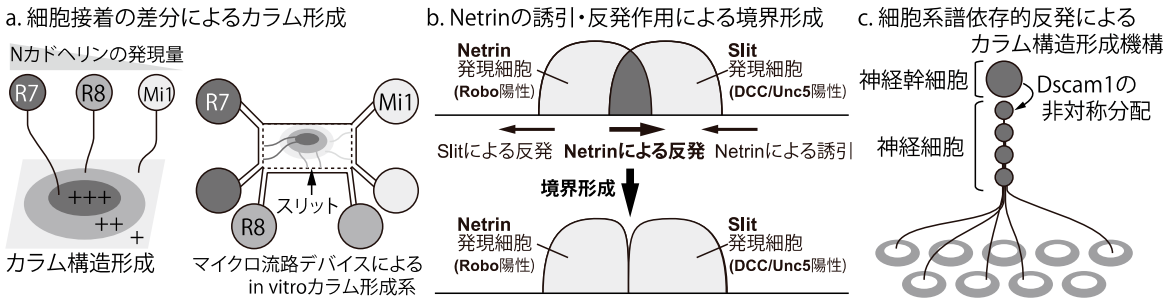
82　脳神経回路の再構成技術の開発	佐藤　純

【目的】生物は様々な遺伝子や分子の役割によって自発的に機能的な脳を生み出す。実際の脳の形成過程を制御するメカニズムについては発生生物学的な研究によって明らかにされ、得られた知見をもとに、実際の脳組織を作り出す構成生物学的研究が注目されている。分化細胞の働きに着目し、個々の細胞の働きを操作することによって目的の組織を作り出す、ボトムアップ的なアプローチが重要であり、これによって例えば人工的にデザインした神経回路に計算をさせる、というような技術が可能になると期待される。多数の神経細胞が集積することで脳の緻密な神経回路が形成されるが、この時、複数の神経細胞が円柱状に集積してカラム構造と呼ばれる脳の機能単位を形成し、複数のカラムが規則正しく集積することで脳の機能が実現する（下図）。我々はショウジョウバエの脳をモデル系として、複数の神経細胞が自発的に集合してカラム構造を形成するメカニズムを研究している。ハエの脳においては 100 程度の神経細胞が集積してカラム構造を形成し、様々な遺伝子の働きを自在に操作することができる。我々はこれまでに細胞接着因子である N カドヘリン、軸索走行制御因子の Netrin、ダウン症の原因因子であり反発性因子である Dscam1 による *in vivo* におけるカラム形成機構を解明してきた。しかし、複数の神経細胞の接着や反発によってカラム構造が形成される過程を直感的に理解することは困難である。共同研究者の Carrillo と村川が研究してきた細胞の運動についての数理モデルはカラム構造の形成過程と親和性が高く、これまでに神経細胞間の接着力の差によって自発的にカラム構造が形成される仕組みを明らかにしてきた。本研究ではこれらの知見をもとに、*in vitro* でカラム構造を再構成することを目的とする。N カドヘリン、Netrin、Dscam1 といった分子を発現する神経細胞を培養し、神経突起がドーナツ状のカラム構造、細胞集団間の境界、カラムの等間隔配置を再現する技術を確立することを目指す（下図）。

【方法】市販のマイクロ流路デバイス中でハエの視神経および脳神経細胞を培養し、神経軸索がデバイス中のスリットを通過し、カラム様の構造を形成する条件を探索した。一方、細胞接着および反発による細胞間の相互作用を組み込んだ数理モデルによってカラム構造の形成過程を再現する数理モデルを構築し、*in vitro* における実験結果とコンピューターシミュレーションの結果をすり合わせるための基盤を構築した。

【結果】マイクロ流路デバイス中でハエの神経軸索を伸長させるプロトコールを考案し、これを用いて視神経細胞の培養と軸索の伸長を確認した。しかし、デバイス中のスリットを通過するほどの長距離の伸長を確認することは出来なかった。一方、細胞間の接着力と反発力を組み合わせた数理モデルにより、カラムの 6 角形配置を再現することに成功した。*in vivo* においては細胞間の接着力を弱めると、6 角形配置が 4 角形配置に変化することを見出しているが、同様な変化を再現するための条件を見出した。

