178　新生仔脳の生体観察による神経回路形成機構の解明	水野　秀信

【目的】生後発達期において、大脳皮質感覚野第 4 層の神経回路は、感覚器からの入力によって成熟する。第 4 層神経回路の成熟は正確な感覚入力処理の基盤であるため、そのメカニズム解明は医学・生物学における最も重要な課題の 1 つである。これまでの研究で、私はマウス体性感覚野をモデルとして用い、生体新生仔における 2 光子顕微鏡観察法を開発することで、第 4 層回路成熟の分子メカニズムの一端を解明した。一連の研究により、第 4 層細胞樹状突起は正しい感覚入力を伝える軸索を探索していること、および神経回路形成・記憶等に関与する NMDA 受容体が樹状突起ダイナミクスを制御することで樹状突起分枝パターンが形成されることが示された。

しかし、生体において樹状突起ダイナミクスを制御する細胞内分子シグナリングは、NMDA 受容体の他に関わる分子が不明なため、明らかでなかった。これを解決するため、近年我々は生体の大脳皮質内で個々の細胞を標識し、同時に任意の遺伝子を抑制するシステムを開発した。本研究の目的は、本システムを用いたスクリーニングにより、樹状突起ダイナミクスに関わる未知の分子を同定する事であった。また同定される分子と NMDA 受容体の関連を調べ、NMDA 受容体がどのような分子シグナリングにより樹状突起ダイナミクスを制御するかを解明することであった。

【方法】本研究は、生体遺伝子導入法（子宮内電気穿孔法）・組織学的手法・新生仔脳 2 光子顕微鏡イメージング法等を組み合わせ行った。

【結果】

1. 大脳皮質第 4 層神経回路形成に関わる分子のスクリーニング

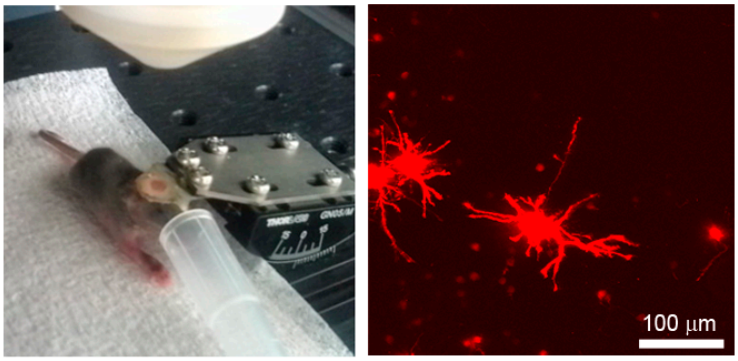
NMDA 受容体関連分子群を標的とした遺伝子抑制ベクターを作成し、固定組織切片において、遺伝子抑制による樹上突起形態変化の有無を確認した。ある分子を阻害した細胞において、樹状突起の枝分かれが変化することを見出した。

2. 第 4 層神経細胞の生体 2 光子イメージング

当初の研究計画では、同定された分子を阻害した第 4 層細胞を生体 2 光子イメージングし、樹状突起ダイナミクスの変化を調べる予定であった。しかし本研究期間に、熊本大学国際先端医学研究機構で研究室をスタートすることになった。移動に伴い、研究で使用する予定であった 2 光子顕微鏡と遺伝子組換え動物を移動する必要が生じた。そのため、研究期間内に同定された分子を阻害した細胞をイメージングすることはできなかった。

現在までに、顕微鏡と組換え動物の移動を終え、新しい環境での 2 光子イメージングの立ち上げに成功し、移動に伴う研究の遅れは最低限に抑えることができた。今後スクリーニングで同定された分子を阻害した細胞をイメージングする予定である。なお、移動の期間中にはイメージング法についてまとめた論文を発表した。

