

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06890

研究課題名(和文)小脳プルキンエ細胞の軸索投射発達における核内受容体RORaの役割

研究課題名(英文)The role of the nuclear receptor RORa in the guidance of cerebellar Purkinje cell axons in mice

研究代表者

白崎 竜一 (Shirasaki, Ryuichi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：40423149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小脳プルキンエ細胞に選択的な遺伝学的可視化技術により、プルキンエ細胞の軸索伸長の初期過程からその後のシナプス結合標的に至るまでの軸索伸長過程までを胎生期マウスにおいて明らかにした。プルキンエ細胞の軸索伸長期にプルキンエ細胞選択的に発現している核内受容体RORaについて、Staggerer型の機能阻害変異体を強制発現させた場合とCRISPR/Cas9によってRORa遺伝子をノックアウトさせた場合で軸索投射発達を解析したが、顕著な軸索ガイダンス異常は認められなかった。その原因の一つとして、同時期のプルキンエ細胞に発現していた核内受容体RORbによる機能補完の可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小脳のプルキンエ細胞が構築する神経回路の形成機構に関する研究は、これまでプルキンエ細胞の樹状突起発達に焦点をあてたものであり、プルキンエ細胞の軸索投射発達については、そのほとんどが不明であった。本研究により、プルキンエ細胞の軸索伸長の初期過程からその後の標的細胞である小脳核ニューロンへの軸索伸長過程の詳細が明らかとなった。また、神経発達障害である自閉症スペクトラム障害(ASD)の発症にプルキンエ細胞が構築する神経回路の形成異常が関与していることから、本研究の成果はASDなどの神経発達障害の病態解明を目指す研究分野の進展に対しても重要な貢献をすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed the detailed development of cerebellar Purkinje cell axons in mice, using a cell-type-specific genetic labeling approach that enables selective and sparse labeling of individual Purkinje cells in vivo. To gain insights into the molecular mechanism of axon guidance by Purkinje cells, we focused on the role of the nuclear receptor RORa that is selectively expressed in Purkinje cells during axon pathfinding. We performed RORa loss-of-function experiments by misexpressing a dominant-negative form of RORa in Purkinje cells using in utero electroporation. We also carried out RORa gene knockout using CRISPR/Cas9 genome editing system. Under these conditions, however, Purkinje cell axons developed normally similar to the wild type. Because RORb, a nuclear receptor functionally-redundant with RORa, was also expressed in Purkinje cells, normal development of Purkinje cell axons in RORa loss-of-function conditions could be due to the functional compensation by RORb.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：神経回路形成技術 マウス 軸索ガイダンス 小脳 プルキンエ細胞 小脳核ニューロン 核内受容体 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

小脳の神経回路は、歴史的にも古くから盛んに研究が進められてきた回路であり、運動の学習・記憶などの協調的な運動制御において重要な役割を担っていることが知られる。また近年の研究により、大脳皮質とネットワークを形成することで運動以外の高次脳機能である知覚情報の統合や言語機能などにも関与していることが示されている。精神・神経疾患との関連では最近、神経発達障害である自閉症スペクトラム障害 (Autism Spectrum Disorder: ASD) の発症に小脳プルキンエ細胞が構築する神経回路の形成異常が関与していることが報告された (Stoodley et al., *Nat. Neurosci.* 2017)。そのために、プルキンエ細胞が構築する神経回路の形成機構を分子・細胞レベルで明らかにすることは、小脳の機能を理解するだけでなく、小脳性運動失調や高次脳機能障害の分子的基盤の解明のためにも重要な課題となっている。

現在、プルキンエ細胞の発生分化については、マウスなどの齧歯類をモデルとして多くの研究がなされ、分子・細胞レベルで重要な知見が数多く得られている。マウスでは、プルキンエ細胞は胎生 10.5~12.5 日目 (E10.5~E12.5) に生み出されているが、プルキンエ細胞に特徴的な樹状突起の形態発達が生後に進行することから、生後動物においての樹状突起発達やそこへの入力線維のシナプス形成を中心とした局面で大きな進展がみられている。この理由の一つとしては、プルキンエ細胞特異的に発現する Calbindin を分子マーカーとした免疫染色や、PCP2 (L7) 遺伝子の発現制御領域を用いた遺伝学的な選択的可視化については、生後で有効なツールであることによる。一方で、プルキンエ細胞の軸索投射発達は胎生期に進行していることが古くより知られており、近年までの研究により、E15.5 頃までにはプルキンエ細胞の軸索はシナプス結合標的である小脳核や前庭神経核に到達していることが明らかとなっており、プルキンエ細胞の軸索投射発達は、E12.5~E15.5 の時期に進行していることが推測された。しかしながら、この時期のプルキンエ細胞の軸索を選択的に可視化できる分子マーカーや遺伝学的な可視化技術が確立されていないために、プルキンエ細胞の軸索伸長過程の詳細やプルキンエ細胞の軸索が構築する神経回路の形成機構については、未だにそのほとんどが不明のままである。

