

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18700343

研究課題名（和文）：成熟期大脳皮質可塑性のメカニズムの解明：ニューロン-グリア相互作用の視点から

研究課題名（英文）：Study on the mechanism of the plasticity of adult neocortex: From the viewpoint of the interaction between neuron and glia.

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・助教

研究者番号：80402832

研究成果の概要：

成熟したほ乳類大脳新皮質の可塑性のメカニズムについて、ニューロン-グリア相互作用という新しい視点から、げっ歯類のヒゲ-バレルの関係を用いて解析を行った。まず、ニューロンとグリアの形態を詳細に解析できるようにするために、membrane-targeted GFP をレポーター遺伝子にもちいて、細胞毒性の低いレンチウイルスベクターの作製をおこない、ニューロン、グリア特異的に細胞形態の詳細な解析に成功した。さらに、*in vivo* において、ニューロンの形態形成に深く関与しているニューロトロフィン受容体の siRNA を発現する事のできるウイルスベクターを開発し、*in vivo* でのニューロンの形態変化について解析をおこなった。今後は、これらのウイルスベクターを使用し、げっ歯類が新しい環境におかれたときにおこるニューロン-グリアの形態変化について解析を行っていく。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

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

キーワード：細胞形態、ニューロン-グリア相互作用、RNAi、ウイルスベクター

## 1. 研究開始当初の背景

動物が生存するためには、周りの環境を認知し、行動をうまく適応させていく必要がある。適応的行動を可能にしているのは、脳に備わっている可塑性である。脳の可塑性は、神経回路の変化としてとらえることができる。発達後期から臨界期にかけての可塑性には、GABA 作動性回路や組織型プラスミンノーゲン経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。一方、成熟した脳の可塑性のメカニズムは未だに明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、げっ歯類成体の体性感覚野バレルを実験系に利用して、神経解剖学的、分子生物学的手法を駆使したアプローチにより、成体が新しい環境にさらされたときにおこる大脳皮質可塑性の構造基盤とその分子機構の解明を目指す。具体的には、以下の 3 つの研究を計画している。

(1) ニューロンとアストロサイトを可視化するためのレンチウイルスベクターの作製: ゴルジ染色様にニューロンとアストロサイトを可視化するために、レポーター遺伝子として膜移行性蛍光タンパク質 [EGFP (緑), mRFP (赤)] を用いる。さらに、ニューロンとアストロサイトを、それぞれ特異的に標識できるようにするために、特異的発現プロモーターを使用する。

(2)新規探索行動後のニューロンとアストロサイトの形態変化: げっ歯類のヒゲは、体性感覚野にあるバレルとよばれるカラム構造と一対一の結合をしている。さらに、ヒゲをトリミングすることにより、バレルに機能的な差異をつけることもできる。この利点を使って、まず、(1) で作製したウイルスベクターを感染させた後、ヒゲをトリミングした動物に新規探索行動を行わせて、

ニューロンとアストロサイトの細胞形態変化の詳細な解析を行う。

(3) 細胞形態をコントロールする分子機構についての解析: 研究代表者は、これまでに、成熟期大脳皮質に豊富に存在する神経栄養因子受容体 (TrkB-T1) が、初代培養、スライスレベルにおいて、アストロサイトの形態を制御することを明らかにしている (図 1) (OHIRA et al., J Neurosci 25: 1343-1353, 2005; OHIRA et al., Eur J Neurosci 25: 406-416, 2007)。また、TrkB-T1 はニューロンの形態も制御することから、成熟期の神経可塑性に TrkB-T1 は重要な役割をになっていることが示唆される。そこで、TrkB-T1-siRNA レンチウイルスを用いて TrkB-T1 を局所的にノックダウンさせ、ニューロンとアストロサイトの形態変化が対象群と比較してどうなるのか、さらに探索行動の変化についても解析を行う。

以上の計画を推進することで、成体の神経可塑性に新しいパラダイムの構築を目指す。

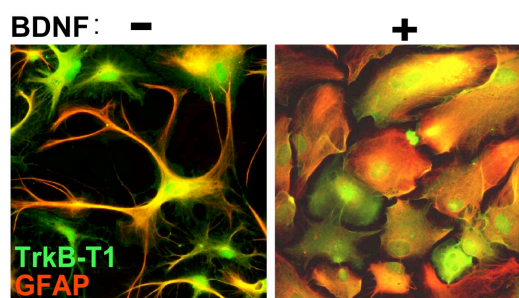


図 1 TrkB-T1 リガンドである BDNF によりアストロサイト形態が劇的に変化する。

## 3. 研究の方法

本研究は、ニューロン-グリア相互作用という視点から、げっ歯類のヒゲ-バレルの関係を用いて、成熟期における大脳皮質可塑性の構造基盤と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は、ニューロンとグリアの