新生仔大脳皮質 2 光子イメージングによる樹状突起ダイナミクスに関わる分子のスクリーニング



178. 新生仔脳の生体観察による神経回路形成機構の解明

水野　秀信

*情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門

Key words：二光子顕微鏡，単一細胞イメージング，大脳皮質，発達期

緒　言

生後発達期において大脳皮質感覚野第 4 層の神経回路は、感覚器からの入力によって成熟する。第 4 層神経回路の成熟は正確な感覚入力処理の基盤であるため、そのメカニズム解明は医学・生物学における最も重要な課題の 1 つである。しかし生きた個体においては、第 4 層神経回路の経時的成熟過程、およびダイナミックに起こる回路形成の分子・細胞メカニズムは、不明な点が多い。

これまでの研究で、私は体性感覚野第 4 層の神経回路（図 1A）をモデルとして用い、生体新生仔における 2 光子顕微鏡観察法を開発することで、第 4 層回路成熟の分子メカニズムの一端を解明した［1］。まず、独自開発の生体内の一部の細胞で任意遺伝子を発現可能なシステム（Supernova 法）を子宮内電気穿孔法で導入し、第 4 層細胞をまばらに蛍光標識した（図 1B）。次に、新生仔脳 2 光子観察法を開発し、標識細胞をタイムラプス観察した。一連の研究により、第 4 層細胞樹状突起は正しい感覚入力を伝える軸索を探索していること、および神経回路形成・記憶等に関与する NMDA 受容体が樹状突起ダイナミクスを制御することで樹状突起分枝パターンが形成されることが示された（図 1C）。

しかし、生体において樹状突起ダイナミクスを制御する細胞内分子シグナリングは、NMDA 受容体の他に関わる分子が不明なため、未だに明らかでない。これを解決するため、近年我々は Supernova 法により標識された細胞で、同時に遺伝子抑制（RNAi）もしくは遺伝子編集（遺伝子ノックアウト）するシステムを開発した［2］。

本研究の目的は、これを用いたスクリーニングを行い、樹状突起ダイナミクスに関わる未知の分子を同定する事であった。また同定される分子と NMDA 受容体の関連を調べ、NMDA 受容体がどのような分子シグナリングにより樹状突起ダイナミクスを制御するか解明することを目指すものであった。

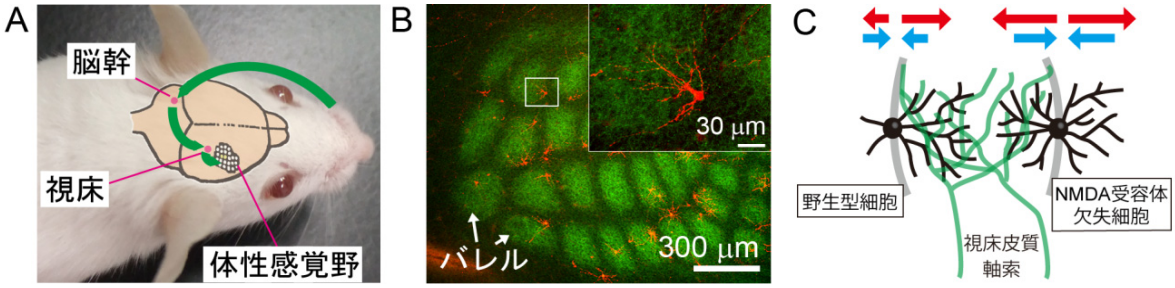


図 1. 大脳皮質体性感覚野第 4 層神経回路の生体イメージング

A) ヒゲ感覚は、脳幹と視床を経由し、体性感覚野第 4 層へ伝えられる。体性感覚野にはヒゲの配置と対応した組織学的構造（バレル）が存在している。各バレルは対応したヒゲからの感覚入力を処理する。

B) 第 4 層神経回路の生体内蛍光標識。視床皮質軸索で GFP を発現するマウスを作成した。また、第 4 層神経細胞は Supernova 法で RFP 標識した。右上図は四角部の拡大図。

