

# 単一細胞解析による認知障害関連遺伝子の探索

鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 生体機能制御学講座生化学・分子生物学分野

奥野 浩行

## 1. 研究目的

学習・記憶や意思決定に代表される大脳認知機能は、私たちが健康で文化的な生活を営むうえで必須である。加齢にともなう自然な認知機能の低下に加え、アルツハイマー病やハンチントン病、パーキンソン病などの神経疾患、あるいは抑うつ状態などの精神疾患においても大脳認知機能は低下することが知られ、その原因としてシナプス機能の異常が示唆されている。これまで、個々の疾患に対するマウスなどのモデル動物を用いた研究などにおいてシナプス機能異常やその分子機構についての検討は積極的に進められてきた。しかしながら、さまざまな原因における認知機能低下を統一して説明しうる分子機構や遺伝子発現変化は明らかではない。これまで私たちは神経細胞における活動依存的な遺伝子発現機構を専門として研究を進めてきた。本研究提案では、我々が開発してきた遺伝子発現レポーターを用いることにより、種々の原因により認知機能が低下したマウスにおいて認知プロセスに関わる大脳神経細胞を可視化・同定・採取し、単一細胞RNA-Seq法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、共通に変動する遺伝子群を同定することを目的とする。本研究の成果により、認知機能向上のための広いスペクトラムをもつ新たな創薬標的を見出せる可能性がある。

## 2. 研究進捗と成果

### 課題1. 活動依存的レポーターウイルスベクターの開発・改良

*c-fos* や *egr-1* などの前初期遺伝子は神経細胞においてシナプス活動依存的に発現するため、機能的な神経回路の同定マーカーとして広く利用されてきた。これまで申請者らは神経特異的前初期遺伝子の一つ *Arc* のシナプス活動依存的発現の中心制御領域である遠位エンハンサーSARE を同定、単離し、その特性を明らかにした (Kawashima, Okuno et al., PNAS, 2009)。また、これを応用した人工プロモーターESARE を開発し (Kawashima et al., Nat Methods, 2013)、アデノ随伴ウイルス (AAV) に搭載した活動依存的遺伝子発現レポーターウイルスを開発してきた。貴研究会からの支援による研究の第一段階として、これまでのレポーターウイルスを改良し、マウス認知機能関連回路の標識に至適化した蛍光タンパク質レポーターAAV の開発を行った。

まず、ESARE による活動依存的転写活性化にテトラサイクリン活性化システムを組み合わせることにより、シグナルの増幅および任意の時間枠での神経活動のみを検出できるようにした (図 1A)。また、レポーターとして蛍光タンパク質を早期成熟型である sfGFP を用いることにより、転写・翻訳後に速やかに蛍光を発することができるように改良した。

この新型ウイルスレポーターシステムの性能評価として、レポーターウイルスをマウス海馬に感染させ、数週間の回復期を経た後に、マウスに海馬への強い刺

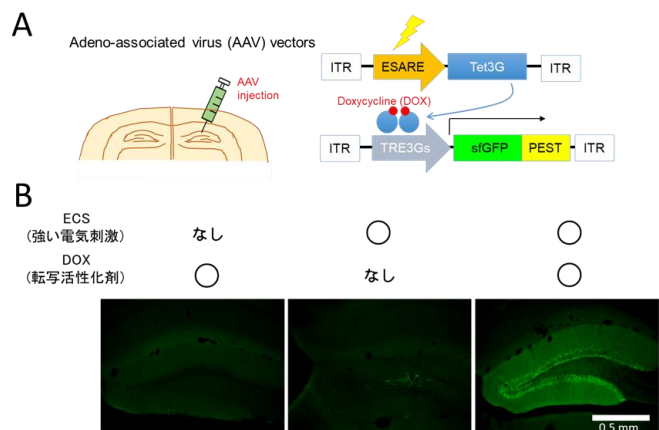


図1 活動依存的かつ薬剤依存的な前初期発現レポーターウイルスシステム (未発表データ)