細胞間相互作用によるカラム形成機構



82. 脳神経回路の再構成技術の開発

佐藤　純

金沢大学 新学術創成研究機構

Key words：人工神経回路，カラム構造，軸索走行，マイクロ流路デバイス

緒　言

生物は様々な遺伝子や分子の役割によって自発的に機能的な脳を生み出す。実際の脳の形成過程を制御するメカニズムについては発生生物学的な研究によって明らかにされ、得られた知見をもとに、実際の脳組織を作り出す構成生物学的研究が注目されている。特にES細胞やiPS細胞など多能性幹細胞から大脳や小脳などの脳組織を生み出す技術についての研究が国際的に活発である。これらの技術は幹細胞を起点とする自己組織化によってマクロレベルの脳組織を作り出すため、様々な疾患の発症機構の解明や治療法の開発において重要となる。この様なトップダウン的手法とは逆に、分化細胞の働きに着目し、個々の細胞の働きを操作することによって目的の組織を作り出す、ボトムアップ的なアプローチも重要であり、これによって例えば人工的にデザインした神経回路に計算をさせる、というような技術が可能になると期待される。トップダウンおよびボトムアップ的アプローチは相補的に働くことで相乗効果が期待されるが、ボトムアップ的アプローチによって脳を構築する研究はほとんど進んでいない。

多数の神経細胞が集積することで脳の緻密な神経回路が形成されるが、この時、複数の神経細胞が円柱状に集積してカラム構造と呼ばれる脳の機能単位を形成し、複数のカラムが規則正しく集積することで脳の機能が実現する（図1）。我々はショウジョウバエの脳をモデル系として、複数の神経細胞が自発的に集合してカラム構造を形成するメカニズムを研究してきた［3〜5］。哺乳類のカラム構造は数万もの神経細胞から成り、その全貌を明らかにすることは極めて困難であるが、ハエの脳においては100程度の神経細胞が集積してカラム構造を形成し、様々な遺伝子の働きを自在に操作することができる。我々はこれまでに細胞接着因子であるNカドヘリンが3種類の神経細胞R7、R8、Mi1において異なる強度で発現することで、自発的にドーナツ状のカラム構造を形成することを明らかにした（図1a）［5］。また、軸索走行制御因子のNetrinは低濃度では誘引性に働くが、高濃度では反発性に切り替わることで、細胞集団間の境界を形成することを示した（図1b）［7］。神経幹細胞は非対称分裂によって多様な神経細胞を生み出すが、同じ神経幹細胞に由来する神経細胞どうしが反発して異なるカラムに配分される細胞系譜依存的反発現象を見いだし、さらにこの過程においてダウン症の原因因子であり反発性因子であるDscam1が中心的な役割を果たすことを明らかにした（図1c）［4］。

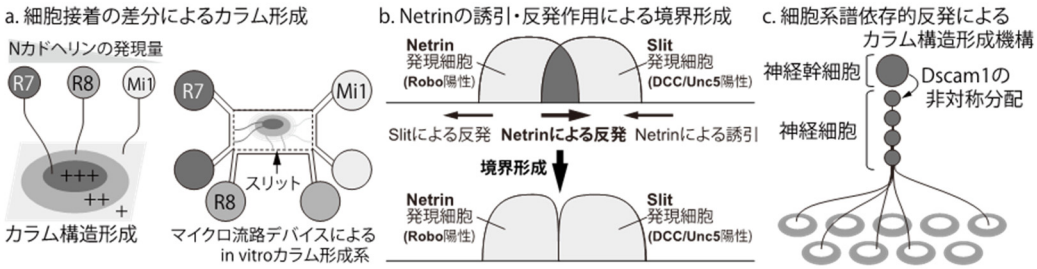


図1. 細胞間相互作用によるカラム形成機構

a）細胞接着の差分によるカラム形成。

b）Netrinの誘引・反発作用による境界形成。

c）細胞系譜依存的反発によるカラム構造形成機構。

複数の神経細胞の接着や反発によってカラム構造が形成される過程を直感的に理解することは困難である。共同研究者の Carrillo（University of Oxford）、村川（龍谷大学）は細胞運動についての数理モデルに精通している。Carrillo、村川が研究対象とする一連の方程式は佐藤が着目する脳のカラム構造の形成機構と親和性が高く、これまでに 2 本の共著論文において、神経細胞間の接着力の差によって自発的にカラム構造が形成される仕組みを明らかにした［5，6］。

