

氏名	あさい ひろたか 浅井 裕貴
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	富生命博甲第117号
学位授与年月日	令和2年3月24日
専攻名	認知・情動脳科学専攻
学位授与の要件	富山大学学位規則第3条第3項該当
学位論文題目	海馬神経活動と記憶機能におけるクラスター型プロトカド ヘリンβの機能解析 (The impact of clustered protocadherinβs on hippocampal neuronal activity and memory tasks)
論文審査委員	
(主査)	教授 高雄 啓三
(副査)	教授 鈴木 道雄
(副査)	教授 將積 日出夫
(副査)	教授 田村 了以
指導教員	教授 井ノ口 馨



## 要旨

本研究の目的は、細胞接着分子群の1つであるクラスター型プロトカドヘリンが海馬神経活動や記憶機能に与える影響を明らかにすることである。クラスター型プロトカドヘリンは3つのサブグループ(クラスター型プロトカドヘリン  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) に大別され、マウスでは全58種類のアイソフォームから構成される。これらの分子群は、細胞ごとに異なる組み合わせで発現することで多様な発現パターンを生み出し、軸索投射や樹状突起の広がりといった神経細胞の形態形成に関わることが知られているが、神経活動や脳の高次機能への影響はほとんどわかっていない。そこで本研究では海馬に発現することが知られるクラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の欠損マウスを用いてカルシウムイメージングを行うことで、クラスター型プロトカドヘリンの海馬神経活動への影響を調べた。次に同様のマウスで行動実験を行い、学習・記憶におけるクラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の役割を調べた。

### 第1章：In vivo カルシウムイメージングによる神経活動の評価

クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の神経活動における機能解析のため、クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  欠損マウスを用いて、自由行動下のマウスの海馬 CA1 領域のカルシウムイメージングを行い、同期的な活動をする細胞集団(アンサンブル)を数理解析により抽出した。その結果、クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の欠損マウスでは、20個以上の細胞で構成される大きいアンサンブルが野生型マウスと比べて増えていた。また、クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の欠損マウスでは1つの神経細胞が複数のアンサンブルに含まれる割合が増加した。これらの結果からクラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  が海馬のアンサンブル形成に関わることが明らかになった。


### 第2章：行動実験による記憶機能の評価

クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の記憶機能への影響を評価するために、同上のマウスで海馬依存的な恐怖条件付け空間学習課題を行った。翌日のテスト(近時記憶)の結果、条件付けした空間でのすくみ反応は野生型と同程度であったことから、クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  欠損は単純な空間学習には影響しないことが分かった。しかし、条件付けされた空間とは異なる新規空間との識別能力はクラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の欠損により低下した。さらに、学習の2週間後に同様のテスト(遠隔記憶)ではクラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の欠損マウスは野生型マウスと比べてすくみ反応が少なかったことから、恐怖記憶の保持低下が示唆された。消去学習実験により学習・記憶の柔軟性を調べたところ、クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  の欠損で消去学習の遅延がみられた。これらの結果から、クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  は単純な学習・記憶というよりもより高次の学習・記憶課題の遂行に重要であることが示唆された。

本研究によりクラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  が海馬 CA1 におけるアンサンブル活動に影響すること、記憶課題の中でもより高次脳機能を要する課題遂行に影響することが明らかになった。これらの結果から、クラスター型プロトカドヘリン  $\beta$  は情報処理過程の基盤となる神経細胞集団の形成に関与すると考えられる。



