

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21700384

研究課題名(和文) 神経栄養因子による神経回路安定化の分子機構とその生理学的役割

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms and physiological significance of the structural stabilization of neural networks by neurotrophins

研究代表者

大平耕司(OHIRA KOJI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号：80402832

研究成果の概要(和文)：

本研究は、脳由来神経栄養因子受容体 TrkB のサブタイプについて、詳細に分子から行動レベルまで解析することにより、神経回路安定化の分子機構の解明を目的としている。この目的を達成するために、まず TrkB サブタイプを *in vivo* でノックダウンさせることのできる siRNA レンチウイルスベクターの作製を行った。さらに、ノックダウンできたかどうかをタンパクレベルで検出できるようにするため抗 T1 モルモットポリクローナル抗体の作製を行い、良好な抗体を得ることができた。

次に、作製した TrkB 受容体 レンチウイルスベクターについて胎児期脳室への投与法を確立するために諸条件の検討を行ったが、インジェクション後の胚の発生が上手く進まなかった。しかし、生後 7 日のマウス皮質や胎生 17.5 日から調整した初代培養細胞に TrkB 受容体 レンチウイルスベクターを感染させたところ、実験に使用したマウスの数が少ないが、T1 siRNA ウイルスが感染した神経細胞の樹状突起の長さが長くなり分枝数も増大していることが明らかになった。

これまでに、我々は、成体大脳皮質 1 層に虚血依存的に GABA 作動性神経細胞を産生する神経前駆細胞(L1-INP 細胞)の存在を明らかにしている(Ohira et al., Nature Neuroscience 2010)。TrkB には細胞内にチロシンキナーゼのある TK+ とチロシンキナーゼを欠いた T1 の 2 種類が存在しているが、TK+ を発現している L1-INP 細胞の割合は低いが、ほとんどの L1-INP 細胞は T1 を発現していることが明らかとなった。T1 が L1-INP 細胞に対して、何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。今後、細胞分裂、分化などに対する T1 の機能について解析していく予定である。

研究成果の概要(英文)：

The aim of this present study is the clarification of the molecular mechanisms and physiological significance of the stabilization of neural networks by analyzing the subtypes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) receptor TrkB. To achieve this purpose, first of all, I made the lentivirus vectors which expressed siRNAs of TrkB subtypes that were able to interfere with the expression of TrkB subtypes. In addition, the anti-T1 antibody was made to detect whether the knockdown of T1 at the protein level occurred, and I obtained an excellent antibody for T1.

Next, to establish an injection method of the lentivirus vectors into the cerebral ventricles of the fetals, I performed injections of the vectors at various conditions. However, the developments of the embryos after the injection have not advanced well. On the other hand, when the neocortical neurons at P7 or the primary cultures of neocortical neurons were infected with the vectors, I found that the dendritic processes of neurons infected with T1 siRNA virus vectors became long and the number of the branching points of neuronal processes increased.

We have clarified that GABAergic neurons are generated from layer 1 inhibitory neuron progenitor cells (L1-INP cell) by ischemia (Ohira et al., Nature Neuroscience 2010). There are two TrkB receptor subtypes in the mammalian CNS. The full-length isoform TK+ is a typical tyrosine kinase receptor. In contrast, the truncated isoform T1 possesses the isoform specific 11 amino acids in the intracellular domain. Interestingly, T1 was expressed in almost all L1-INP cells, whereas the ratio of L1-INP cells expressing TK+ was low, suggesting that T1 plays a role in the proliferation and differentiation of L1-INP cells.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳由来神経栄養因子(BDNF)、TrkB、レンチウイルスベクター、RNAi、神経回路、大脳皮質、神経可塑性、細胞形態

#### 1. 研究開始当初の背景

脳は、 $10^{12}$ 個のニューロンと  $10^{15}$ 個のシナプスからなる精緻な神経回路である。神経回路の形成期において、回路はまず遺伝情報に基づいて粗くつくられる。このとき、ニューロンはシナプスを形成するために軸索や樹状突起を盛んに伸長させており、ダイナミックに形態を変化させている。その後、経験や環境によって神経回路が彫塑され、機能的に成熟すると、ニューロンの形態変化の度合いは著しく低下し、スパインやシナプスといった局所的な変化に留まったものになる (Trachtenberg et al, 2002)。つまり、神経回路の機能的な成熟は、構成要素であるニューロンの形態が安定して保持された状態になることを示唆している。しかし、神経回路の安定性を付与する分子基盤については、ほとんど明らかにされていない。