形態を可視化することが必須である。そこで、初年度は、ニューロンとグリアの形態を可視化するためのツールとして、細胞に感染すると膜移行性蛍光タンパク質 [EGFP (緑)、mRFP (赤)] を発現するレンチウイルスベクターを作製する。

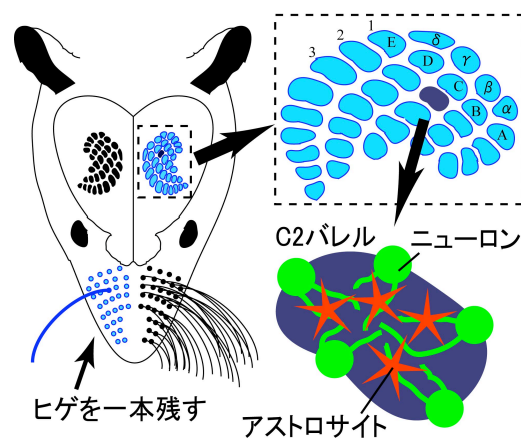
(1) ニューロンとアストロサイトを可視化するためのレンチウイルスベクターの作製: 本研究では、膜移行性蛍光タンパク質 (EGFP、mRFP) を用いる。申請者の所属する京都大学医学研究科高次脳形態学教室では、膜移行性蛍光タンパク質を発現するアデノウイルス (Tamamaki et al., *Neurosci Res* 38: 231-236, 2000) やシンドビスウイルス (Furuta et al., *J Histochem Cytochem* 49:1497-1508, 2001) を使って、ニューロンをゴルジ染色様に可視化することに成功している。

また、本研究では、特異的発現プロモーターを使用することにより、ニューロンとアストロサイトを、それぞれ特異的に標識できるようにする。プロモーターは、ニューロンにヒトシナプシン I、アストロサイトにヒト GFAP を適用する。それぞれのプロモーターを上述の膜移行性蛍光タンパク質 cDNA の上流に連結し、インビトロジェン社のレンチウイルスキットを用いて各ウイルスを作製する。プロモーターによる特異的発現は、ラット由来初代培養細胞 (ニューロン、アストロサイト) や脳定局的な大脳皮質へのインジェクションにより確認する。

(2) 動物が新規探索行動をした後のニューロンとアストロサイトの形態解析: 初年度に作製したレンチウイルスベクターをラットの脳に感染させた後、動物を新しい豊かな環境に移し、新規探索行動をさせる。そして、経時的にラットを灌流固定し、ニューロンとアストロサイトの形態を観察する (図 2)。ニューロンは EGFP、アス

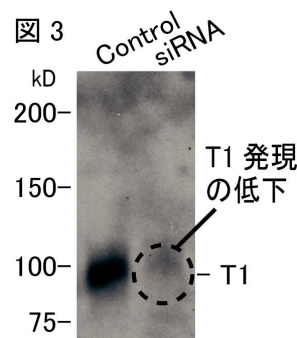
トロサイトは mRFP を発現しているのもので、それぞれに対して特異的な抗体を用いて細胞を可視化する。可視化には Molecular Probe 社製 Alexa 蛍光抗体を用いて蛍光二重染色を行い、共焦点顕微鏡で画像を取り込む。その後、ニューロンの樹状突起の長さ、分岐、樹状突起棘の密度、アストロサイトの突起の長さ、分岐について測定する。さらに、トリミングしていないヒゲとトリミングしたヒゲのバレル間、大脳皮質の層間で比較をする。

図2 本実験系の模式図

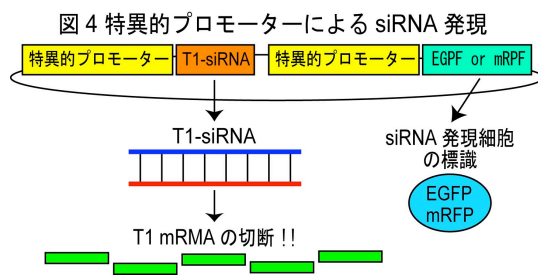


(3) 形態をコントロールする分子機構についての解析: 大脳皮質のニューロン (Yacoubian and Lo, *Nat Neurosci* 3:342-349, 2000) やアストロサイト (Ohira et al., *J Neurosci* 25: 1343-1353, 2005; Ohira et al., *Eur J Neurosci* 25: 406-416, 2007) の形態変化に TrkB-T1 は重要な役割をになっている。これまでに研究代表者は TrkB-T1-siRNA (short interfering RNA) 発現ベクターを作製している (Ohira et al., *Eur J Neurosci* 25: 406-416, 2007) (図 3)。この配列を、インビトロジェン社の RNA ポリメラーゼ (Pol) II 系を使った RNAi 発現