激となる電気痙攣刺激(electro convulsive shocks, ECS)を与え、また、テトラサイクリン活性化因子を活性化するためにドキシサイクリン (DOX) を腹腔注射した。その結果、ECS と DOX の両方を与えた時のみに海馬歯状回での sfGFP の発現が認められた (図 1B)。この結果よって、この新しい神経活動レポーターが脳の神経活性化を可視化するために有用であることが示唆された。

## 課題2. 病態モデルマウスにおける機能的認知機能回路の同定

本研究計画においては当初、老齢マウス (18 カ月齢以上)、社会性敗北ストレスによる抑うつモデルマウスおよびパーキンソン病モデルマウスの3種についてそれぞれ加齢、精神疾患、神経疾患の代表モデルとして用いることを予定していた。しかし、動物室設置の遅れなどにより、これらのモデルの検討を十分に行うことができなかつたため、他の認知機能低下モデルマウスの導入を試みた。

臨床における手術に伴う麻酔の覚醒後に生じる、術後せん妄および遅れて生じる術後認知機能障害は予後や社会復帰の阻害要因であり大きな問題となっている。しかしながら、術後せん妄および術後認知機能障害の原因神経回路は不明である。これら病態の理解が進んでいない理由の一つに、臨床に翻訳可能な再現性の高い動物モデルが確立していない、ということが挙げられる。そこで本研究においては、特に術後認知機能障害のモデルをマウスで確立することを目標として検討を行った。恐怖条件付け学習マウスに対して、イソフルランで全身麻酔中に足底 (左後肢) の切開・縫合を行った。その翌日に記憶想起テストを行ったところ、手術群は対照群と比して同等のスコアを示したのに対し、術後 1 週間後に想起テストを行った場合、手術群において記憶想起スコアが低下する傾向がみられた (図 2)。

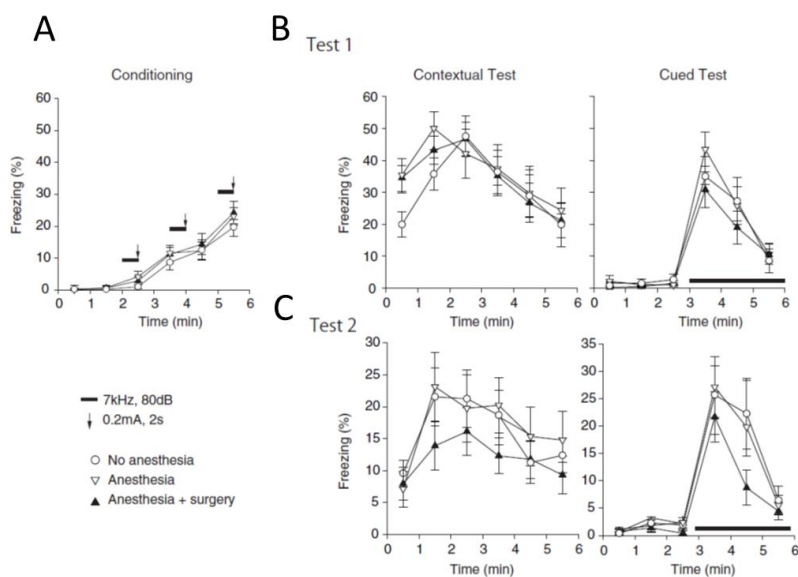


図2 足底切開術施行マウスにおける術後記憶障害モデルの検討

成体マウスに恐怖条件付け課題により訓練し(A)、24 時間後に左後肢足底の切開および縫合をイソフルランによる全身麻酔下で行った。術後 24 時間後に文脈依存的テスト、さらに手掛かり音依存的テストを行ったところ、手術群、麻酔のみ群、無処置群で差はみられなかつた(B, Test1)。同じマウスに対して 1 週間後に想起テストを行ったところ、文脈依存的想起および音依存的想起のいずれにおいても手術群において恐怖応答の低下傾向が認められた(C, Test2)。(未発表データ)

