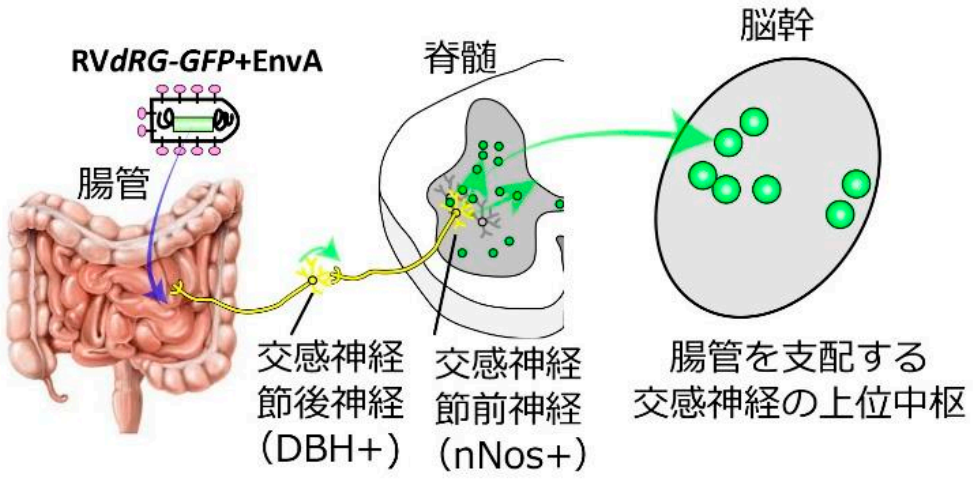
53　交感神経機能コネクトームの分子遺伝学的解析	宮道　和成

【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



53. 交感神経機能コネクトームの分子遺伝学的解析

宮道　和成

理化学研究所 生命機能科学研究センター 比較コネクトミクス研究チーム

Key words：交感神経，脊髄，消化管，トランスシナプス標識法，ノックインマウス

緒　言

脳は運動系と自律神経系という大別して二種類の神経系を用いて出力を行う。前者は全身の骨格筋に張り巡らされた運動神経を通じて筋収縮のパターンを制御し複雑な運動を可能にするのに対し、後者は消化や循環といった基本的な生理機能を司る内臓を制御する。自律と呼ばれるのは、これら多くの機能が意識的に制御できず、視床下部、脳幹、脊髄、臓器の連携のもとで自律的に調整されるからである。運動-骨格筋の制御系に関する研究が近年の分子遺伝学的な手法の導入により大いに発展しているのに比較して、自律神経については古典的な伝達物質の記述やトレーサー大雑把な神経回路の理解から発展していない面が多かった。しかしここ数年、分子遺伝学的手法を導入した成功例が少しずつ蓄積され、自律神経系の理解を大きく前進させる機運が高まっている。本研究は自律神経の形成する神経回路を可視化する手法として、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ことを目指した。この目的のために、新規に二種類のトランスジェニックマウス系統を樹立し、目的通りに作動することを確認した。ここで開発する技術は、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るものである。またこの技術は消化機能のみならず，個体や種の存続に必須の生体機能がどのように調整されているのかという神経科学における基本的な課題を前進させるとともに、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。

方法および結果

1. *DBH-CreER*マウスの作出

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}遺伝子を導入した。通常の Cre ではなく薬剤耐性型としたのは、胎児期の脊髄に *DBH* 遺伝子の一過的な異所発現が知られていたためである［1］。このノックインマウスでは DBH の機能を損なわないようにするため、3'非翻訳領域に *internal ribosome entry site*（*IRES*）を用いて *CreER*^{T2}をつなぐ形とし、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により C57BL/6 の受精卵に対して遺伝子操作を行った。38 匹の Fo 産仔を得て PCR により遺伝子型を決定したところ、31 匹が正しい組換え体だった（ノックイン効率は約 80%）。雄 3 匹から系統を樹立し、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、生後 15～18 日目にタモキシフェンを投与して Cre 活性を誘導した。

まず陽性対照として脳におけるノルアドレナリン作動性ニューロンが集積する脳幹の青斑核の組織切片を抗DBH抗体で染色し、Cre の組換えを表す tdTomato の赤色蛍光と比較した（図 1、写真 1）。tdTomato 陽性細胞はほぼすべて DBH 陽性で、逆に DBH 陽性細胞はほぼすべて tdTomato 陽性となり、両者は非常に高い一致度を示したことから、中枢において *DBH-CreER*^{T2}マウスはノルアドレナリンニューロン特異的な Cre 活性の誘導系として優れた性質をもつことが明らかになった。次に、本研究の標的となる腸管を支配する交感節後神経の細胞体が集積する上腸間膜神経節の組織切片を作製して観察したところ、青斑核と同様に tdTomato の発現は DBH に非常によく一致した。重要なことに、本プロトコールにおいて胎生期に一過的な *DBH* の異所発現が報告されている脊髄［1］に tdTmato の発現は全く