これまでに、申請者は、神経線維の伸長やシナプス形成に深く関与している脳由来神経栄養因子 (BDNF) とその受容体 (TrkB) に対して分子生物学的、神経解剖学的な研究を行ってきた (Ohira et al, 1999, 2000, 2001, 2003, 2004, 2005a, 2005b, 2005c, 2006, 2007)。TrkB には 2 種類のサブタイプが存在してお

り、一つは、発達期から成熟期まで一定して発現している TK+, もう一方は、シナプス形成期から成熟期に発現量が著しく増加する T1 である。最近、申請者は、T1 の発現を低下させることのできる T1 siRNA 発現レンチウイルスベクターを作製した (Ohira et al, 2007)。興味深いことに、T1 siRNA をラット生体の脳室周辺部へ遺伝子導入することにより、*in vivo* においてニューロンの神経線維がコントロールに比べて有意に伸長することを見出した (Ohira et al., *in preparation*)。すなわち、この結果は、T1 には神経線維の伸長を抑制し、安定化させる働きがあることを示唆している。

#### 2. 研究の目的

これまでの TrkB サブタイプに関する研究によって得られた、「神経回路安定化の分子機構」についての仮説をより発展させ、分子生物学、神経解剖学、行動学を統合した *in vivo* 解析をおこなうことにより、回路の安定性を制御する分子基盤を明らかにしたい。具体的には、以下の研究を計画している。

- (1) BDNF 受容体 (TrkB サブタイプ {TK+, T1}、p75) siRNA レンチウイルスベクタ

一の作製

- (2) レンチウイルスベクターを用いた子宮内胎児脳室、P7 マウスの大脳皮質への遺伝子導入
- (3) 遺伝子導入したマウスの行動解析
- (4) 行動解析したマウスのニューロン・神経回路に対する神経解剖学的解析

以上の計画を推進することで、神経回路が安定・不安定なときに、個体の脳内でどのような回路の形態変化がおこり、それが最終アウトプットとしての学習・記憶・行動にどのような影響を与えるのか明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究は、TrkB サブタイプについて、詳細に分子から行動レベルまで解析することにより、神経回路安定化の分子機構の解明を目的としている。この目的を達成するために、まず TrkB サブタイプを、*in vivo* でノックダウンさせることのできる siRNA レンチウイルスベクターを作製する。作製したウイルスベクターをマウス脳にインジェクションし、行動、脳構造について解析をおこなう。

(1) **BDNF 受容体特異的 siRNA 発現レンチウイルスベクターの作製**：これまでに、効果的な T1 siRNA レンチウイルスベクターは作製済みである。また、TK+, p75siRNA レンチウイルスベクターの作製も終わっている。今後は、TK+, p75 siRNA 発現ベクターを初代培養ニューロンに感染させた後、Real-time PCR やウエスタンブロット解析によって、より効果的な siRNA レンチウイルスベクターを得る。これらのウイルスベクターには、siRNA が発現している細胞形態の詳細な定量ができるように、siRNA とタンデムに膜移行性 GFP または mRFP を組み込んである (Ohira et al., 2007; Hioki et al., 2007; Kameda et al., 2008)。

(2) **マウス胎児脳室へのレンチウイルスベクター感染**：胎児 (E12-16) 脳室へウイルスベクターをインジェクションする。その後、生後 9 週になったマウスを行動テストバッテリー解析(下記 4)にかける。

(3) **生後 7 日マウス脳へのレンチウイルスベクター感染**：胎児期の脳室へのウイルスベクターの投与は、広範囲な感染を起こすため、生後 7 日のマウス大脳皮質へ、部位を限定してウイルスベクターをインジェクションする。その後、生後 9 週から行動テ

ストバッテリー解析(下記 4)にかける。この解析によって、より厳密に、大脳皮質領域のニューロンの形態と行動変化を結びつけることができる。

(4) **マウス行動解析**：上記 2,3 で作出したマウスを網羅的行動テストにかける。網羅的行動テスト：モリス水迷路、8 方向放射状迷路、バーンズ迷路、恐怖条件付けテスト、プレパルスインヒビション、物体再認テスト、ワイアハングテスト、握力測定テスト、ローターロッドテスト、ホットプレートテスト、オープンフィールドテスト、高架式十字型迷路、明暗選択テスト、ポーソルト強制水泳テスト、ビームテスト、社会性行動測定テスト、T 字型迷路、Gait Analysis (生理学研究所で行動解析をおこなう)。