本研究ではこれらの知見をもとに、*in vitro* でカラム構造を再構成することを目的とする。マイクロ流路デバイス中でこれらの分子を発現する神経細胞を培養し、神経突起がドーナツ状のカラム構造、細胞集団間の境界、カラムの等間隔配置を再現する技術を確立する。培養細胞中の各分子の産生量の設定が非常に重要であると考えられるが、数理モデルに基づいたシミュレーションによって各分子の至適濃度を推定し、実験に適用する。この様なボトムアップ的な脳神経回路の再構成は、神経回路の人工的なデザインへとつながる重要な基盤技術に発展すると期待される。

方　法

1. ショウジョウバエ神経細胞の *in vitro* 培養

神経細胞の培養には、ショウジョウバエの細胞培養において最も良く用いられる S2 培地にインスリンを加えた培地を用いた。組織から細胞を分離する際には、Collagenase I および Dispase を含む細胞分離培地を用いた。マイクロ流路デバイスは Xona Microfluidics 社製の XONA chip を用いた。

幼虫を S2 培地中で解剖し、単離した複眼原基および脳を細胞分離培地中でインキュベートすることで、視神経細胞および脳の神経細胞の分離を促進した。得られた組織塊をマイクロ流路デバイスのチャンバー中に設置し、培養した後、蛍光倒立顕微鏡で神経突起の伸長を観察した（図 1a）。視神経において GFP を発現する GMR-Gal4 UAS-GFP 系統および全ての神経細胞において GFP を発現する elav-Gal4 UAS-GFP 系統を用いた。

2. カラム形成の数理モデル解析

従来の数理モデルではカラム構造の核となる 3 種類の神経細胞 R7、R8、Mi1 の神経突起の分布密度を変数とし、これらの細胞間の接着力によって同心円状のカラム構造が確立することを明らかにした。しかし、実際には Netrin や Dscam1 といった反発性分子が重要な役割を果たすと考えられる。細胞間の相互作用を距離に応じた関数として表現することで、複雑な細胞間相互作用を導入した数理モデルを構築した。また、この関数の形状を様々に変化させ、カラムの配置が 6 角形もしくは 4 角形を示す条件を探索した。

結果および考察

1. ショウジョウバエ神経細胞の *in vitro* 培養

マイクロ流路デバイス中でハエの神経軸索を伸長させるプロトコールを考案し、これを用いて視神経細胞の培養と軸索の伸長を確認した。しかし、デバイス中のスリットを通過するほどの長距離の伸長を確認することは出来なかった。哺乳類の培養細胞を用いた報告では、大量の神経細胞をチャンバー中に導入する必要があると記述されているが、本研究では解剖した組織から神経細胞を得ているので、細胞数が圧倒的に少ないことが問題であると考えられる。

2. カラム形成の数理モデル解析

細胞間の距離に応じて接着や反発の作用が変化する数理モデルを構築したところ、多くの場合カラムの配置は 6 角形配置を示すことが分かった。一方で、4 角形配置を示す場合も存在することが確かめられた。4 角形配置は 6 角形配置と比べると物理的には不安定なので、このような条件が存在することが示されたこと自体が重要な発見である。

一方、ハエの脳を用いた *in vivo* の実験から、カラムを構成する一部の細胞において N カドヘリンをノックダウンすると 6 角形配置が 4 角形配置に変化することを見出している（図 2 左）。上記の数理モデルにおいても同様に、細胞接着の低下によって 6 角形配置が 4 角形配置に変化することがコンピューターシミュレーションによって示された（図 2 右）。

ハエの脳においてみられるカラム構造は複眼を構成する個眼と 1 対 1 に対応している。興味深いことに、個眼も通常

は6角形配置を示すが、ある種の変異体では4角形配置に変化する。我々はこのような個眼の配置パターンを確立するメカニズムを明らかにしているが［1］、個眼とカラムの配置メカニズムの関係性は興味深い問題である。