レンチウイルスキット



トに応用する。この時、初年度に作製した細胞特異的プロモーターに T1-siRNA 配列を結合させ、さらにタンデムに同じ細胞特異的プロモーターと膜移行性 EGFP または mRFP をつないだレンチウイルスを作製する (図 4)。これにより、ニューロンやアストロサイト特異的に TrkB-T1 をノックダウンした細胞を標識することができる。このウイルスを感染させた動物に新規探索行動をさせた後、ニューロンとアストロサイトの形態が対象群と比較してどう変化しているのか、さらに探索行動の変化について解析を行う。この研究により、ニューロンやアストロサイトの形態変化の機能的意味をあきらかにする。



#### 4. 研究成果

本研究では、げっ歯類の体性感覚系を利用して、個体が新しい環境におかれたときに起こる、ニューロンとアストロサイトの形態変化とその分子メカニズムを解析することを目的としている。ニューロンの樹状突起、スパイン、軸策や、アストロサイトの突起は非常に微細な構造をしているので、構造変化を解析可能にするためには、まず細胞形態を細部に至るまでクリアーに可視化する必要がある。そこで、膜移行性シグナルを付加した蛍光タンパク質を細胞種特異的に発現することのできるレンチウイルスベクターの製作から始めた。

(1) アストロサイト特異的 GFP 発現レンチウイルスベクターの作製:レンチウイルスベクター

の作製には、インビトロジェン社の作製キット (BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System)を用いた。まず、アストロサイト特異的プロモーターである GFAP を、膜移行性シグナルを付加した GFP の上流に組み込んだエンターリーベクターを作製し、レンチウイルスベクターを産生させた。

(2) ニューロン特異的 GFP 発現レンチウイルスベクターの作製:ここでは、ニューロン特異的プロモーターであるシナプシン I を使用し、膜移行性シグナルを付加した GFP の上流に組み込んだエンターリーベクターを作製した。

(3) ニューロンとアストロサイトへのウイルスベクターの感染と GFP の細胞種特異的発現:(1), (2) で作製したそれぞれのウイルスベクターによる GFP 発現の特異性について検討した。ラットの大脳皮質体性感覚野にウイルス液を脳定位的にインジェクションし、2 週間後に脳を固定し、抗 GFP 抗体を用いて ABC 法による免疫組織染色を行った。その結果、それぞれのウイルスベクターを用いることにより、ニューロン、またはアストロサイト特異的に GFP を発現させることができた。

本研究を遂行するためには、ニューロンとグリア細胞の形態を細部にいたるまでクリアーに可視化する必要がある。そこで、次に、さらにニューロンの樹状突起特異的に輸送され、樹状突起のほぼ全形態を可視化できる蛍光タンパク質の開発を行った。また、形態制御のメカニズムを解析するために、ニューロトロフィン受容体に対する siRNA と GFP を共発現するレンチウイルスベクターを作製した。

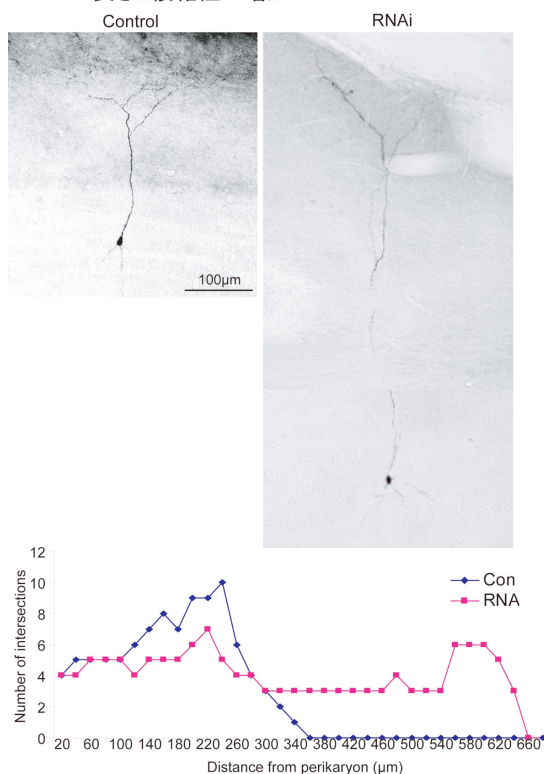
(4) 緑色蛍光タンパク質 (GFP) を利用した樹状突起の可視化:GFP の C 末端に、樹状突起