見られなかった。これらのデータから、本研究で作出した *DBH-CreER^{T2}*マウスが末梢神経系においては交感節後ニューロンの特異的な誘導型 Cre 発現マウスとして有用であることが示された。

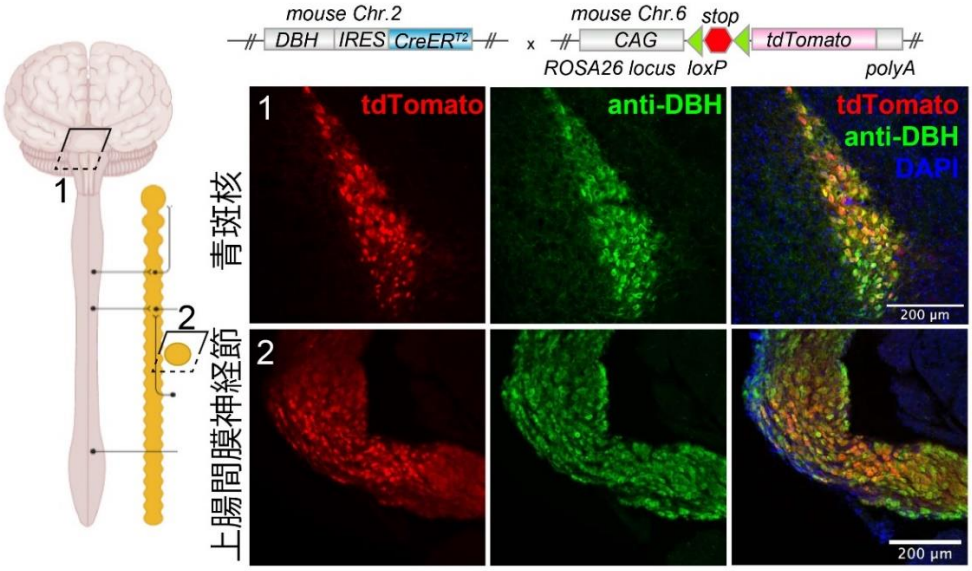


図 1. *DBH-CreER^{T2}*マウスの作出と作動の確認

上部に遺伝子コンストラクトを模式的に示した。マウス第二染色体に存在する *DBH* 遺伝子座に *CreER^{T2}*をノックインしたマウスと、マウス第六染色体 *ROSA26* 遺伝子座に存在する Cre 依存的に tdTomato を発現するトランスジェニックマウスを交配して二重陽性の F1 個体に対し、生後 15～18 日目に誘導薬剤タモキシフェンを腹腔投与した。青斑核（模式図および写真の 1 で示す）は DBH 陽性のノルアドレナリン作動性ニューロンの起始核で陽性対照として観察した。模式図及び写真の 2 で示す上腸膜神経節は腸管を支配する交感節後ニューロンの細胞体が集積した神経核である。いずれの領域でも、抗 DBH 抗体（緑）で染色される細胞と tdTomato 陽性細胞は高い一致度を示し、作出した *DBH-CreER^{T2}*マウスが目的細胞に高い特異度と効率で Cre 組換えを導入できることを明らかにした。スケールバー：200 μm。

2. *Ai162-nCTG* マウスの作出

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、米 Jax 研究所より *ROSA26* 遺伝子座に *CAG* promoter から rabies glycoprotein と TVA receptor を発現する *stop-GT*マウス［2］を購入した。視床下部弓状核の Kisspeptin-1 発現細胞を標識する *Kiss1-Cre*マウスや腸管上皮を標識する *Vilin1-Cre*マウスと交配し、二重陽性個体に EnvA にて偽型化した狂犬病ウイルス（Rabies-dG-GFP+EnvA［3］）を導入したが、まったくトランスシナプス標識は見られなかった。Rabies glycoprotein を抗体染色したが何も検出されず、*stop-GT*マウスから十分量のトランスジーンが Cre 依存的に発現している証拠が得られなかった。

