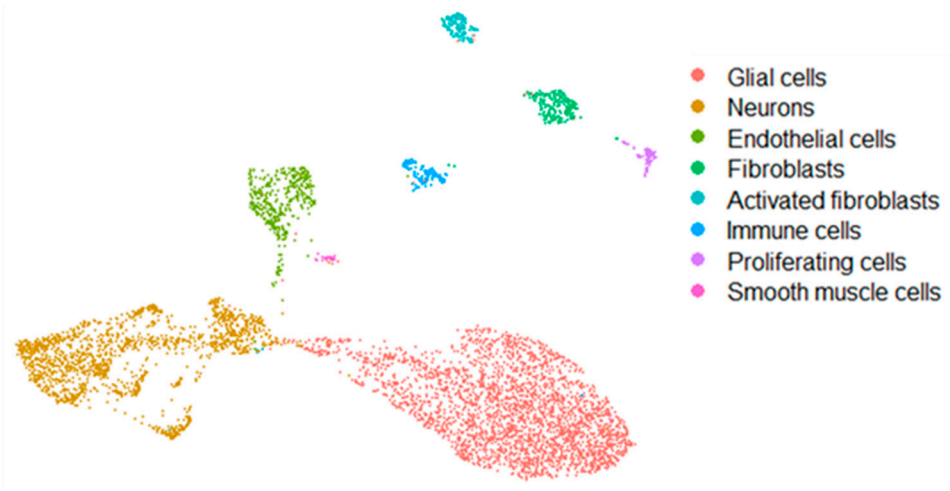
112　末梢神経系における交感神経活動の制御機構の解明	神田　浩里

【目的】自律神経活動は視床下部を中心とする中枢神経ネットワークによって制御される。近年では、中枢性の自律神経調節機構に関して、ストレスや情動、痛みなどといった様々な要因による自律神経の変調メカニズムに関する研究が飛躍的に進んできている。一方で、従来の研究において見逃されている視点の一つに、末梢神経系で構成される末梢神経回路による自律神経調節機構がある。中でも腹腔神経節は、腸管を支配する感覚神経の側枝または腸管神経叢からの投射、神経節内に介在神経が存在するという報告がなされており、末梢神経内に小さな神経回路の存在が示唆されてきた。本研究では、交感神経節を構成する個々の細胞について、次世代シーケンスを用いた snRNA-seq（Single-nucleus RNA-sequence）法をもちいて、シングルセルレベルで遺伝子プロファイルを明らかにする。また、この網羅的遺伝子解析に加え、摘出した組織サンプルに対し直接的に電気生理学的解析を行うことで、交感神経節内神経回路の仕組みについてもアプローチを行う。これらの発現遺伝子解析と電気生理学的解析を組み合わせることにより、これまで不明であった末梢神経内で行われる交感神経制御基盤の全容を明らかにすることを目的とする。

【方法】雄性 Sprague-Dawley（SD）ラットの腹腔神経節を用いて snRNA-seq 解析を行った。データの取得には次世代シーケンサーを用いて、ライブラリ調製したサンプルの塩基配列を取得した。得られた生データはクオリティーコントロール後に seurat パッケージを用いてクラスター解析を行った。また、電気生理学的解析として、Whole-mount 腹腔神経節標本を用いた Patch-clamp 法を行った。記録には 7 週齢の雄性 SD ラットを用い、腹腔神経節標本の作製を行った。サンプル処理として 0.05%コラゲナーゼと 0.05%Dispase Ⅱ による 5 分間の酵素処理を行った。pressure-clamp パッチクランプ法を用いてホールセルパッチクランプを行い、voltage-clamp 法と current-clamp 法により神経細胞の機能特性の解析を行った。

【結果】腹腔神経節を構成する各種細胞の発現プロファイルを明らかにするため snRNA-seq 法を行い、取得したデータについては UMAP にて次元削除を行った。腹腔神経節に局在する個々の細胞をクラスター分類し、マーカー遺伝子でアノテーションした結果、腹腔神経節を構成する細胞は大きくグリア細胞、神経細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞（resting、activated）、免疫細胞、分裂細胞、血管内皮細胞の 7 種類の細胞群に分類することができた。さらに神経細胞のみで再クラスタリング解析を行うと、遺伝子発現プロファイルが異なる 4 つの群に分類することができた。whole-mount の腹腔神経節標本を用いたパッチクランプ法を行った結果、自発性のシナプス後電位（sEPSCs）の記録に初めて成功し、アセチルコリンによるシナプス伝達が行われていることを確認することができた。また、各種神経伝達物質への反応性の違いを検討した結果、アセチルコリンではない他の伝達物質も交感神経活動調節に積極的に関わっていることが明らかとなった。