本研究で着目する核内受容体 ROR alpha (RORa) は、コレステロールを内在的リガンドとする常時活性型の転写調節因子であり、*Staggerer* マウス (遺伝性の小脳形成不全を特徴とする運動失調マウス) の責任遺伝子としても知られる。さらに近年までの研究から、RORa はマウスのプルキンエ細胞において特に強く発現しており、RORa の機能欠損が ASD の発症に関与している可能性が示唆されている (Nguyen et al., *Faseb J.* 2010)。注目すべき点は、その発現がプルキンエ細胞の軸索伸長期の E12.5 から始まり、生後の成熟期まで続いていることである (Gold et al., *Cell* 2003)。最近、RORa の生後における役割としては、プルキンエ細胞の樹状突起発達やそこでのシナプス形成を制御していることが報告された (Takeo et al., *J. Neurosci.* 2015)。しかしながら、プルキンエ細胞の軸索投射発達の胎生期における RORa の役割は不明である。一方で、近年までの研究から神経細胞のクラス特異的な軸索投射発達の過程で特異的に発現している転写調節因子が、その軸索ガイダンスの分子プログラム発現に関与していることが示唆されていることから、転写調節因子である RORa はプルキンエ細胞の軸索投射発達を制御する分子プログラム発現にも関わっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本申請者らは最近、胎生期マウスのプルキンエ細胞を遺伝学的な手法により分化の初期から選択的に、かつ少数の細胞 (低密度) で可視化させることで、その軸索挙動を *in vivo* の個体レベルで詳細に解析できる実験系を確立させた。本研究課題の目的は、この実験系を用いることで、これまで不明であったプルキンエ細胞の軸索伸長の初期過程からその後の標的細胞への軸索伸長までを *in vivo* で詳細に明らかにする。さらに、その分子機構の一端に迫るために、プルキンエ細胞選択的に発現している RORa がプルキンエ細胞の軸索ガイダンスに関与しているかどうかを検討し、関与しているならば軸索投射発達のどの局面を制御しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題で用いるプルキンエ細胞に選択的な遺伝子発現誘導は、小脳原基においてプルキンエ細胞を特異的に生み出す前駆細胞で一過的に発現される転写調節因子 Neurogenin2 (Ngn2) のエンハンサーとそれによって駆動される Cre/LoxP の遺伝子組換えシステムを組み合わせた遺伝子発現系によって行われる。尚、この遺伝子発現系は、本申請者らが既に確立させている子宮内電気穿孔法によって胎生期マウスの小脳へ導入される (Hara et al., *J. Comp. Neurol.* 2015)。また、プルキンエ細胞の発生分化過程においては、Ngn2 の発現はその上流の転写調節因子である Ptf1a によって直接制御されていることが知られている。そこで、プルキンエ細胞選択的な遺伝子発現 (可視化も含む) の特異性を高める為に、本研究では Ngn2 エンハンサーエレメントの中でも Ptf1a が結合することで制御しているエレメントを単離し、Cre/LoxP の遺伝子組換えシステムに導入した新たな遺伝子発現系の構築も行う。また、近年、転写調節因子 Olig2 がプルキンエ細胞を生み出す小脳の前駆細胞の最終段階で一過的に特異的に発現されることが明

らかとなっていることから、その時空間的発現を制御している *Olig2* のエンハンサーエレメントをマウスのゲノムより単離して、同様の遺伝子発現系を構築する。以上の複数の制御エレメントを利用した遺伝学的可視化により、プルキンエ細胞に選択的な軸索伸長過程を解析する。

(2) 本研究では、ASD 発症の分子的基盤に関わる知見も視野に入れていることから、プルキンエ細胞の軸索伸長過程の後期では、主に小脳核に投射するプルキンエ細胞の軸索挙動に焦点をあてる。本申請者らの予備的な実験では、E11.5 での遺伝子導入で可視化されるプルキンエ細胞の軸索は主に前庭神経核へ伸長し、E12.5 での遺伝子導入で可視化されるプルキンエ細胞の軸索は主に小脳核へ伸長していく結果が得られている。そのために今回、小脳核への軸索伸長については、E12.5 において小脳原基（小脳板）への遺伝子導入を行い、その後数日を追ってマウス母体より胎仔を取り出し、E13.5, E14.5, E15.5 のそれぞれの時期において、GFP で可視化されたプルキンエ細胞の軸索伸長パターンや小脳核付近での軸索挙動の詳細を解析する。尚、小脳核は解剖学的に3つの核（小脳内側核、中位核、外側核）に区分され、それぞれの小脳核特異的にトポグラフィックに投射するプルキンエ細胞が規定されている。そこで、それぞれの小脳核細胞の同定のために、特異的な分子マーカーを用いた免疫組織化学染色（内側核：*Tbr1*、中位核：*Lhx9/Meis2*、外側核：*Lhx9/Meis2+*）を行う。可視化されたプルキンエ細胞の軸索伸長過程の詳細な解析は共焦点レーザー顕微鏡により行う。また、その実験標本には可視化されたプルキンエ細胞を細胞体から軸索先端の成長円錐までを切断することなく連続的に把握できる後脳の2次元展開標本を用いる（Shirasaki et al., *Neuron* 1995; Hara et al., *J. Comp. Neurol.* 2015）。

