I. Glutamatergic (A) and GABAergic (B) neurons were treated with 100 μM glutamate (Glu) for 10 min or left untreated. (C, D) Quantitative analysis of drebrin cluster density (C) and synapsin I cluster density (D). Glu treatment significantly reduced drebrin cluster density but not synapsin I cluster density. * $p < 0.01$. Scale bar: 5 μm .

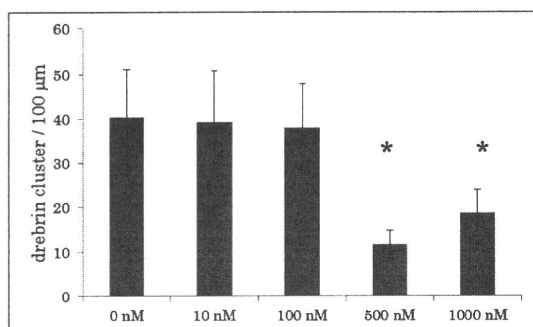


Figure 3 Quantification of drebrin clusters in response to various concentrations of DOI. DOI treatment for 15 min resulted in a dose-dependent decrease in drebrin clusters in hippocampal cell culture. (0 nM, $n = 15$ cells; 10 nM, $n = 13$ cells; 100 nM, $n = 16$ cells; 500 nM, $n = 15$ cells; 1000 nM, $n = 14$ cells). Note that 500 nM and 1000 nM DOI treatment significantly reduced the cluster density of drebrin after 15 min. $P < 0.001$.