snRNA-seq 法による腹腔神経節構成細胞のメガクラスター解析



112. 末梢神経系における交感神経活動の制御機構の解明

神田　浩里

兵庫医科大学 薬学部 解剖学

Key words：交感神経，snRNA-seq，patch-clamp，メガクラスター解析，神経回路

緒　言

ホメオスタシスとはWalter B. Cannonが提唱した概念で、生体が外的および内的環境の変化を受けながらも個体としての秩序を安定した状態に保つ働きをいう。このホメオスタシスの維持には自律神経が重要な働きを担っており、外界の情報に対して交感・副交感神経の拮抗支配により全身の機能を一定に維持する。一方で、このホメオスタシス調節機構はストレスに対し脆弱性を示し、自律神経活動の変調は消化器系や循環器系、内分泌系、免疫系などに異常をもたらすだけではなく、様々な疾病発症の助長因子ともなる。

自律神経活動は視床下部を中心とする中枢神経ネットワークによって制御される。近年では特に内臓と脳の機能的な相互作用（脳腸連関）についての研究が盛んに行われており、中枢性の自律神経調節機構についての理解が飛躍的に進んできた。一方で、従来の研究において見逃されている視点の一つに、末梢神経系で構成される末梢神経回路による自律神経調節機構がある。なかでも、脊髄と末梢組織の中間に位置する交感神経節では、シナプスを介した交感神経活動に関する情報伝達のみが行われるのではなく、様々な感覚神経線維も入力することが知られており、内臓の伸展、炎症や疼痛などに起因する多様な感覚情報が交感神経活動を調節する末梢制御機構の可能性が示唆されている［1］。また、交感神経節神経回路内には介在神経細胞が存在する報告［2］もあり、シナプス伝達機能を調節する末梢機序が示唆されている。しかしながら、末梢の交感神経活動の解析技術は中枢神経系ほど確立されておらず、交感神経節内でのシナプスレベルの機能的解析や、単一細胞レベルの遺伝子発現解析についてこれまで行われていない。そのため、交感神経節内回路がどんな細胞群で構成されているのか、交感神経活動が末梢神経系内の神経回路によってどのような修飾を受けるのか、といった問題に実証的に回答できず、全容解明に向けた体系的な研究に結実していない。

本研究では、交感神経節を構成する個々の細胞について、次世代シーケンスを用いた snRNA-seq（Single-nucleus RNA-sequence）法を用いて、シングルセルレベルで遺伝子プロファイルを明らかにする。さらに神経細胞のみを解析することにより、交感神経節内の神経細胞の多様性についても探索を行う。また、この網羅的遺伝子解析に加え、摘出した組織サンプルに対し直接的に電気生理学的解析を行うことが可能な pressure-clamp patch-clamp 法［3］を行うことで、交感神経節内回路の仕組みについてもアプローチを行う。これらのシングルセルレベルの発現遺伝子解析と電気生理学的解析を組み合わせることにより、これまで不明であった末梢神経内で行われる交感神経制御基盤の全容を明らかにすることを目的とする。

方　法

1. 腹腔神経節を用いた snRNA-seq 法

7 週齢の雄性 Sprague-Dawley（SD）ラットを用い、氷冷 PBS の灌流による脱血後に腹腔神経節を取り出した。腹腔神経節は顕微鏡下でさらに付着する結合組織、脂肪組織、また神経細胞を取り囲う神経上膜等の結合組織を取り除き、瞬間凍結させたものを解析に用いた。本研究には 1 サンプルにあたり 10 匹分の交感神経節を解析に用いた。凍結サンプルの入ったチューブに Nuclei extraction buffer 加え、組織を破砕することによって裸核

を行った。Chromium Next GEM Single cell 3'Reagent Kits v3.1（10 x Genomics 社）に従い、cDNA の合成及び遺伝子発現ライブラリの作製を行った。データの取得には次世代シーケンサーを用いて、ライブラリ調製したサンプルの塩基配列を取得した。

2. メガクラスター解析

得られた生データは CellBender ソフトウェアを用いてクオリティーコントロール（QC）を行った。また QC 後のデータは R の DoubletFinder パッケージを用いてダブレットの除去を行い、seurat（v5）パッケージを用いてクラスター解析を行った。データ解析の方法としては、はじめにデータのフィルタリングと正規化を行い、PCA（主成分分析）を行った。その後クラスタリングを作製し UMAP による次元削除を行い、それぞれのクラスターにおける特徴遺伝子の抽出、またはクラスターの Gene ontology（GO）解析を行った。