そこで新規に Cre 依存的に 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作製することにした。マウス第 8 番染色体に位置する *Tightly Regulated*（*TIGRE*） 遺伝子座から Cre 依存的に Ca^{2+}指示薬たんぱく質 GCaMP6s を発現する *Ai162*マウス［4］の遺伝子座を CRISPR-Cas9 を用いて改変することで作出した。このマウス系統を *Ai162-nCTG* と命名した。78 匹の Fo 産仔を得て PCR 法によりスクリーニングを行った。2 匹が 5’- 3’-組換えアームを正しく持つ組換え体だったが、そのうち 1 匹はノックインしたトランスジーンが内部で破損しており、真に目的の構造をもつ組換え体は 1 匹だけだった（ノックイン効率は 1.2%）。この個体についてサンガーシークエンス法によりノックインしたトランスジーンが正常に組み込まれていることを確認した。

次に新規トランスジェニックマウスの性能を評価するため、*Ai162-nCTG* マウスを繁殖させ、F1 世代において大脳皮質運動野（M1）に Cre を発現するアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus：AAV）を導入し、10 日後に GFP を発現する狂犬病ウイルスベクターを導入した（図 2A）。導入箇所の M1 の組織切片を観察すると、Ai162-nCTG マウス由来の nuc-mCherry 陽性の細胞核が多数見出され、その一部が狂犬病ウイルスに由来する GFP を共発現していた。mCherry と GFP の二重陽性細胞はその内部で新規に狂犬病ウイルスベクターを増幅する能力を有することから starter cells と呼ばれる。導入箇所である M1 から遠く離れた部位を観察すると、M1 のシナプス前構造として知られている対側の運動（contra-M1）、同側の体性感覚野（S1）、同側の視床運動関連領域（ventrolateral thalamus：VL）などに多数の狂犬病ウイルスに由来する GFP 標識細胞が現れた（図 2B、C）。標識細胞数は従来のアデノ随伴ウイルスをヘルパーウイルスとして用いる手法［3］に比較して多く得られるとの心証を得た。これらの結果は、中枢神経系において 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る。

