

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	臨界期可塑性によるニューロン樹状突起形態変化と神経回路再編成の機構
研究機関・部局・職名	京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授
氏名	見学 美根子

## 【研究目的】

哺乳類の神経回路は、遺伝的プログラムとは独立に細胞外環境の変化に対応して結合パターンを柔軟に組み換える機構をもつ。とりわけ生後発達期の一定期間（臨界期）に、外界から受ける刺激により回路の書き換えが頻繁に起こり、神経回路が最適化される現象が多く観察されているが、分子・細胞機構の詳細は明らかでない。

小脳プルキンエ細胞は生後発達期に緻密に分岐した樹状突起を展開し、興奮性入力線維である小脳顆粒細胞由来の平行線維と直交する大きな扇形の樹状突起を形成する。申請者の過去の研究で、発達中におこる突起間の接触や神経活動などの、遺伝的プログラムには依存しない細胞外環境の干渉により、プルキンエ細胞樹状突起パターンが軌道修正され、樹状突起の平面性と空間充填性が獲得されることが示唆されていた。

本研究では哺乳類脳の臨界期可塑性機構の解明を目指し、小脳プルキンエ細胞をモデルとして臨界期の樹状突起パターンリモデリングの細胞・分子機構に取り組んだ。また数理解析を用いて樹状突起パターン形成原理を明らかにすることを目指した。期間中に行った課題は以下3つである。

(1) 入力線維の活動による局所的な樹状突起リモデリングの分子機構：

プルキンエ細胞に入力する二種の興奮性線維（平行線維と登上線維）の活動を攪乱した際、樹状突起パターンと局所回路形成に表れる影響を解析する。二種の興奮性線維の活動をそれぞれ時期特異的に可逆的に抑制できる遺伝子改変マウスを作製し、入力線維活動による樹状突起パターン修飾が起こる臨界期を特定する。また平行線維入力が生後発達期に消失する vGluT1 欠損動物等の回路異常マウスを分子解剖学的に解析し、臨界期可塑性による樹状突起リモデリングの機構を明らかにする。

(2) 突起ダイナミクス制御の分子機構：

樹状突起パターン形成ダイナミクスの分子ネットワークを同定する。突起間接触により分岐が退縮される際に活性化される分子シグナル経路を同定し、接触により活性化されるシグナルの時空間的拡散を生細胞イメージングにより定量化する。一定の細胞分化期間を過ぎると退縮が起こらなくなる現象が、シグナルのど

のような質的量的変化によるものかを検証する。また樹状突起の伸長と分岐が制御される分子機構についても同様に解析し、ダイナミクスの素成分のパラメータを定量的に明らかにする。

(3) 樹状突起パターンダイナミクスの計算機シミュレーション：

培養プルキンエ細胞の長期ライブイメージング系を用い、突起の伸長・分岐・退縮などの各パラメータの実測値を元に、パターンダイナミクスの計算機シミュレーションを行い、プルキンエ細胞樹状突起の特徴的な空間分布が再現できるかを検証する。各パラメータを制御するシグナル経路を数値解析し、樹状突起パターン形成の数理モデル構築を試みる。

**【総合評価】**

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

**【所見】**

① **総合所見**

本研究課題の目的として、当初以下の3項目が設定された。

1. 入力線維の活動による局所的な樹状突起リモデリングの分子機構
2. 突起ダイナミクス制御の分子機構
3. 樹状突起パターンダイナミクスの計算機シミュレーション

項目1に関しては、培養下のプルキンエ細胞、海馬錐体細胞等が徐々に複雑な樹状突起を発達させる過程を長期ライブイメージングで観察し、伸長、退縮、分岐などのダイナミックな発達過程のイメージングに成功した。しかし、目的の遺伝子改変マウスが入手できず当初計画を変更し、グルタミン酸トランスポータノックアウトマウスを使う代替え実験を行い一定の成果は得た。ただ、当初目標とした分子機構の解明にまで至らなかった。項目2については、突起ダイナミクスの制御に関わる分子を探索した結果、成長する樹状突起が衝突すると一方が退縮することとその制御に関わる分子を見出した。項目3では上述の伸長と退縮が互いに重複しない特徴的な樹状突起パターンの形成に重要であることをシミュレーションで証明した。