3. Whole-mount 腹腔神経節標本を用いた Patch-clamp 記録

7 週齢の雄性 SD ラットを用い、イソフルラン深麻酔下で断頭を行った後に、腹腔神経節を摘出した。顕微鏡下で周囲の結合組織をすべて除去し、0.05%コラゲナーゼと 0.05%Dispase Ⅱによる 5 分間の酵素処理を行った。パッチクランプ法としては、以前に確立した pressure-clamp パッチクランプ法［3］を、whole-mount の腹腔神経節標本に応用し記録を行った。また細胞内・外液の組成や記録条件についても過去の報告に準じて行った。

結果および考察

1. snRNA-seq 法による腹腔神経節のメガクラスター解析

腹腔神経節を構成する各種細胞の発現プロファイルを明らかにするため、snRNA-seq 法を行い、取得されたデータについては UMAP にて次元削除を行った。腹腔神経節内に局在する個々の細胞は大きく 13 のクラスターに分類することができた（図 1A）。次に既知の各細胞種のマーカー遺伝子から、それぞれのクラスターを構成する細胞群のアノテーションを行った（図 1B）。その結果、腹腔神経節を構成する細胞は大きく、グリア細胞、神経細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞（resting、activated）、免疫細胞、分裂細胞の 7 種類の細胞群に分類することができ、割合としては、神経細胞とグリア細胞がその大半を占めていた（図 1C）。

さらに神経細胞のクラスターの多様性を明らかにするために、神経細胞みを抽出し再クラスタリングを行った。その結果、個々の神経細胞は遺伝子発現プロファイルが異なる 4 つの神経細胞群に分類することができた（図 1D）。

本研究では次世代シーケンスを用いて、これまで明らかにされてこなかった腹腔神経節を構成する個々の細胞レベルで遺伝子発現解析を行った。神経細胞のみ分離し生きた状態で行う scRNA-seq 法ではなく神経節ごと瞬間凍結した snRNA-seq 法を用いたため、神経細胞のみではなくグリア細胞や線維芽細胞の多様性を明らかにするための基礎的データも得ることができた。また、これまでは神経細胞もノルアドレナリン含有神経と一括りにされていたが、4 つのクラスターに分類することができることが明らかとなった。次のステップとしては、これらの神経細胞群における特異的遺伝子発現解析をすることにより、クラスターの意義を明らかにしていきたい。

2. Whole-mount 腹腔神経節標本を用いた Patch-clamp 記録

腹腔神経節内のシナプス伝達を可視化するために、whole-mount の腹腔神経節標本を用いたパッチクランプ法を行った。蛍光色素を含む細胞内液を用いたホールセルパッチクランプ法を行い、節後神経細胞の樹状突起まで鮮明に可視化することができた（図 2A～D）。この細胞から自発性のシナプス後電位（sEPSCs）を記録することができ、アセチルコリンによるシナプス伝達が行われていることを確認することができた。また、これら神経細胞において各種神経伝達物質への反応性の違いを検討した結果、アセチルコリンではない他の伝達物質も交感神経活動調節に積極的に関わっていることが明らかとなった。また感覚神経特異的な Cre-driver 動物を用いた光遺