現在、この結果を基に、麻酔時間を含めた術式、恐怖条件付け課題パラメーターの最適化、その他の認知記憶課題による評価などの検討を進めている。

このような術後認知機能障害モデルマウスにおいて、術後の神経活性化領域を c-Fos マッピングによって調べたところ複数の脳領域において、麻酔のみの対照群と比較して手術 (+麻酔) 群において活動増加がみられた。活性化を示した脳領域として扁桃体の中心核などが含まれていた。

## 課題3. 活性化神経細胞の単離と単一細胞 RNA-Seq による遺伝子発現解析

認知機能に関連する遺伝子の単離を目的として、まずマウスに恐怖条件付け課題を行ったのち、脳スライスを作成して海馬歯状回において蛍光タンパクレポーターにより標識された活性化神経細胞をガラスマイクロピペットにより吸引して単一細胞を採取した。これらの単離細胞から SMART2-Seq法によってcDNA化、続いてバーコード化ライブラリーを作成し、イルミナ社の次世代シーケンサーによって転写産物解析を行った。現在、発現低下している遺伝子あるいは発現上昇している遺伝子を解析中である。

このような方法により得られる変動遺伝子リストに認知機能と関連するかどうかを検討する

ため、恐怖条件付け課題により成体マウスの海馬歯状回で発現誘導される一部の遺伝子について培養神経細胞を用いて強制発現あるいは発現抑制実験を行った。その結果、シグナル伝達系に関わる遺伝子と考えられる遺伝子Xを歯状回顆粒細胞に持続的に発現させたところ、対照と比して樹状突起棘（スパイン）の数が減弱し、長さが増大した（図3）。

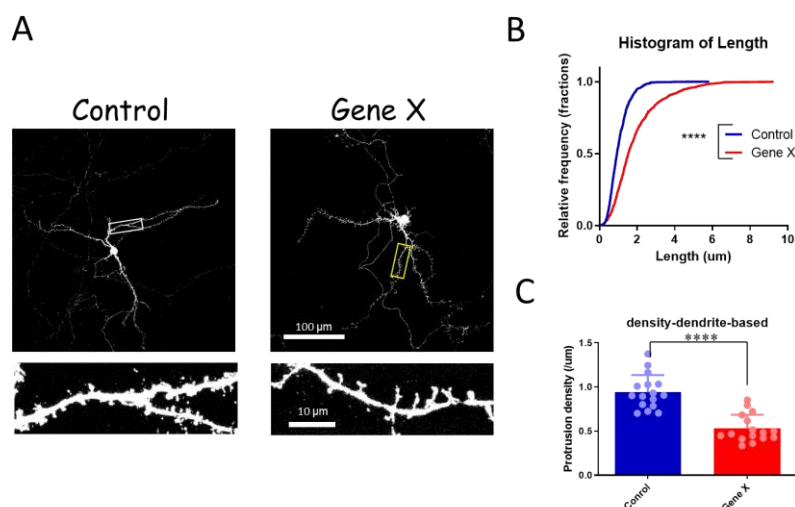


図3 遺伝子Xの強制発現による樹状突起スパインの形および数の変化

A) 海馬歯状回顆粒細胞培養細胞への遺伝子 X 強制発現と対照の例 B) 遺伝子 X 強制発現によるスパイン長の低下 C) 遺伝子 X 強制発現による樹状突起の長さあたりのスパイン数の低下 (未発表データ)

### 3. まとめと今後の方針・展望

貴研究会から助成いただいた1年間の研究により、1) 前初期遺伝子発現レポーターウイルスベクターを開発し、2) これをマウスに用いることにより認知プロセスに関わる大脳神経細胞の回路を示唆するデータを得た。また、3) 認知プロセスに関わる細胞から遺伝子発現解析を行うことで認知機能に関わる新しい分子機構を示唆する予備的な結果を得ることができた。

今後の方針としては、さらに多くの認知機能低下マウスを用いて研究を進め、複数の認知機能低下に共通する遺伝子発現変化を突き止めていきたい。そして、それら遺伝子発現変化が生体にどのような影響を与えているのか、分子細胞学的機能および生理的機能を明らかにして、将来的には認知機能向上(あるいは認知機能低下の防止)を目的とする創薬に少しでも貢献したいと考えている。