への輸送シグナル (LDLR、PLGR、TLC、NK1R、DNER)をつなげたレンチウイルスコンストラクトを作製し、ラット大脳皮質実質にインジェクションしたところ、LDLRをつなげた GFP が最も樹状突起の可視化に適していることを見出した。さらに、ラット胎児から調整した大脳皮質初代培養や、GFP-LDLRのトランスジェニックマウスにおいても同様に、樹状突起の可視化が、コントロールの GFP と比較して格段によくになっていた。

#### (5) ニューロンの形態を制御する分子メカニ

ズムについての解析:ニューロンの形態に対して詳細に解析できるレンチウイルスベクターの開発に成功したので、次のステップとして、形態を制御する分子を GFP と共発現、あるいはその分子の siRNA を発現できるようなベクターの開発に取りかかった。ニューロンやグリア細胞の形態制御に深く関与するニューロトロフィン受容体の一つ TrkB を目的分子とした。TrkB

図 5 TrkB-T1 の発現低下による樹状突起の長さや複雑性の増加



には3種類のイソフォームが存在するが、今回、これら3種類に対する siRNA と GFP を共発現するレンチウイルスベクターを作製した。

まず、ニューロンの形態の制御に深く関与している TrkB-T1 siRNA と GFP を共発現するレンチウイルスベクター(Lv T1-GFP)を用いることにより、TrkB-T1 の発現が低下したニューロンの形態の詳細な解析が可能となった。Lv T1-GFP を、ラットの脳室下帯に感染させると、嗅球の新生したニューロンの樹状突起形成における TrkB-T1 の役割を解析することができる。その結果、コントロールと比較して、TrkB-T1 siRNA により TrkB-T1 の発現が低下すると、樹状突起の長さや複雑性が増すことが明らかとなった(図 5)。また、同様な結果が、初代培養大脳皮質ニューロンでも得られた。生体の脳内では、TrkB-T1 の発現時期は、神経突起の刈り込みやシナプス形成期と一致することから鑑みると、今回の結果は、TrkB-T1 は、ニューロンの樹状突起伸長を抑制し、安定化させる働きがあることを示唆している。

#### 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 5 件)

- ① Yamasaki N, Maekawa M, Kobayashi K, Kajii Y, Maeda J, Soma M, Takao K, Tanda K, Ohira K, 以下 13 名 (2008) Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Molecular Brain* 1: 6.
- ② Kameda H, Furuta T, Matsuda W, Ohira K, Nakamura K, Hioki H, Kaneko T. (2008) Targeting green fluorescent protein to dendritic membrane in central neurons. *Neuroscience Research* 61: 79-91.
- ③ Hioki H, Kameda H, Nakamura H,

Okunomiya T, Ohira K, 以下 4 名. (2007) Efficient Gene Transduction of Neurons by Lentivirus with Enhanced Neuron-Specific Promoters. *Gene Therapy* 14: 872-882.

- ④ Ohira K, Funatsu N, Homma KJ, 以下 4 名 (2007) Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices, *European Journal of Neuroscience* 25: 406-416.
- ⑤ Ohira K, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M. (2006) TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells, *Biochemical and biophysical research communications* 342: 867-874.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 京都大学霊長類研究所 2008 年度共同利用研究会「個体レベル比較生物学をめざして」 2009 年 3 月。大平耕司。成体の大脳皮質でもニューロンは新生する。
- ② 第 31 回日本神経科学学会 2008 年 7 月 東京。大平耕司、古田貴寛、日置寛之、中村公一、金子武嗣。Truncated-TrkB による樹状突起形成の制御。
- ③ 第 22 回日本霊長学会 2006 年 7 月 大阪。大平耕司、船津宣雄、金子武嗣、中村俊。成熟哺乳類の大脳皮質に存在する神経前駆細胞。
- ④ 第 35 回生理研/統合脳国際シンポジウム 大脳皮質・海馬の局所神経回路研究 2006 年 7 月 岡崎。 Ohira K, Funatsu N, Homma KJ, 以下 4 名. Truncated TrkB-T1 regulates morphological plasticity of astrocytes.
- ⑤ 第 29 回日本神経科学学会 2006 年 7 月 京都。大平耕司、本間光一、平井啓久、中村俊、林基治。ラットグリオーマ細胞において TrkB-T1 は RhoA シグナリング経路とアク

チン細胞骨格を制御する。

[その他]

ホームページ

<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・助教

研究者番号: 80402832

(2) 研究分担者

なし

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし

( )

研究者番号: