

脳梗塞治療を目指した成体脳における神経回路再編機構

奈良県立医科大学 先端医学研究機 脳神経システム医科学

吉原 誠一

1. はじめに 目的

嗅球介在ニューロンは胎生期のみならず、成体期においても新生され続け新たな神経回路を形成している。嗅球の神経回路は成体においても常に新たな回路を作り続けている動的なものであり、これは他の神経系では見られない極めてユニークな特徴である。さらに、この嗅球神経回路形成は神経活動によって、その回路の精密化が行われていると考えられているがその機構は明らかになっていない。これまでの解析により、神経活動依存的に発現する膜タンパク質や転写因子が嗅球介在ニューロンの樹状突起の発達やシナプス形成を制御していることを明らかにした。

そこで本研究では、嗅球介在ニューロンをモデルとして、神経活動依存的な神経回路の精密化の分子機構の解明を目指す。また本研究は、統合失調症や自閉症等の精神疾患に関する原因解明や、損傷された脳内神経回路の修復等の再生医学への応用にも繋がる

と期待される。これまでに成体期においても新生され続けるという興味深い特徴をもった嗅球介在ニューロンに注目して、そのニューロンの発達機構の解析を行ってきた。この解析を行うに当たり、遺伝子組換えマウスを作製する従来の方法よりも、より簡便で迅速に遺伝子の機能解析を行うためにレンチウイルスを用いた遺伝子導入の系を嗅球介在ニューロンに試みた。その結果、レンチウイルスを脳室に注入して感染させると新生の嗅球介在ニューロンに効率良く外来遺伝子が導入できることが明らかになった。このレンチウイルスの系を用いて嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な回路形成機構の解析に現在着手している。これまでに神経活動は嗅球介在ニューロンの樹状突起の伸展とシナプス形成に必須であることを明らかにした。

次に、この嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達の分子機構を解明するために、片側の鼻孔を閉じて匂い刺激を遮断したマウス嗅球と正常な嗅球とで発現量が変動する遺伝子について **DNA** マイクロアレイによる探索を行った。その結果、膜タンパク質である **5T4** 遺伝子や転写因子である **Npas4** 遺伝子などの発現が匂い刺激を遮断した嗅球で減少しているという結果が得られた。本研究では、これらの神経活動依存的な神経回路形成に関与する可能性のある遺伝子群の機能解析を、レンチウイルスの発現系を用いて行い、嗅球介在ニューロンの神経回路形成機構を解明することを目的とする。

まず、強制発現させた嗅球介在ニューロンの形態変化を、発達段階を追って解析を行う。更に、この **gain of function** 実験の他に、ドミナントネガティブ型の分子を強制発現させる実験及び **RNAi** を用いた目的遺伝子の **loss of function** 実験も行う。また、これらの遺伝子と相互作用をする分子の探索実験を行い、それら相互作用する分子の嗅球神経回路形成における機能解析をレンチウイルスによる発現形によって明らかにする。これらの実験を行うことで神経活動依存的に発現する遺伝子の介在ニューロンの回路形成における機能を明らかにしたい。

2. 方法

申請者によるこれまでの**DNA**マイクロアレイによる解析から、匂い刺激を遮断したマウス嗅球においては細胞接着に関与する膜タンパク質**5T4**やシナプス形成を制御する転写因子である**Npas4**の発現が変動している結果が得られた(吉原ら、未発表データ)。これらの神経活動依存的なニューロンの発達に関与すると考えられる遺伝子について、後述するレンチウイルスを用いた遺伝子の**in vivo**での機能解析実験を行う。

レンチウイルスはレトロウイルスの一種であり、改変されたレンチウイルスベクターによって神経細胞を含む様々な種類の細胞に効率よく遺伝子導入できることが報告されている。申請者の実験によってレンチウイルスベクターを生後1日目のマウス脳室に感染させ1週間後に解析を行ったところ新生嗅球介在神経細胞に効率よく遺伝子導入されていることが明らかになった。レンチウイルスベクターに嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達に関与すると考えられる**5T4**及び**Npas4**遺伝子を組み込み、マウス脳室に感染させることで、その遺伝子の**in vivo**での神経回路形成における機能解析を行う。またその遺伝子のドミナントネガティブ型タンパク質の強制発現や**RNAi**を用いた遺伝子の発現阻害実験も行うことで、目的遺伝子の嗅球介在神経細胞の発達における機能を明らかにする。

具体的にはレンチウイルスにより遺伝子導入された嗅球介在神経細胞とコントロールとして**GFP**遺伝子のみを遺伝子導入された細胞について以下の点について比較解析をする。嗅球介在神経細胞における神経活動依存的な発達過程としては、既存の神経回路へ

の組み込み・樹状突起の伸展・スパイン形成によるシナプスの成熟などが考えられる。これまでの申請者の実験により、**5T4**遺伝子を強制発現させた場合には嗅球介在ニューロンの枝分かれが増加し、**Npas4**遺伝子を強制発現させた場合にはスパイン数が増加することが明らかになっている（吉原ら、未発表データ）。今後さらにレンチウイルスにより遺伝子導入された嗅球介在神経細胞について、嗅球の特定の細胞層への移動・樹状突起の形態・スパイン及びシナプスの形成について正常の介在神経細胞と比較することで、目的遺伝子の介在神経細胞の発達における機能を明らかにする。

上記の実験と共に、**5T4**分子と相互作用する遺伝子の探索を**yeast two hybrid**法によって行う。また、転写因子である**Npas4**遺伝子が制御する遺伝子の探索を、クロマチン免疫沈降(**ChIP**) **array**法を用いて行う。上記の探索実験により、**5T4**及び**Npas4**分子と相互作用する分子もしくはその下流に位置する分子が得られた場合には、それらの分子の嗅球介在ニューロンの発達における機能を前述したレンチウイルスの系を用いて明らかにする。これらの嗅球介在ニューロンの発達を制御する分子の同定及びその分子の発達における機能を明らかにすることで、嗅球介在ニューロンの神経活動依存的な発達の分子メカニズム解明に向けてさらに大きな進展が得られると考えられる。

3. 結果 研究成果

片鼻を閉じて匂い刺激を遮断すると嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれの長さが短くなり、枝分かれの数及び樹状突起のスパイン密度が減少することが明らかになった。さらに、**DNA**マイクロアレイ及び**in situ hybridization**による解析の結果、ロイシンリッチリピートを持った膜タンパク質である**5T4**及び転写因子である**Npas4**の発現が嗅球介在ニューロンにおいて神経活動依存的に制御されていることが明らかになった。レンチウイルスを用いて**5T4**を嗅球介在ニューロンにおいて強制発現すると嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれが促進された。また、**5T4**ノックアウトマウスにおいては嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれが野生型に比べて減少していた。これらの結果から**5T4**分子は嗅球介在ニューロンにおいて神経活動依存的に樹状突起の枝分かれを制御する分子であることが明らかになった。

一方、**Npas4**分子を過剰発現すると嗅球介在ニューロンの樹状突起に存在してシナプス形成を行っているスパインと呼ばれるトゲ状の構造形成が促進された。逆に**Npas4**ノックアウトマウスでは嗅球介在ニューロンのスパイン密度が減少していた（申請者ら、未発表データ）。以上の解析から膜タンパク質**5T4**が神経活動依存的に嗅球介在ニューロンの樹状突起の分枝を制御すること、及び、転写因子**Npas4**が神経活動依存的に嗅球介在ニューロンのシナプス形成を制御することが明らかになった。

また、**5T4**分子と相互作用する遺伝子の**yeast two hybrid**法による探索及び転写因子である**Npas4**遺伝子が制御する遺伝子のクロマチン免疫沈降(**ChIP**) **Seq**法による探索を行った結果、それぞれに対して複数の候補分子が得られた。

4. 考察 まとめ

嗅球の介在ニューロンは匂い刺激による神経活動の制御が簡便に行えることから、神経活動依存的な脳内神経回路再編機構の解析に有用なモデルである。**5T4**と**Npas4**遺伝子は網膜や大脳皮質などの脳内の様々なニューロンでも発現しており、脳の他の領域における**5T4**と**Npas4**遺伝子の機能解析を行うことで、脳内神経回路の発達・精密化の機構が明らかになることが期待される。

嗅球の介在ニューロンは成体においても常に新生され新たな神経回路を形成し続けていることから、再生医療への応用が注目されている。本研究による**5T4**と**Npas4**遺伝子による神経活動依存的なニューロンの発達を人為的に制御することで、損傷脳における新生ニューロンによる神経回路の修復治療への開発へと繋がることが期待される。

5. 発表論文、参考文献

1. Yoshihara S., Takahashi H., Nishimura N., Naritsuka H., Shirao T., Hirai H., Yoshihara Y., Mori K., Stern P.L., and Tsuboi A. 5T4 Glycoprotein regulates the sensory input-dependent development of a specific subtype of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. *Journal of Neuroscience* 32, 2217-2226 (2012)

2. Kaneko-Goto T., Sato Y., Katada S., Kinameri E., Yoshihara S., Nishiyori A., Kimura M., Fujita H., Touhara K., Reed R.R., and Yoshihara Y. Goofy Coordinates the Acuity of Olfactory Signaling. *Journal of Neuroscience*, 33, 12987-12996 (2013)