以上、優れた成果が得られたと判断される。

② **目的の達成状況**

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

前述の3項目の内、特に進展があったのは項目2と3である。

項目2については、分散培養の長期イメージング実験系を立ち上げ、薬理的阻害や遺伝子導入実験などを活用することで、PKDシグナルが樹状突起の接触依存的な退縮

を制御していることを見出した。項目3については、in silico モデル細胞を作成して、プルキンエ細胞の突起形成過程を再現することに成功している。

一方で、項目1について、登上線維の活動遮断のリモデリングへの影響を調べる実験では、いくつかの問題が生じて研究の変更を図った。具体的には、下オリブ核の神経細胞特異的に活動遮断を行うための、テトラサイクリン活性化転写因子を下オリブ核の神経細胞に発現するマウスの作成において、キメラマウス作成の段階を越えることが出来なかったこと、その代替として AAV を用いてテタヌストキシンを発現する系の開発を開始したが、この実験を担当する大学院生が病気になって研究の続行が困難になった事が挙げられている。

また、平行線維の活動遮断のリモデリングへの影響を調べる実験では、テトラサイクリン活性化転写因子を小脳の顆粒細胞に発現する系を開発するために、GABA 受容体遺伝子座にテトラサイクリン活性化転写因子の遺伝子をノックインしたマウスを利用しようと計画したが、このマウスに突然変異があり、系統が根絶した事が挙げられている。 以上の問題に対して、グルタミン酸トランスポータノックアウトマウスを使う代替実験を行い一定の成果は得た。

このように項目1については実施が当初の目的から変更され、新規性の高い結果は得られなかった。

以上、当初予定されていた計画の内、培養系を利用した研究については、分子機構の同定と計算機シミュレーションのどちらについても優れた成果を得ているが、in vivo の実験に関しては複数の要因が重なって当初の計画を変更し、一定の成果を得たので、全体としては所期の目的は一部達成されたと判断する。

### ③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が  
( ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が  
( 創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が ( ある ・ ない)

樹状突起の分岐形成に関する分子機構には不明な点が多く、上述の成果で明らかにされたメカニズムは脳研究においても重要な結果である。さらに、このメカニズムに基づいて、計算機シミュレーションを行い、分岐形成を再現しており、実験結果と理論の両面からの成果は当該分野としては優位性があると言えよう。また、樹状突起の分岐形成におけるミトコンドリアの役割に関する発見は当初の目的以外の興味深い成果であり、先進性があると思われる。

神経細胞の種類は多く、かつそれぞれの神経細胞が異なった形態の樹状突起と軸索を形成することが知られている。またこれらの突起の形態が神経細胞の機能の本質である、神経細胞間のシナプス結合の組み合わせと、それらシナプス結合を介して伝達されるシグナルの調節を直接的に決定している。従って樹状突起の形態の特徴が決定されるメカニズムの解明は神経科学の中心的な課題であるにもかかわらず、これまでほとんど解明が進んでいない。本研究課題では、樹状突起の局所での形態形成過程を

定量して、それを基にして大局的な形態への発展を計算論的に説明することに成功しており、樹状突起の形作りの研究において優位性のある成果であるが、ブレークスルーとまでは言えないと思われる。

#### ④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が  
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が  
(見込まれる ・ 見込まれない)

本研究課題の目的はきわめて基礎的なものであり、直接的に脳疾患研究に役立つ情報や技術を提供するものではないが、この研究によって長期的に達成される神経細胞の形態形成原理の解明は、様々な精神・神経疾患の病態を解明する際に非常に有用な神経回路の基礎データを提供することになる。出来上がった脳神経回路は複雑であるが、そのような複雑な構造が形成される動的過程をモデル化出来れば、簡単なルールに基づいて脳神経回路が組みあがる過程を再構成することが可能となる。このようなモデルを利用して脳の発達障害の原因などを検索することが将来的に可能になると期待できる。

#### ⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究目的の達成に向けて立てられた3つの項目はいずれも適切であり、研究の実施についても適切な実施体制が立てられていた。大学院生の指導とバックアップの体制のマネジメントは適切に行われたと思われる。助成金は有効に活用されており、購入されている機器・備品も研究の展開に必要なものであった。

国民との科学技術対話に関しては、「京都大学アカデミックデイ」を毎年開催し出展するなど活発に行われたように思われる。