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富生命博甲第 号 富生命博乙第 号	氏 名	浅井 裕貴
論文審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教 授	高雄 啓三	
	(副査) 教 授	鈴木 道雄	
	(副査) 教 授	将積 日出夫	
(副査) 教 授	田村 了以		
指 導 教 員	井ノ口 馨		
(論文題目) 海馬神経活動と記憶機能におけるクラスター型プロトカドヘリンβの機能解析 The impact of clustered protocadherinβs on hippocampal neuronal activity and memory tasks		(判定)  合格	
(論文審査の要旨)			
〔目的〕			
<p>本研究の目的は、細胞接着分子群の1つであるクラスター型プロトカドヘリンが海馬神経活動や記憶機能に与える影響を明らかにすることである。クラスター型プロトカドヘリンは3つのサブグループ(クラスター型プロトカドヘリンα、β、γ)に大別され、マウスでは全58種類のアイソフォームから構成される。これらの分子群は、細胞ごとに異なる組み合わせで発現することで多様な発現パターンを生み出し、軸索投射や樹状突起の広がりといった神経細胞の形態形成に関わることが知られているが、神経活動や脳の高次機能への影響はほとんどわかっていない。そこで本研究では海馬に発現することが知られるクラスター型プロトカドヘリンβの欠損マウスを用いてカルシウムイメージングを行うことで、クラスター型プロトカドヘリンの海馬神経活動への影響を調べた。次に同様のマウスで行動実験を行い、学習・記憶におけるクラスター型プロトカドヘリンβの役割を調べた。最後にクラスター型プロトカドヘリンβの特定のアイソフォームを発現する細胞が蛍光タンパク質で標識される遺伝子組換えマウスを用いて免疫組織化学染色を行い、クラスター型プロトカドヘリンβの海馬内での発現を確認した。</p>			
〔方法・結果〕			
<p><i>In vivo</i>カルシウムイメージングによる神経活動の評価</p> <p>クラスター型プロトカドヘリンβの神経活動における機能解析のため、クラスター型プロトカドヘリンβ欠損マウスを用いて、自由行動下のマウスの海馬CA1領域のカルシウムイメージングを行い、同期的な活動をする細胞集団(アンサンブル)を数理解析により抽出した。その結果、クラスター型プロトカドヘリンβの欠損マウスでは、20個以上の細胞で構成される大きいアンサンブルが野生型マウスと比べて増えていた。また、クラスター型プロトカドヘリンβの欠損マウスでは1つの神経細胞が複数のアンサンブルに含まれる割</p>			

合が増加した。これらの結果からクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ が海馬のアンサンブル形成に関わることが明らかになった。

#### 行動実験による記憶機能の評価

クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の記憶機能への影響を評価するために、同上のマウスで海馬依存的な恐怖条件付け空間学習課題を行った。翌日のテスト（近時記憶）の結果、条件付けした空間でのすくみ反応は野生型と同程度であったことから、クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ 欠損は単純な空間学習には影響しないことが分かった。しかし、条件付けされた空間とは異なる新規空間との識別能力はクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の欠損により低下した。さらに、学習の2週間後に同様のテスト（遠隔記憶）ではクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の欠損マウスは野生型マウスと比べてすくみ反応が少なかったことから、恐怖記憶の保持低下が示唆された。消去学習実験により学習・記憶の柔軟性を調べたところ、クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の欠損で消去学習の遅延がみられた。これらの結果から、クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ は単純な学習・記憶というよりもより高次の学習・記憶課題の遂行に重要であることが示唆された。

#### クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の海馬内発現確認

クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の海馬内における発現を調べるために、クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ 3発現細胞を赤色蛍光タンパク質 tdTomato で標識した遺伝子組換えマウスの脳スライスを用いて免疫組織化学染色を行い、海馬内でのクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の発現を調べた。その結果、組換え遺伝子のホモとヘテロで発現細胞数に違いがないこと、活動依存的な発現細胞数の変化は見られないこと、海馬3領域間で発現レベルが異なることが分かった。さらにクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の発現細胞種を調べるために、細胞種特異的なマーカーの染色を行ったところ、抑制性介在ニューロンやアストロサイトにもクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ 3の発現が見られた。これらのことからクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ は多くの細胞種に発現すること、確率的に等しくランダムに発現しているというよりも特徴的な発現パターンを有していることが分かった。

#### 〔総括〕

本研究によりクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ が海馬 CA1 におけるアンサンブル活動に影響すること、記憶課題の中でもより高次脳機能を要する課題遂行に影響することが明らかになった。これらの結果から、クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ は情報処理過程の基盤となる神経細胞集団の形成に関与すると考えられる。

クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ の欠損マウスを活用し、カルシウムイメージングによる海馬神経活動解析や行動解析を行うことでクラスター型プロトカドヘリン $\beta$ が海馬 CA1 領域におけるアンサンブル活動に影響すること、記憶課題の中でも比較的高次の脳機能を要する課題遂行に影響することを初めて明らかにした点は新規性があり、クラスター型プロトカドヘリン $\beta$ が脳内の情報処理過程の基盤となる神経細胞集団の形成に関与する可能性を示したことは脳神経系の機能について重要な知見をもたらすと考えられることから医学における学術的重要性も高い。

以上のことから本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。