慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	人工的シナプスオーガナイザーによる神経回路制御方法の開発
Sub Title	Engineering neuronal circuits by artificial synapse organizers
Author	鈴木, 邦道(Suzuki, Kunimichi) 掛川, 渉(Kakegawa, Wataru) 三浦, 会里子(Miura, Eriko)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では任意のシナプスを接続させる人工的シナプスオーガナイザーを開発し、神経接続の欠失により引き起こされる疾患治療への応用を目指している。NPTXファミリー分子、補体C1qおよびグルタミン受容体に対するナノボディを標的として、性状機能解析が遂行され、各分子の回路特異性・協調性、新規の受容体、結合性能が明らかとなり、新規デザインの開発が進んだ。作製の完了した興奮性人工的シナプスオーガナイザーについて、脳内分子や回路に与える影響が解析され作用の分子機構が明らかになった。また疾患治療へ応用として、脊髄損傷による運動機能障害を回復させることも明らかになり、新規治療法につながる所見が得られた。 This research aims to develop novel artificial synapse organizers, which connect synapses of interest, to cure the diseases caused by the loss of the synaptic connections. Investigation of NPTX family proteins, complement C1q and nanobodies against glutamate receptors revealed the physiological function, novel receptors and binding profiles, making the progress in the further design of the new artificial synapse organizers. Detailed analysis of the excitatory artificial synapse organizers which had been already designed revealed the basic mechanism for the brain circuits and molecules. As an application to the diseases, it turned out that the motor deficit caused by spinal cord injury was improved by the excitatory artificial organizer, demonstrating the promising evidence as the novel therapeutic tool for synapse diseases.
Notes	研究種目：挑戦的研究 (萌芽) 研究期間：2018～2019 課題番号：18K19380 研究分野：神経科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K19380seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 ９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１９３８０

研究課題名（和文）人工的シナプスオーガナイザーによる神経回路制御方法の開発

研究課題名（英文）Engineering neuronal circuits by artificial synapse organizers

研究代表者
鈴木　邦道（SUZUKI, Kunimichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：１０７１３７０３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では任意のシナプスを接続させる人工的シナプスオーガナイザーを開発し、神経接続の欠失により引き起こされる疾患治療への応用を目指している。NPTXファミリー分子、補体C1qおよびグルタミン受容体に対するナノボディを標的として、性状機能解析が遂行され、各分子の回路特異性・協調性、新規の受容体、結合性能が明らかとなり、新規デザインの開発が進んだ。作製の完了した興奮性人工的シナプスオーガナイザーについて、脳内分子や回路に与える影響が解析され作用の分子機構が明らかになった。また疾患治療へ応用として、脊髄損傷による運動機能障害を回復させることも明らかになり、新規治療法につながる所見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では、脳内に存在するシナプス接着分子の構造を原案として改変し、様々なシナプス形成・維持・除去を可能とする人工的シナプスオーガナイザー開発しようとする挑戦的な研究であったが、この概念を試験管レベルから動物レベルまで証明すると同時に、新たな人工的分子の合理的な設計のための所見が蓄積され、分子機構や神経回路を解明する基礎的な知見が得られた。さらにシナプスの減少により引き起こされる疾患が治療可能であることが見いだされ、新規の疾患治療法開発に繋がる新規概念を確立し、現実的な医療への応用につながる研究となった。

研究成果の概要（英文）：This research aims to develop novel artificial synapse organizers, which connect synapses of interest, to cure the diseases caused by the loss of the synaptic connections. Investigation of NPTX family proteins, complement C1q and nanobodies against glutamate receptors revealed the physiological function, novel receptors and binding profiles, making the progress in the further design of the new artificial synapse organizers. Detailed analysis of the excitatory artificial synapse organizers which had been already designed revealed the basic mechanism for the brain circuits and molecules. As an application to the diseases, it turned out that the motor deficit caused by spinal cord injury was improved by the excitatory artificial organizer, demonstrating the promising evidence as the novel therapeutic tool for synapse diseases.