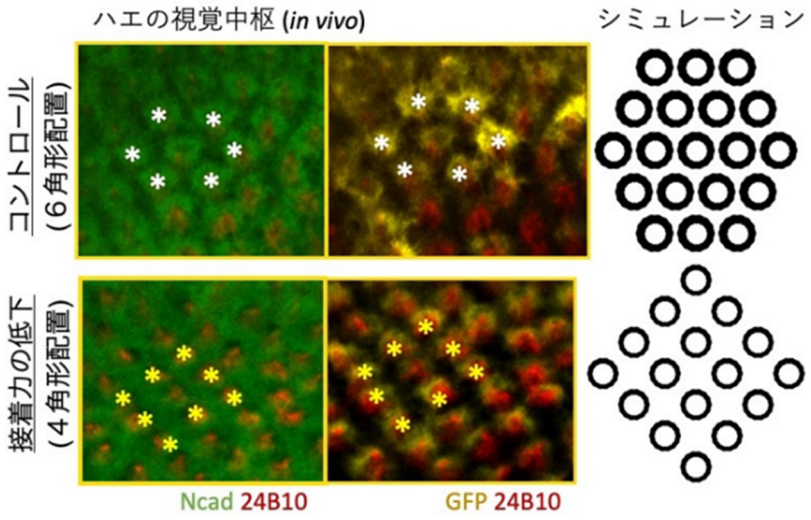


図2. 細胞接着力の低下によるカラム配置の変化
細胞接着力の低下によってカラムの6角形配置が4角形に変化したが、この現象はシミュレーションによっても再現出来た。

共同研究者

本研究の共同研究者は、University of Oxford、Mathematical Institute の Jose A. Carrillo 博士と龍谷大学先端理工学部の村川秀樹博士である。

文　献

1) Hayashi, T., Tomomizu, T., Sushida, T., Akiyama, M., Ei, S., and Sato, M. Tiling mechanisms of the Drosophila compound eye through geometrical tessellation. Current Biology 32, 2101-2109 (2022). DOI: 10.1016/j.cub.2022.03.046
2) Wang, M., Han, X., Liu, C., Takayama, R., Yasugi, T., Ei, S., Nagayama, M., Tanaka, Y. and Sato, M. Intracellular trafficking of Notch orchestrates temporal dynamics of Notch activity in the fly brain. Nature Communications 12, 2083 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-22442-3
3) Han, X., Wang, M., Liu, C., Trush, O., Takayama, R., Akiyama, T., Naito, T., Tomomizu, T., Imamura, K. and Sato. M. DWnt4 and DWnt10 regulate morphogenesis and arrangement of the columnar structures through Fz2/PCP signaling in the Drosophila brain. Cell Reports 33, 108305 (2020). DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108305
4) Liu, C., Trush, O., Han, X., Wang, M., Takayama, R., Yasugi, T., Hayashi, T., *Sato, M. Dscam1 establishes the columnar units through lineage-dependent repulsion between sister neurons in the fly brain. Nature Communications 11, 4067 (2020). DOI: 10.1038/s41467-020-17931-w
5) Trush, O., Liu, C., Han, X., Nakai, Y., Takayama, R., Murakawa, H., Carrillo, J. A., Takechi, H., Hakeda-Suzuki, S., Suzuki T. and *Sato, M. N-cadherin orchestrates self-organization of neurons within a columnar unit in the Drosophila medulla. Journal of Neuroscience 39, 5861-5880 (2019). DOI:10.1523/JNEUROSCI.3107-18.2019

6) Carrillo, J. A., *Murakawa, H., Sato, M., Togashi, H. and Trush, O. A population dynamics model of cell-cell adhesion incorporating population pressure and density saturation. Journal of Theoretical Biology 474, 14-24 (2019). DOI:10.1016/j.jtbi.2019.04.023

7) Suzuki, T., Liu, C., Kato, S., Nishimura, K., Takechi, H., Yasugi, T., Takayama, R. Hakeda-Suzuki, S., Suzuki, T. and *Sato, M.Netrin signaling defines the regional border in the Drosophila visual center. iScience 8,148-160 (2018). DOI:10.1016/j.isci.2018.09.021