(5) **形態学的解析**：4 の行動解析後、マウス脳のウイルスインジェクション部位に、順行性・逆行性トレーサーをインジェクションし還流固定後、TrkB サブタイプ、蛍光タンパク質、各種マーカーを組み合わせて、共焦点顕微鏡、電子顕微鏡を用いて、スパイン、樹状突起、軸索、シナプスの変化について詳細な解析を行う。TrkB サブタイプの発現低下レベルと、神経細胞の形態・回路網の変化、さらに行動データを関連付けることにより、神経回路の安定化機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

TrkB サブタイプを、*in vivo* でノックダウンさせることのできる siRNA レンチウイルスベクターの作製を行った。TrkB のサブタイプは、細胞内にチロシンキナーゼのある TK+ とチロシンキナーゼを欠いた T1 の 2 種類が存在している。それぞれのサブタイプについて特異性のある配列をデザインしたヘアピン型 siRNA を設計し、レンチウイルスベクターを作製後、初代神経細胞培養に感染、ウエスタンブロットによって、TK+, T1 のタンパク質発現が低下しているかどうかについて検討した。その結果、TK+, T1 ともに有意な低下を認めることができ、TK+ と T1 それぞれに対する siRNA 発現レンチウイルスベクターを得ることができた。

本研究前から存在した TK+ と T1 の特異的抗体は、両方ともウサギポリクローナル抗体であった。このため、これまで TK+ と T1 の二重染色が不可能となっていた。この問題を解決するために、T1 のモルモットポリクローナ

ル抗体の作製を行い、特異性の高いモノクローナル抗T1抗体を得ることに成功した。

これらの研究ツールを活用して、胎児期の脳室へのTrkB受容体レンチウイルスベクターの投与法を確立するために、諸条件の検討を行ったが、インジェクション後の胚の発生が上手く進まなかった。生後7日のマウス皮質やE17.5の胎児から調整した大脳皮質初代培養神経細胞にTrkB受容体レンチウイルスベクターを感染させたところ、実験に使用したマウスの数が少なく生物検定にかけられないが、siRNAウイルスが感染した神経細胞の樹状突起の長さが短くなり分枝数も増大していることが明らかになった。今後マウスの数を増やすことを予定である。

我々は、成体大脳皮質1層に虚血依存的にGABA作動性神経細胞を産生する神経前駆細胞(L1-INP細胞)の存在を明らかにしている (Ohira et al., *Nature Neuroscience* 2010)。TrkBには細胞内にチロシンキナーゼのあるTK+とチロシンキナーゼを欠いたT1の2種類が存在しているが、TK+を発現しているL1-INP細胞の割合は低いが、ほとんどのL1-INP細胞はT1を発現していることが明らかとなった。T1がL1-INP細胞に対して、何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。今後、細胞分裂、分化などに対するT1の機能について解析していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ohira K, Miyakawa T. Chronic treatment with fluoxetine for more than 6 weeks decreases neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. *Molecular Brain* 4: 10 (2011). 査読有り
- ② Ohira K. Injury-induced neurogenesis in the mammalian forebrain. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 1645-1656 (2011). 査読有り
- ③ Ohira K, Hagihara H, Toyama K, Takao K, Kanai M, Funakoshi H, Nakamura T, Miyakawa T. Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase in mature granule cells of

the adult mouse dentate gyrus. *Molecular Brain* 3: 26 (2010). 査読有り

- ④ Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nature Neuroscience* 13: 173-179 (2010). 査読有り
- ⑤ Ohira K, Kaneko T. Injection of virus vectors into the neocortical layer 1. *Protocol exchange* doi:10.1038/nprot.2010.21 (2010). 査読無し
- ⑥ Ohira K, Hayashi M. A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Current Neuropharmacology* 7: 276-285 (2009). 査読有り
- ⑦ Matsuo N, Yamasaki N, Ohira K, Takao K, Toyama K, Eguchi M, Yamaguchi S, Miyakawa T. Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 3: 20 (2009). 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① 大平耕司、萩原英雄、遠山桂子、高雄啓三、金井将昭、船越洋、中村敏一、宮川剛。海馬歯状回の顆粒細胞におけるTD02の発現。第33回日本神経科学大会 2010年9月4日 神戸。
- ② 大平耕司、古田貴寛、日置寛之、中村公一、倉本恵梨子、船津宣雄、清水慶子、大石高生、林基治、宮川剛、金子武嗣、中村俊。成熟期大脳皮質に存在する神経前駆細胞。第32回日本神経科学大会 2009年9月17日 名古屋。

[その他]

ホームページ等

<http://dsm.fujita-hu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 耕司 (OHIRA KOJI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号:80402832