C) 樹状突起は伸縮しながら視床皮質軸索側に枝を広げる。NMDA 受容体による樹状突起安定化が枝を軸索側に広げることに必要である。赤および青矢印は伸縮の大きさを示す。

*現在の所属：熊本大学 国際先端医学研究機構

方　法

本研究は、生体遺伝子導入法（子宮内電気穿孔法）・組織学的手法・新生仔脳 2 光子顕微鏡イメージング法等を組み合わせ行った。以下に詳細をまとめる。

1.　生体遺伝子導入法を用いた大脳皮質神経細胞における遺伝子抑制

胎生 14 日齢マウスに子宮内電気穿孔法を適用することで、体性感覚野第 4 層の興奮性細胞に Supernova ベクターシステムを導入し、候補遺伝子を抑制（RNAi もしくは遺伝子編集）した（図 2A）。具体的には以下の遺伝子発現ベクターを導入した［2］。

・Supernova による遺伝子ノックダウン（RNAi）

ベクター①『TRE-Cre』（一部の細胞で確率的に遺伝子組換え酵素 Cre を発現する）

ベクター②『CAG-loxP-STOP-loxP-RFP-ires-tTA』（Cre 発現細胞で RFP と tTA を発現する）

ベクター③『CAG-loxP-STOP-loxP-mir30』（Cre 発現細胞で標的遺伝子を RNAi する）

・Supernova による遺伝子編集

ベクター①『TRE-Cre』（一部の細胞で確率的に遺伝子組換え酵素 Cre を発現する）

ベクター②『CAG-loxP-STOP-loxP-RFP-ires-tTA』（Cre 発現細胞で RFP と tTA を発現する）

ベクター③『U6-gRNA; CAG-loxP-STOP-loxP-Cas9』（Cre 発現細胞で標的遺伝子を編集する）

2.　組織学的解析による大脳皮質神経回路形成に関わる分子のスクリーニング

Supernova 法を導入した生後 6 日齢マウスの脳切片を作成し、RFP 標識された体性感覚野第 4 層細胞を共焦点顕微鏡で撮影した。撮影した細胞の樹状突起の全長・分枝長を計測した。また、バレル内部・外部に配置する枝の長さをそれぞれ計測し、内部に配置する割合（内向き方向性）を計算した。

3.　候補分子の 2 光子イメージングによる解析

組織学的解析で選別した分子を抑制した体性感覚野第 4 層細胞におけるダイナミクスの変化を調べるため、2 光子タイムラプスイメージング法を使用した（図 2B）［1，3］。具体的には、まず生後 5 日齢マウスの頭部に脳内観察用窓および頭部保持用のカスタムメイド小型チタンバーを取り付けた。次に 2 光子顕微鏡を用い、麻酔下において体性感覚野第 4 層の神経細胞を経時的に生体タイムラプス観察した。

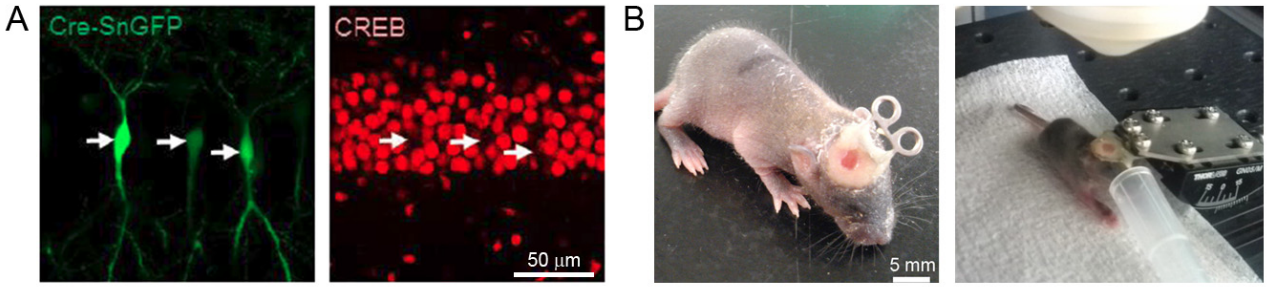


図 2.　Supernova を用いた遺伝子抑制と、新生仔大脳皮質の 2 光子イメージング

A）Supernova による遺伝子抑制の例。GFP 標識した海馬神経細胞において、記憶に関与する遺伝子である CREB を阻害した（矢印）。（Luo et al., Sci Rep 2016 より改変）

B）（左）頭部に脳内観察用窓および頭部保持用のカスタムメイド小型チタンバーを取り付けた生後 5 日齢マウス。

（右）イメージングステージに固定したマウス。イメージング中は、チタンバーによって頭部を固定し、イソフルランガスで麻酔した。（Mizuno et al., Neuron 2014 より改変）

結　果

1. 大脳皮質第 4 層神経回路形成に関わる分子のスクリーニング

まず、NMDA 受容体関連分子群を標的とした遺伝子抑制ベクターを 24 種作成し、これらを子宮内電気穿孔法により体性感覚野第 4 層興奮性細胞に導入した（図 3A）。次に、固定組織切片において、遺伝子抑制による樹状突起形態変化の有無を確認した。ある標的分子（Gene B、未発表）を阻害した第 4 層細胞において、樹状突起の枝分かれパターンが変化することを見出した（図 3B）。

2. 第 4 層神経細胞の生体 2 光子イメージング

当初の研究計画では、Gene B を阻害した第 4 層細胞を生体 2 光子イメージングし、樹状突起ダイナミクスの変化を調べる予定であった。幸いなことに、上原記念生命科学財団の研究奨励金を受けたことを含む成果が評価され、本研究の研究期間に、熊本大学国際先端医学研究機構（IRCMS）で研究室をスタートすることになった。移動に伴い、研究で使用する予定であった 2 光子顕微鏡と遺伝子組換え動物を移動する必要が生じた。そのため、研究期間内に Gene B を阻害した細胞をイメージングすることはできなかった。

現在までに、顕微鏡と組換え動物の移設を終え、新しい環境での 2 光子イメージングの立ち上げに成功し（図 3C）、移動に伴う研究の遅れは最低限に抑えることができた。今後 Gene B を阻害した細胞をイメージングする予定である。なお、移動の期間中にはイメージング法についてまとめた論文を発表した［3］。

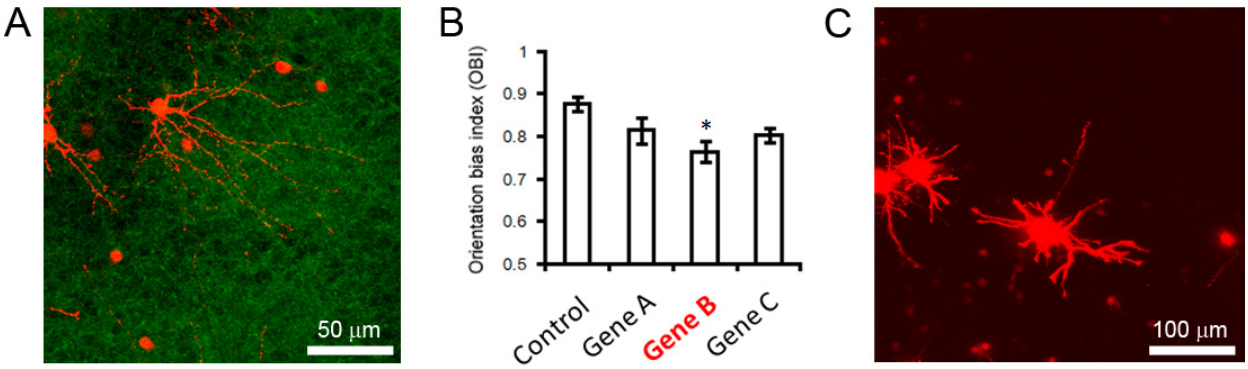


図 3. Supernova を用いた遺伝子抑制を用いたスクリーニングと、新生仔大脳皮質の 2 光子イメージング

A) 遺伝子抑制ベクターを発現させた、大脳皮質第 4 層神経細胞の例。図の細胞はコントロールベクターを発現させたため、樹状突起の大部分は正常通りバレル内（緑色部）に配置している。

