

## 記憶治療薬開発のための記憶消去の分子メカニズム解明

生理学研究所 多細胞回路動態部門

山中 章弘

睡眠時に記憶がどのように制御されているのかについては、未だに良く分かっていない。本研究では、申請者が独自に同定した内容である、視床下部のメラニン凝集ホルモン産生神経(MCH神経)が睡眠中に記憶を消去する分子メカニズムについて明らかにすることで、記憶治療薬開発のために資することを目的としている。

MCH神経は、視床下部外側野に少数の細胞体が存在するが、そこから脳全体に幅広く投射する投射パターンを示し、中でも特に海馬に密に投射している。そこでMCH神経が記憶の制御にも関わっている可能性が考えられた。これを検討するために、MCH神経を特異的に脱落させたマウスを作成して新奇物体認識試験を用いて記憶を評価したところ、対照群マウスと比較して記憶力が向上していることを見いだした。さらに、光遺伝学、化学遺伝学を用いてMCH神経活動を操作したところ、MCH神経の活性化では記憶力が低下し、MCH神経の抑制では記憶力が向上した。また、ファイバーフォトメトリーを用いてMCH神経活動を記録したところMCH神経は覚醒時とレム睡眠時に活動が高くなることを見いだした。そこで、覚醒時に活動するMCH神経とレム睡眠時に活動するMCH神経のどちらが記憶消去に関わるのかを明らかにするために、脳波筋電図記録から睡眠覚醒状態をリアルタイムで判定し、Closed loopを用いて脳状態依存的にMCH神経活動を光遺伝学を用いて抑制したときに記憶に与える影響について検討を行った。その結果、レム睡眠中に活動するMCH神経が海馬において記憶消去に関わっていることを明らかにした(Izawa et al., Science 2019)。

MCH神経は、MCHだけでなく、グルタミン酸、コカイン・アンフェタミン調節転写産物(CART)などの複数の伝達物質を同時に産生し、活動に伴い同時に遊離している。これまでの研究では、MCH神経から遊離されるどの神経伝達物質が記憶消去に関与しているのかは明らかではなかった。そこでMCH神経から遊離されるどの伝達物質が記憶消去に直接関わっているのかについて、分子レベルで詳細に解明することを目的として以下の研究を行った。

まず、MCH神経において、それらの伝達物質を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成し、その記憶を評価することで、どの神経伝達物質が記憶消去に関わっているのかについて明らかにすることを試みた。MCH神経特異的に特定遺伝子を欠損させるために、MCH神経特異的にCreリコンビナーゼを発現するMCH-Creマウスと、Cre依存的に特定遺伝子を欠損するfloxedマウスを交配させる方法および、CRISPR/Cas9を用いてインビボゲノム編集することによってMCH神経細胞において特定遺伝子を欠損させる手法の両方を並行して行った。

まずは最も記憶消去に関わる可能性が高い神経伝達物質であるグルタミン酸について検討を

行った。MCH神経には、グルタミン酸をシナプス小胞に取り込むグルタミン酸小胞トランポーター遺伝子の1つであるvGLUT2遺伝子が発現しており、グルタミン酸の放出に寄与している。そこでvGLUT2遺伝子をMCH神経特異的に欠損させるために、vGLUT2-floxマウスとMCH-Creマウスを交配させて、MCH-Cre; vGLUT2<sup>flox/flox</sup>マウスを作成し、MCH神経だけでグルタミン酸の遊離ができなくなるマウスを作成し、新奇物体認識試験を用いて記憶を評価した。

新奇物体認識試験において、MCH-Cre; vGLUT2<sup>flox/flox</sup>ホモマウスは野生型マウスやMCH-Cre; vGLUT2<sup>flox/+</sup>ヘテロマウスと比較して非常に高い記憶能力があることを示した。このことは、MCH神経から遊離されるグルタミン酸が海馬において記憶消去に主に関わっている可能性を示唆している。

しかし、MCH-Cre; vGLUT2<sup>flox/flox</sup>ホモマウスでは、生後直ぐにvGLUT2が欠損するために、脳の発達に伴って様々な機能補償が生じる可能性がある。そこで、成熟後にゲノム編集を適用してvGLUT2を欠損させて記憶へ与える影響について検討を行った。そこで、Cre依存的にSpCas9を発現するマウスであるloxP-Stop-loxP-SpCas9(LSL-SpCas9)マウスをMCH-Creマウスと交配させてMCH-Cre; LSL-SpCas9マウスを作成し、vGLUT2に対するsgRNAを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを視床下部に投与して感染させ、インビボゲノム編集によってMCH神経特異的にvGLUT2遺伝子を欠損させることを試みた。事前に行ったインビボゲノム編集の検討では、MCH神経において、MCH遺伝子に対するsgRNAとCas9を発現させるとMCH遺伝子を欠損させることができることを確認している。そこでvGLUT2に対するsgRNAを発現するウイルスベクターを作成・精製し、視床下部に局所投与を行いMCH神経に感染させた。vGLUT2に対するsgRNAは2種類5' -CAGGTTACAGCGGATGCCGAAGG-3' (エクソン2)と5' -CGATCCGTGGATCATCCCCACGG-3' (エクソン3)の2種類を作成し、2種類を1:1で混ぜて同時に投与し発現させた。一方、対照群としてマウスには存在しない遺伝子であるLacZに対するsgRNAを発現するAAVを感染させた(5' -TGCGAATACGCCACGCGATGGG-3')。免疫組織化学的解析などを用いてMCH神経特異的な脱落とその程度について確認できた後に、floxマウスを用いたコンディショナルノックアウトマウスと同様に新奇物体認識試験を用いて記憶を評価し、MCH神経におけるグルタミン酸の記憶への影響について異なる手法において確認を行った。MCH神経特異的にvGLUT2を欠損させたマウスの記憶力は、対照群と比較して有意に向上していた。これらのことからMCH神経から遊離されるグルタミン酸が記憶消去に関わっていることが示唆された。

これまでの報告からMCH神経は代謝調節にも関わっていることが知られている。そこで、MCH神経特異的にvGLUT2遺伝子を欠損してグルタミン酸が遊離できないマウスであるMCH-Cre; vGLUT2<sup>flox/flox</sup>マウスを用いて体重測定、代謝測定を行った。MCH-Cre; vGLUT2<sup>flox/flox</sup>ホモマウス、MCH-Cre; vGLUT2<sup>flox/+</sup>ヘテロマウスおよび、MCH-Cre; vGLUT2<sup>+/+</sup>マウスの体重と代謝を測定した。しかし、これら3群間において体重差は認められなかった。また、O<sub>2</sub>消費量、CO<sub>2</sub>排出量についても検討したところ、これらのパラメータはいずれも3群間に差は認められなかった。これらのことから、MCH神経から遊離されるグルタミン酸は、海馬において記憶消去に関わっているが、体重調節や代謝調節には関わっていないことが明らかになった。

これらの結果から、MCH神経から遊離されるグルタミン酸が海馬において記憶消去に重要な役割を担っていることが明らかになった。今後は、これらの結果をまとめて論文として報告する予定である。これまでに、レム睡眠時に活動するMCH神経が海馬において記憶消去に関わっていることを見いだしていることから、MCH神経から遊離されるグルタミン酸が主に記憶消去に関わっている可能性が強く示唆されたことになる。今後は海馬においてMCH神経が入力する神経細胞の同定や、グルタミン酸が作用する受容体サブタイプの同定によって、記憶消去のための分子標的が明らかになり、それに対して創薬を行うことで記憶治療が可能になると考えられる。