

光操作による脳損傷後回復機構の解明

三重大学大学院医学系研究科生化学分野

實木 亨

【研究の目的及び背景】

事故や脳卒中などで脳が損傷を受けた際にどのように回復をもたらすのだろうか？脳損傷後の回復過程において、失われた機能にそれぞれ関連した脳領域が機能的地図を再構成して代償するといわれているが実体は未だ明らかではない(Nudo Science 1996; Winship & Murphy J. Neurosci. 2008)。脳の可塑性の分子基盤としてAMPA受容体のシナプス移行（集積）が世界的に認められている。AMPA受容体はGluA1-4サブユニットが存在し、海馬や大脳皮質においてはGluA1/1・GluA1/2・GluA2/3といった組み合わせの複合体によりイオンチャンネルが形成され、GluA1を含む複合体は神経活動依存的にシナプス移行するが、GluA2/3複合体は恒常的にシナプスに存在する（図1）（Shi et al., Science. 2000, Takahashi et al., Science. 2003, Rumpel et al., Science. 2005）。これまでに申請者は、大脳皮質損傷周囲においてリハビリテーション依存的にAMPA受容体のシナプス移行を促進することにより損傷後の機能回復を誘導することを明らかにした(Abe*, Jitsuki* et al., Science 2018 *co-first author)。

しかしながら、どのようなタイミングでどのようなAMPA受容体のサブユニット複合体がシナプスに移行し、失われた機能が回復したのかということについては全く不明なままである。

そこで本研究では、申請者が新たに所属した研究室において開発された各AMPA受容体をターゲットとした光不活化法（Takemoto et al. Nat. Biotechnol. 2017）を用いて、高い時間分解能を以て機能回復過程における各AMPA受容体のサブユニット複合体の役割を明らかにすることが当初の目的である。このような目的を達成するため、AMPA受容体のサブユニット複合体特異的な光依存的分子操作技術を開発し、先行研究に倣い動物の学習機能を操作することを試みた。

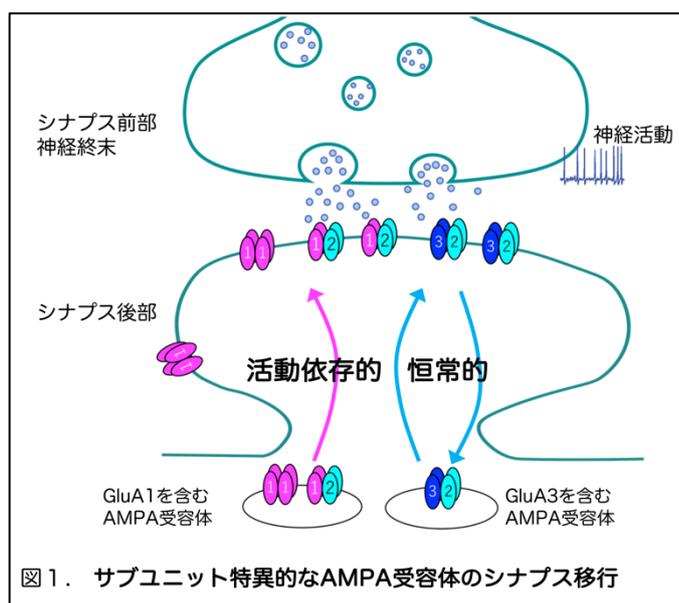


図1. サブユニット特異的なAMPA受容体のシナプス移行

【方法】

In vitroにおけるGluA2/3のCALI法による機能阻害

AMPA受容体のサブユニット複合体特異的な光依存的分子操作技術としてCALI（Chromophore-assisted light inactivation）法を用いる。CALI法は光照射依存的に活性酸素を放出する光増感物質を用いた分子機能不活化法である（Jay DG et al. PNAS 1988）。例えばエオシン等の光増感物質で標識した抗体を標的分子に反応後に光照射すると、産生した活性酸素によりごく近傍の標的分子が特異的かつ迅速に酸化・不活性化されるといっ

たものである。

培養15日目の海馬培養神経細胞にエオシン標識GluA2/3抗体を添加する。その後抗体をwashoutし、培養液を人工脳脊髄液に置換してwhole cell パッチクランプ記録を実施する。パッチクランプ記録はAMPA受容体を介した応答とNMDA受容体を介した応答を光照射（CALI）前後において記録する。光照射後に応答の減弱が見られた際には、その受容体がCALIにより機能阻害をもたらしたと評価することができる。