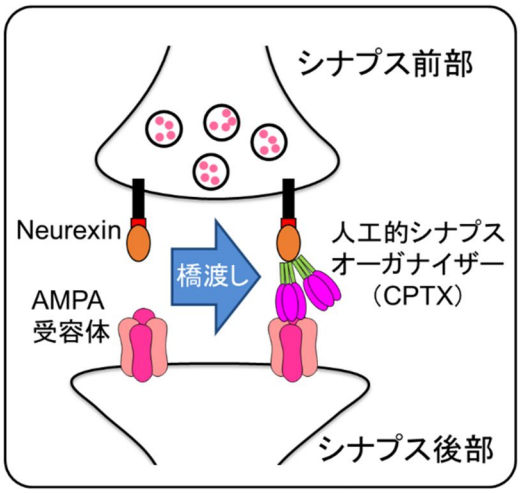
研究分野：神経科学

キーワード：シナプス　C1q　脊髄損傷　AMPA受容体

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

神経細胞はシナプスと呼ばれる情報伝達の場を介して細胞間の情報伝達を行っている。このシナプスはランダムではなく、選択的な接続が形成されており、認知や行動などの高次機能の発揮に重要な神経回路を形成して脳を構成している。シナプス形成の選択性を決定する因子として、近年数多くのシナプスオーガナイザーが発見されている。申請者はシナプスオーガナイザーがいかに分解されていくか、分子機構の研究を行ってきており (Suzuki et al., Neuron 2013)、シナプスの形成および神経回路の形成・維持・除去の複雑かつ精密な制御メカニズムの一端を明らかにした。一方で、申請者の所属研究室では新規のシナプスオーガナイザーである、細胞外足場タンパク質（Extrascellular Scaffolding Protein, ESP）が複数発見された(Matsuda et al., Science 2010)。ESP の一つである Cbln は棒状ドメインと球状ドメインにより構成され、それぞれシナプス前部に存在する Neurexin と後部に存在するδ型グルタミン酸受容体 2（δ2R）に同時に結合し、橋渡しをする形で迅速なシナプス形成を誘導できることから、シナプス接合ツールとして有用と思われた。しかし、δ2R は小脳などの限局した発現を示し、他の脳部位でも作用しうる普遍的シナプス接合ツールとしては結合選択性の拡張が必要であった。Cbln ファミリーと類似構造を有する C1q, C1qL、や ESP 分子である Pentraxin ファミリーを用いて、各ドメイン構造を切り取り、組み替えることにより、新規の結合選択性を有した人工的シナプスオーガナイザーが作製可能ではないかと着想した。第一世代のシナプス接合因子として Cbln と Pentraxin 分子を組み合わせた Cbln-Pentraxin（CPTX）がシナプス前部の Neurexin とシナプス後部の AMPA 受容体を橋渡しする人工分子として設計されたが（右図)、他の ESP による次世代の分子の設計も課題であった。さらに、ESP だけではなく、特定のたんぱく質に対して結合特異性を有するラクダ科単鎖抗体（ナノボディ）を組み合わせることにより、結合特異性を拡張する方策が着想された。



シナプスの形成・維持・除去の異常は発達障害や認知症などの多くの精神疾患の発症と強い関連があり、「シナプス病」と呼ばれる疾患概念として捉えられつつある。人工的シナプスオーガナイザーが疾患発症に重要な神経回路に作用し、シナプス接続を回復させることによって新規治療法として有用であることが期待される。既にいくつかの神経回路においては第一世代の人工的シナプスオーガナイザーである CPTX に効果があることが見いだされつつあり、さらなる結合選択性の拡張と疾患治療効果の解析が求められていた。

２．研究の目的

本研究ではシナプスの形成・維持・成熟に必要なシナプスオーガナイザーの構造を様々にデザインし、結合特異性を拡張した新規の人工的シナプスオーガナイザーを作製することで、神経回路接続の機能的制御を可能とする新規技術の開発を目的とする。さらにこの新規技術を「シナプス病」モデルマウスに適用し、動物生体内で神経回路を制御し疾患治療を可能とする新規技術の応用を目指す。これらの目的を達成するために、課題として人工的シナプスオーガナイザーの【課題１．新規デザイン】、【課題２．機能検証・疾患モデルマウスへの応用】の２課題を設定した。【課題１】では人工的シナプスオーガナイザーのパーツとなる C1q や Pentraxin ファミリー分子、ナノボディの結合特異性や脳内局在を解析すると同時に、新たな神経回路特異的な人工的シナプスオーガナイザーを興奮性あるいは抑制性シナプスを標的としてデザインを行い、新規分子の精製を行う。【課題２】では【課題１】で得られた精製タンパク質および第一世代の人工的シナプスオーガナイザーを用いて、デザインに基づく機能的特徴を発揮するか検証する。さらに「シナプス病」モデルマウスに投与し、神経回路・電気生理学的機能・行動異常が回復するか解析する。これらの課題達成を通し、神経回路への新規介入方法を確立し、機能的意義の理解および疾患治療への応用を目指す。

