

【目的】 本研究の目的は、自律神経の形成する神経回路を可視化するため、消化管を起点として脊髄における交感神経ネットワークを分子レベル、細胞レベルで同定する手法を開発することである。この技術は、交感神経ネットワークの機能的多様性を解明し、消化器の狙った機能だけを特異的に操作するような技術の基盤となり、将来的には内臓機能の不調を原因とする多くの疾患や損傷の治療戦略にも貢献するものである。この目的のため、中枢神経系で利用されているトランスシナプス標識法を末梢神経系に応用するための新規マウス系統の開発と機能評価を実施した。

【方法】 交感神経系に特異的な標識を実現するため、交感節後ニューロンに発現するドーパミンβ水酸化酵素 (*Dopamine beta hydroxylase, DBH*) の遺伝子座に薬剤タモキシフェン誘導型の *CreER^{T2}* 遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により導入する遺伝子操作を行った。得られた産仔を PCR により遺伝子型決定し、Cre 依存的に TdTomato 赤色蛍光レポーターを発現する *Ai9* マウスと交配し、幼若期にタモキシフェンを導入して Cre 活性を誘導した。また、Cre 依存的に狂犬病ウイルストランスシナプス標識法を駆動するため、新規にマウス第 8 番染色体に位置する *Tightly Regulated (TIGRE)* 遺伝子座に rabies glycoprotein, TVA 受容体、および核局在型赤色蛍光たんぱく質 nuc-mCherry を共発現するトランスジェニックマウスを CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により作出した。このマウスは *Ai162* マウスの遺伝子座を改変することで作出したので、以後 *Ai162-nCTG* と呼称する。新規トランスジェニックマウスの性能を評価するため、Cre 組換え酵素を発現するアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus, AAV) を運動野に導入して狂犬病ウイルスを感染させ、トランスシナプス標識が起きるかどうかを調べた。

【結果】 *DBH-CreER^{T2}* マウスはノックイン効率約 80% で組換え体を得た。雄 3 匹から系統を樹立し、*Ai9* との掛け合わせにより二重陽性個体を得て、生後 15~18 日目にタモキシフェンを投与した。その結果、DBH 陽性と知られる青斑核や本研究の標的である上腸間膜神経節に多数の tdTomato 陽性細胞が得られた。一方、新生児期に異所的発現が知られている脊髄には標識はみられなかった。従って、交感節後ニューロン特異的な標識系が確立されたといえる。*Ai162-nCTG* マウスに関しては、ノックイン効率は 1.2% だったものの、一匹の組換え体を得ることができた。これを繁殖させ、F1 世代において大脳皮質運動野 (M1) に Cre を発現する AAV を導入し、10 日後に狂犬病ウイルスツールを導入したところ、M1 に多数の starter cells が形成され、既知のシナプス前構造である対側の運動野、同側の体性感覚野、同側の視床などに多数の狂犬病ウイルス標識細胞が現れた。この結果は、Cre 依存的に効率よく狂犬病ウイルストランスシナプス標識法を駆動することのできるトランスジェニックマウスの作出に初めて成功したものであり、*DBH-CreER* と組み合わせることで臓器を起点とした交感神経経路の特異的な標識法の構築を可能とするものである。

本研究で実装を目指した Organ-initiated two-step trans-synaptic labeling of sympathetic pathway (O2TLS) 法