In vivoにおけるGluA2/3のCALI法による機能阻害

先行研究（Takemoto et al. *Nat. Biotechnol.* 2017）に従い、エオシン標識GluA2/3抗体を海馬CA1領域両側に脳定位的に注入し、光照射用カニューラを設置する。次に海馬依存的学习課題である受動的回避学習（IA学習）を動物に経験させた後、いくつかのタイムコース（1時間後、2時間後、4時間後、24時間後）で光照射後にIA学習における記憶の維持について行動実験により評価する。IA学習の評価については学習用Boxでショックを受けた動物がショックを受けた部屋に入る時間を計測しており、入るまでの時間が短いと記憶が阻害されていることを示す。光照射により記憶機能が阻害されたタイミングについてはその時期がGluA2/3がシナプスに移行し、それにより記憶が維持されたと評価することができる。

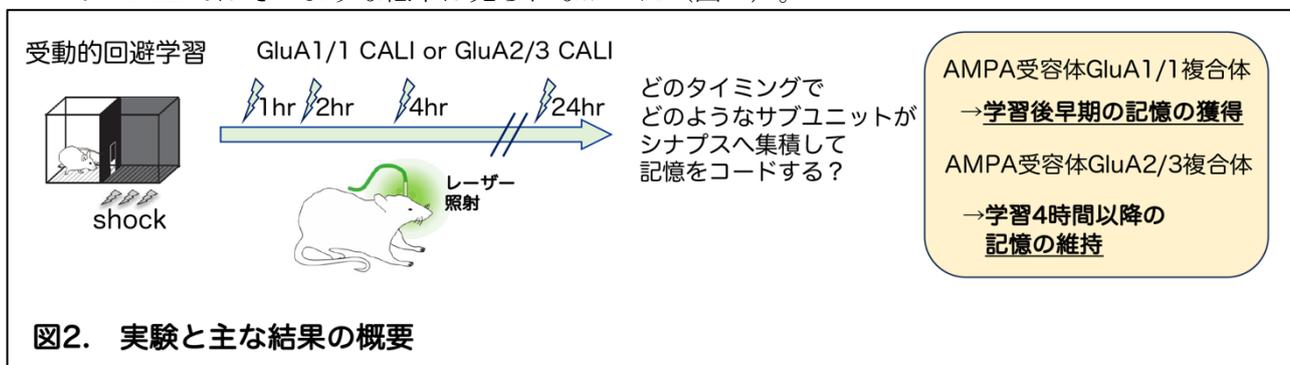
【結果】

①In vitroにおけるGluA2/3のCALI法による機能阻害

海馬初代培養細胞を用いたIn vitroの実験において、エオシンラベル化されたGluA2/3抗体を用いたCALIによりNMDA受容体を介したシナプス応答には影響は無く、AMPA受容体を介した応答の減弱が示された。

②In vivoにおけるGluA2/3のCALI法による機能阻害

動物個体を用いたIn vivoの行動実験において、海馬依存的学习課題であるIA学習実施後1時間・2時間におけるGluA2/3のCALIにより動物がショックを受けた部屋へ入る時間の低下は見られなかった。一方でIA学習実施後4時間・24時間においてGluA2/3のCALIを導入することによりショックを受けた部屋へ入る時間の有意な低下がみられた。このことからIA学習実施後1時間・2時間ではなく、4時間・24時間においてGluA2/3がシナプスに移行し、それにより記憶が維持されたということが示された。さらに、GluA1/1のCALIについても実施したところ、GluA2/3とは異なり、IA学習実施後1時間・2時間の時点で光照射を施すことにより記憶機能の低下が見られ、4時間・24時間におけるCALIではそのような低下は見られなかった（図2）。



これらの結果からIn Vitro・In Vivoにおいて有効なGluA1/1・GluA2/3といったサブユニット特異的な光不活性化法を確立することができた。また、GluA1/1は記憶の獲得、GluA2/3は学習後4-24時間における記憶の維持を担っていることが示唆された。

これらの結果をもとに脳損傷後の機能回復過程のモデル動物に上記のサブユニット特異的なAMPA受容体に対するCALIを実施し、脳損傷後の機能回復機構を明らかにする研究へ発展させていく予定である。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人アステラス病態代謝研究会にご支援を賜りましたことを深く感謝申し上げます。