３．研究の方法

【課題１．新規デザイン】

人工的シナプスオーガナイザーは内因性 ESP である Cbln、C1qL、Pentraxin ファミリーにおける分子結合特異性を有するドメイン構造の組み合わせたキメラタンパク質としてデザインされる。このほか、AMPA、GABA 受容体に親和性を持つナノボディの配列や補体 C1q を用いたデザインを行う。第一にデザイン元となる各種分子の結合特異性や脳内の局在、回路特異性などを解析することで、どの回路において適用可能であるか検討する。デザインの基本構成として、2 種類のドメインをリンカー配列およびヘリックス構成配列でつないだキメラタンパク質を作成すること

で多量体構造を保持した人工的シナプスオーガナイザーを設計する。デザイン分子は分泌シグナル配列を付加した発現ベクターを培養細胞に導入し、培地中に分泌させ、濃縮および精製を行う。

【課題２．機能検証・疾患モデルマウスへの応用】

機能検証として、(1)結合特異性・親和性の解析、(2)シナプス形成能の評価、(3)疾患モデルへの応用、を行う。(1)では培養細胞またはセンサー板上で標的受容体と人工的シナプスオーガナイザーの相互作用を生じさせ、免疫細胞化学的手法または表面プラズモン分析法により結合度を解析する。(2)では着目する神経回路を含む脳部位から初代培養神経細胞・グリア細胞を取得し、標的受容体を発現させた培養細胞とともに共培養し、人工的シナプスオーガナイザーの処理によって、選択的なシナプス形成が検出できるか評価する。(3)では特定の神経回路が障害されたシナプス病モデルマウスを用いて人工的シナプスオーガナイザーが障害を回復するか検討する。具体的なモデルマウスとして、海馬シナプスが減少するアルツハイマー病モデルマウス、小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプスが減少する小脳失調モデルマウス、興奮性・抑制性神経回路のバランスが崩れているレット症候群モデルマウスを用いる。人工シナプスオーガナイザーを障害回路を有する脳部位に投与し、記憶や運動などの行動実験を行うとともに、組織化学的および電気生理学的に神経回路選択的に機能が変化したかを検討する。

４．研究成果

課題１ついて、NPTX ファミリー、補体 C1q、ナノボディに関する検討が遂行された。NPTX ファミリーである NPTX1,2,R の分子に対する抗体および遺伝子欠損動物が作成され脳内の局在や回路特異性について多くの新しい所見が得られた。補体 C1q については脳内の受容体に関する重要な所見が見いだされ、コンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン（CS-GAG）との相互作用が示唆された。結合特異性・親和性の解析により 2 糖当たりの硫酸化度が高い CS-GAG への結合が示され、細胞外マトリックスとの相互作用が示唆された。ナノボディを用いた設計に関し、生理活性を変化させず強い結合を示すδ2R に対するナノボディが選別され、機能拡張用システイン変異を導入し、精製を行った。これらパーツを用いた新規の人工的シナプスオーガナイザーの作製については途中段階で、機能保持の検証と脳内回路における局在を反映した合理的な設計が求められる。NPTX ファミリーに関しては 3 種類のファミリー分子が協調的に様々な神経回路に発現し、機能を発揮している所見が得られ、より詳細な機能発現機序を明らかにするためには 2 種、3 種の遺伝子欠損や神経回路特異的な条件的欠損マウスなどの作製が必要であり、そうした研究が進行中である。補体 C1q に関しては細胞外マトリックスという曖昧な構造を標的としていることがわかり、その結合原理を明らかにする必要に迫られた。本研究では各種の欠損マウスや結合アッセイにより硫酸化が重要であることを初めて明らかにされた。C1q はシナプス除去機能やアルツハイマー病の増悪因子という観点で非常に重要な分子であったが、その受容体は未解明であった。本結果については論文投稿準備中である。