B) スクリーニングの定量結果の例。Gene B を抑制した細胞では、バレルの内部に配置する樹状突起の割合（Orientation bias index: OBI）が優位に低下した（$p = 0.005$, Dunnet test）。この表現型は NMDA 受容体阻害細胞の表現型と一致している。

C) 移動後に取得した 2 光子顕微鏡画像。問題なく第 4 層細胞をイメージングできた。

考　察

1. 本研究で用いたスクリーニング法の利点

神経科学を含むあらゆる研究の進展において、遺伝子組換え動物の使用は有効である。しかし、遺伝子組換え動物の維持および管理は、高い費用と長い期間が必要なため、多数分子のスクリーニング実験を行うことが極めて難しい。本研究で用いた方法の利点は、野生型動物を用い分子スクリーニング行うことが可能な点である。また、遺伝子組換え動物を用い複数遺伝子を阻害するためには、通常複数ラインのマウスを維持・交配する必要があり、長い交配期間と高いコストが必要となる。本研究で用いる方法は、多種類のベクターを混ぜ遺伝子導入することで容易に複数遺伝子の発現・阻害が可能である［2］。

2. 遺伝子阻害細胞の 2 光子顕微鏡イメージング

これまでの研究により、NMDA 受容体を阻害した細胞において樹状突起ダイナミクスが亢進する事が示されている［1］。今回同定された分子が NMDA 受容体と同じ分子シグナリング上に存在するのであれば、同様の表現型を示す可能性がある。

近年我々は、生体新生仔において細胞形態イメージングだけでなくカルシウムイメージングを行うことに成功した［4］。本研究で同定された分子は、第4層細胞の樹状突起形成だけでなく、神経活動様式にも関与するかもしれない。今後、Gene Bを阻害した細胞を2光子顕微鏡カルシウムイメージングすることにより、神経活動様式との関連も明らかにできると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である、情報・システム研究機構国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門の岩里琢治教授に感謝いたします。また移動に伴う研究室立ち上げをご支援頂いた、熊本大学国際先端医学研究機構の須田年生機構長と、滝澤仁副機構長に感謝いたします。

文　献

1） Mizuno H., Luo W., Tarusawa E., Saito YM., Sato T., Yoshimura Y., Itohara S., Iwasato T. NMDAR-regulated dynamics of layer 4 neuronal dendrites during thalamocortical reorganization in neonates. Neuron 82, 365-379 (2014) PMID: 24685175 DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.026

2） Luo W, Mizuno H, Iwata R, Nakazawa S, Yasuda K, Itohara S, Iwasato T. Supernova: A versatile vector system for single-cell labeling and gene function studies in vivo. Scientific Reports 6, 35747 (2016) PMID: 27775045 DOI: 10.1038/srep35747

3） Mizuno H, Nakazawa S, Iwasato T. In vivo two-photon imaging of cortical neurons in neonatal mice. Journal of Visualized Experiments 140, e58340 (2018). PMID: 30394388 DOI: 10.3791/58340

4） Mizuno H, Ikezoe K, Nakazawa S, Sato T, Kitamura K, Iwasato T. Patchwork-Type Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex Layer 4 Transmitted via Thalamocortical Projections. Cell Reports 22, 123-135 (2018) PMID: 29298415 DOI: 10.1016/j.celrep.2017.12.012