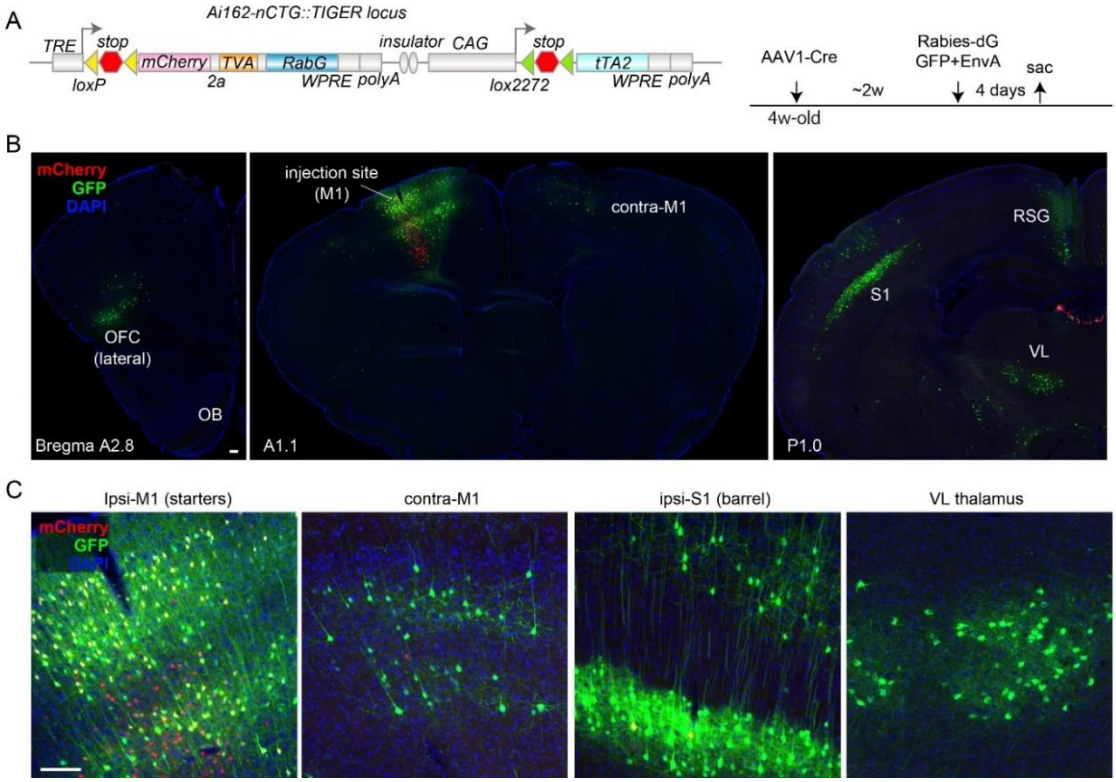


図 2. *Ai162-nCTG* マウスを用いたトランスシナプス標識の作動確認

A） コンストラクトの模式図と実験のタイムラインを示す。Ai162-nCTG マウスは既存の *Ai162* マウスの *GCaMP6* を *nuc-mCherry-2a-TVA-2a-RabG* カセットに置換して作製されている。この遺伝子は *TRE*（tetracycline responsive element）の制御下に Cre 依存的に駆動される。このトランスジェニックマウスは insulator 配列によって隔てられた 3'側に Cre 依存的に *CAG* promoter から tTA2（トランス活性化転写因子）を発現する設計となっている。4 週齢の *Ai162-nCTG* マウスの運動野 M1 領域に Cre を構成的に発現する AAV serotype 1 を導入し、約二週間後に GFP を発現する狂犬病ウイルスベクター Rabied-*dG-GFP*+EnvA を導入し、4 日後に解剖した。

B） Bregma から前方（A）2.8 mm、1.1 mm、及び後方（P）1.0 mm の脳冠状切片（30 μm）の蛍光顕微鏡像を示す。ウイルス導入部位以外 GFP 陽性細胞が多数みられた領域を示した。略称は以下の通り。OFC：orbitofrontal cortex（眼窩前頭皮質）、OB：olfactory bulb（嗅球）、M：motor cortex（運動野）、S：somatosensory cortex（体性感覚野）、RGS：granular retrosplenial area（後部帯状皮質）。スケールバー：100 μm。

C） 代表的な脳領域の蛍光顕微鏡像を拡大して示す。スケールバー: 100 μm。

考　察

神経回路の接続マップはすべての発生や機能に関する研究の基盤である。本研究は、自律神経系に分子遺伝学的な神経科学ツールが導入されつつある世界の趨勢に呼応し、初めて任意の臓器を制御する交感神経系の経路を効果器から脊髄までシナプスを経て逆行性に標識し、その構造、細胞構成、機能の解明を目指した。交感神経は脊髄の細胞体から遠く離れた効果器（臓器）までにシナプスを乗り換えて投射するため、非常に基礎的な構造上の問題が多く未解明である。例えば、異なる臓器を支配する交感神経の節前ニューロンは脊髄のどこに分布するのか？個々の交感節前ニューロンは特定の臓器のみを専属的に支配するのか、それとも複数の臓器をまとめて制御するのか？特定の臓器を支配する交感節前ニューロンにはユニークな遺伝子マーカーが存在し、特異的な操作が可能なのか？といった長年の疑問に明瞭な回答を与えるための基盤を本研究は提供するものである。さらに、本研究の成果を起点としてもう一段階上流のプレ交感節前ニューロンを可視化する技術を組み立てることにより、交感神経の活動を上位に支配する脊髄や脳幹の回路はどのような構造で、それぞれのニューロン群がどのような機能を持つのか、多くの研究領域を切り開くことができると考えられる。交感神経系の制御は、心拍、立毛（鳥肌）、発汗、免疫機能（脾臓、リンパ節）、排泄、生殖器と広範に及ぶことから、それぞれの臓器機能の選択的な制御系は非常に多くの生命現象の理解に資する基盤技術となることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究において作出したマウスは、理化学研究所生命機能科学研究センター生体モデル開発チームの清成寛博士、阿部高也博士、及び同・比較コネクトミクス研究チーム技術員の萩原光恵氏との共同開発である。*DBH-CreER*^{T2}マウスの解析は同比較コネクトミクス研究チームの播磨有希子博士との共同研究である。

文　献

1） Matsushita N, Kobayashi K, Miyazaki J, Kobayashi K. Fate of transient catecholaminergic cell types revealed by site-specific recombination in transgenic mice. J Neurosci Res. 2004 Sept 17;78(1):7-15. PMID:15372500 DOI: 10.1002/jnr.20229.

2） Takatoh J, Nelson A, Zhou X, Bolton MM, Ehlers MD, Arenkiel BR, Mooney R, Wang F. New modules are added to vibrissal premotor circuitry with the emergence of exploratory whisking. Neuron, 2013 Jan23; 77(2):346-60. PMID: 3559006 DOI: 10.1016/j.neuron.2012.11.010.

3） Miyamichi K, Shlomai-Fuchs Y, Shu M, Weissbourd BC, Luo L, Mizrahi A. Dissecting local circuits: parvalbumin interneurons underlie broad feedback control of olfactory bulb output. Neuron, 2013 Dec 4;80(5):1232-45. PMID: 3932159 DOI: 10.1016/j.neuron.2013.08.027.

4） Daigle TL, Madisen L, Hage TA, Valley MT, Knoblich U, et al. A Suite of Transgenic Driver and Reporter Mouse Lines with Enhanced Brain-Cell-Type Targeting and Functionality. Cell 2018 Jul 12;174(2):465-480. PMDI: 30007418 DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.035.