課題２について、第一世代人工シナプスコネクターである CPTX のさらなる機能検証・疾患応用を試みた。CPTX の結合特異性について、Neurexin の各遺伝子、AMPA 受容体の各サブユニットへの結合性を解析し、投与した場合の脳内および脊髄内の詳細な局在が免疫組織学的手法および電子顕微鏡解析により解析された。疾患モデルに関して、小脳失調モデル、アルツハイマー病モデルに加えて、愛知医科大学・武内恒成教授との共同研究によって脊髄損傷モデルへの治療応用が遂行された。脊髄損傷は物理的に脊髄神経回路が破壊され、その回復には回路の再接続が必要である。驚くべきことに、CPTX を投与した脊髄損傷マウスは運動機能を早期に回復させ、大幅な機能回復を導いた。さらに重要なことに、損傷１週間後の投与においても十分な回復の効果が見いだされ、疾患治療のへ応用が期待できる結果を得た。本研究結果はデザインによってシナプス接続を任意に制御でき、様々な疾患への応用が可能であることを示した初めても研究であり、新たな概念を実証した意義のある研究となった。本研究は論文投稿中である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Kunimichi Suzuki, Wataru Kakegawa, Eriko Miura, Shintaro Otsuka, Alexander Dityatev, A. Radu Aricescu, Michisuke Yuzaki et al.	４．巻 -
２．論文標題 A synthetic synaptic organizer protein restores glutamatergic neuronal circuits	５．発行年 2020年
３．雑誌名 bioRxiv	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.02.27.967836	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Weilun Sun, Kunimichi Suzuki, Dmytro Toptunov, Stoyan Stoyanov, Michisuke Yuzaki, Leonard Khiroug and Alexander Dityatev	４．巻 -
２．論文標題 In vivo two-photon imaging of anesthesia-specific alterations in microglial surveillance and photodamage-directed motility in mouse cortex	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Frontier Neuroscience	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2019.00421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計7件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Kunimichi Suzuki, Ayumi Hayashi, Masahiko Watanabe, Michisuke Yuzaki
２．発表標題 Analysis of endogenous neuronal pentraxins as extracellular scaffolding proteins for AMPA
３．学会等名 CNRS - Jacques Monod conference（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 Kunimichi Suzuki
２．発表標題 Building a bridge over troubled synapses
３．学会等名 IINS talk "Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor Signalling "（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名
鈴木邦道, Weilun Sun, Stoyan Stoyanov, 武内恒成, Alexander Dityatev, 柚﨑通介

２．発表標題
補体C1qの脳内受容体の同定と機能解析

３．学会等名
第４０回神経組織培養研究会

４．発表年
2018年

１．発表者名
K. SUZUKI, J. ELEGHEERT, I. SONG, O. SENKOV, W. KAKEGAWA, E. MIURA, A. CLAYTON, R. KAUSHIK, A. DITYATEV, R. A. ARICESCU, M. YUZAKI

２．発表標題
Re-building bridges over scrapped synapses

３．学会等名
第3回S&B領域班会議

４．発表年
2018年

１．発表者名
鈴木邦道、松田恵子、柚﨑通介

２．発表標題
先端技術基盤支援によるシナプス形成分子の発現・局在・機能の包括的解析

３．学会等名
次世代脳冬のシンポジウム：先端技術基盤支援プログラム

４．発表年
2018年

１．発表者名
鈴木邦道

２．発表標題
人工シナプスコネクターによるシナプスのScrap & Build

３．学会等名
次世代脳冬のシンポジウム：新学術領域合同若手シンポジウム

４．発表年
2018年

１．発表者名 Kunimichi Suzuki
２．発表標題 Synapse assemblies by C1q and engineered C1q family protein
３．学会等名 3rd Young Glia meeting
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
人工興奮性シナプスコネクタとその脊髄損傷処置への使用	柚﨑通介、武内恒成、鈴木邦道	同左
産業財産権の種類、番号	出願年	国内・外国の別
特許、出願2020-2879	2019年	国内

〔取得〕　計0件

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	掛川　渉 (KAKEGAWA Wataru) (70383718)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授 (32612)	
研究協力者	三浦　会里子 (MIURA Eriko) (10571169)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員 (32612)	