伝学の技術を導入した *in vitro* の実験系を引き続き行い、末梢神経内における感覚神経と交感神経のインタラクションを明らかにする予定である。

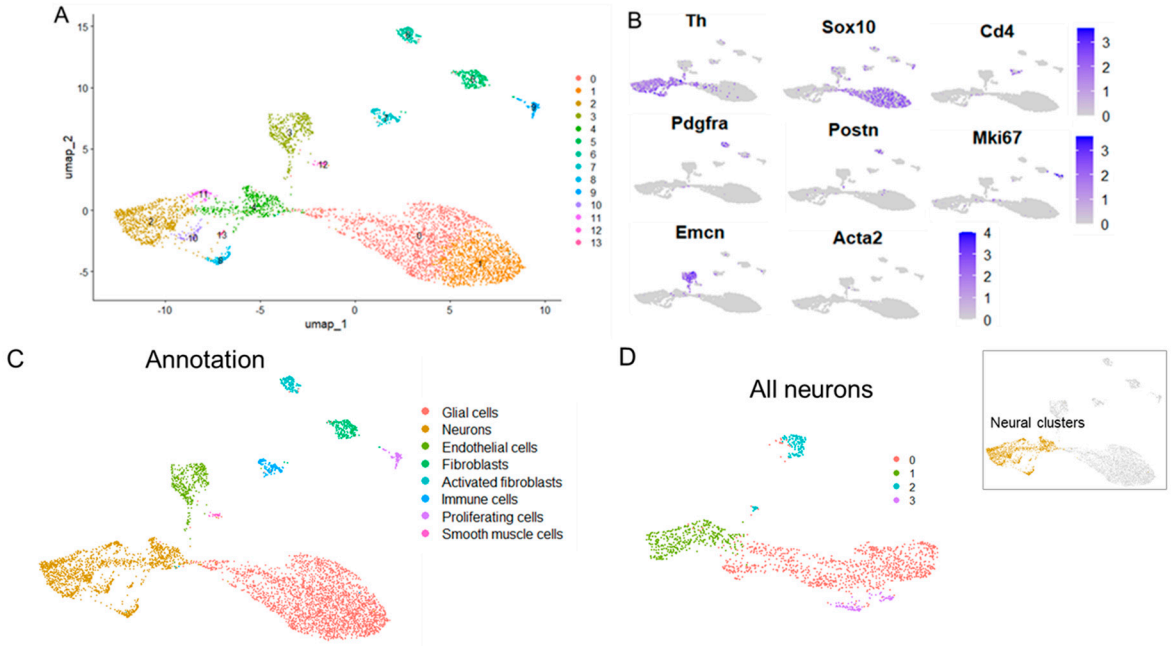


図 1. snRNA-seq 法による腹腔神経節構成細胞のメガクラスター解析

A） UMAP による腹腔神経節内の細胞のクラスター分類。

B） 各種の細胞マーカー遺伝子によるクラスターのアノテーション。

C） 腹腔神経節を構成する細胞群。

D） 腹腔神経節内細胞から神経細胞のみを抽出したクラスタリング解析。

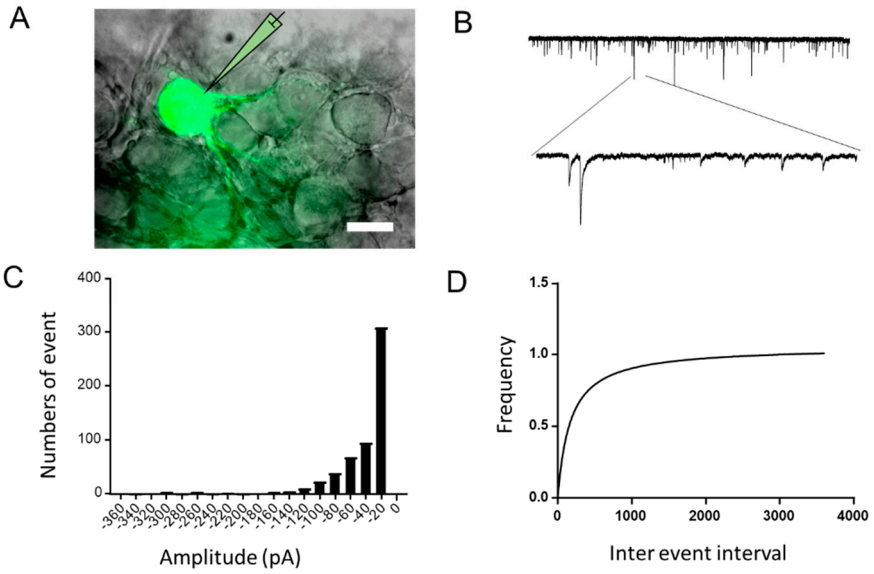


図 2. Whole-mount 腹腔神経節標本を用いた Patch-clamp 記録

A） ホールセル後での Neurobiotin-488 による細胞形態の可視化。Scale bar：20 μ m。

B） CG 神経で認められる代表的な sEPSCs のサンプルトレース。

C） sEPSCs のイベント回数と Amplitude。

D） sEPSCs の頻度と Inter event interval。

共同研究者・謝辞

本研究に多大なご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文　献

1） Spencer NJ, Hu H. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020 Jun;17(6):338-351. doi: 10.1038/s41575-020-0271-2. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32152479; PMCID: PMC7474470; DOI: 10.1038/s41575-020-0271-2.

2） Kaestner CL, Smith EH, Peirce SG, Hoover DB. Immunohistochemical analysis of the mouse celiac ganglion: An integrative relay station of the peripheral nervous system. J Comp Neurol. 2019 Nov 1;527(16):2742-2760. doi: 10.1002/cne.24705. Epub 2019 May 9. PMID: 31021409; PMCID: PMC6722036. DOI: 10.1002/cne.24705.

3） Kanda H, Tonomura S, Dai Y, Gu JG. Protocol for pressure-clamped patch-clamp recording at the node of Ranvier of rat myelinated nerves. STAR Protoc. 2021 Jan 12;2(1):100266. doi: 10.1016/j.xpro.2020.100266. PMID: 33490982; PMCID: PMC7806518; DOI: 10.1016/j.xpro.2020.100266.