(3) プルキンエ細胞の軸索投射発達における *RORa* の役割を明らかにするために、本研究では *RORa* の Loss-of-function を行い、その時のプルキンエ細胞の軸索投射発達への影響を調べる。今回、*RORa* の Loss-of-function を、以下の2つの異なる方法で行う。1つ目は、*RORa* の優性型機能阻害変異体（Dominant negative *RORa* [DN-*RORa*]）の導入による機能阻害実験である。*Staggerer* マウスは *RORa* のリガンド結合ドメインの欠損による転写障害が原因であるが、今回導入する DN-*RORa* は *Staggerer* マウスで見られる表現型と同様の表現型を引き起こすことが示されている（Lau et al., *J. Biol. Chem.* 2004）。この DN-*RORa* の発現ベクターを子宮内電気穿孔法によりプルキンエ細胞に導入する。2つ目は、ゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 による *RORa* 遺伝子のノックアウトである。この実験においては、Cas9 と *RORa* 遺伝子を標的とした double gRNA を同一細胞で発現するベクターを子宮内電気穿孔法によりプルキンエ細胞に導入する。尚、本申請者らは先行研究において、小脳核ニューロンにおける *Robo3* 遺伝子のノックアウトを、子宮内電気穿孔法による CRISPR/Cas9 システムによって行い、これまでに報告されている小脳核ニューロン軸索の正中交差阻害（Hara et al., *J. Comp. Neurol.* 2015）の再現に成功している。今回、*RORa* のノックアウト実験を、先行研究で最適化された CRISPR/Cas9 条件によって行う。*RORa* の機能阻害によって、プルキンエ細胞の軸索投射発達に異常が見出された場合、*RORa* によって発現制御を受けている軸索ガイダンス関連分子を見出すことを目指す。ここでは、野生型のプルキンエ細胞と *RORa* 遺伝子ノックアウトのプルキンエ細胞を含む小脳原基から RNA をそれぞれ抽出した後で、マイクロアレイ（Clariom D Array: affymetrix 社）を利用した比較発現解析を網羅的に行い、発現に有意な差が生じている軸索ガイダンス関連分子を探索する。

4. 研究成果

(1) 本研究課題の予備的な先行研究において、本申請者らは *Ngn2* の時空間的な遺伝子発現を制御しているエンハンサーエレメントをマウスのゲノムより単離し、このエンハンサーと Cre/LoxP システムを用いることで胎生期のマウス小脳原基で *Ngn2* を一過的に発現するプルキンエ細胞の前駆細胞とその細胞から分化したプルキンエ細胞を可視化するシステムを確立させていた（辻ら、第43回 日本神経科学大会、2020）。しかしながら近年、小脳ではプルキンエ細胞を生み出す前駆細胞以外でも *Ngn2* を一過的に発現することが明らかとなってきていた。実際、本研究においても先行研究のエンハンサーエレメントを用いた遺伝子発現系では、プルキンエ細胞の他に、小脳原基を離れて後脳の腹側へ移動する細胞が可視化される場合があり、プルキンエ細胞選択的な可視化ツールとしては改善の余地があった。そこで今回、*Ngn2* のエンハンサーエレメントの中から、プルキンエ細胞の発生に関わる転写因子 *Ptf1a* で直接制御されているエレメント（*Ptf1a*-*Ngn2* エレメント）だけをさらに単離して、Cre/LoxP システムに組み入れる新規の発現ベクターを構築させた。その結果、この遺伝子発現系を小脳原基に導入した場合では、腹側へ移動する細胞が可視化されるということは観察されず、可視化された細胞のほとんどがプルキンエ細胞であった（プルキンエ細胞の分子マーカーである転写調節因子 *Skor2* の発現を指標に評価）（松本ら、第44回 日本神経科学大会、2021）。今回、この新規の遺伝子発現システムにより、プルキンエ細胞の軸索伸長の初期過程からプルキンエ細胞の軸索投射発達を解析した。また、本研究では脊椎動物を通して高度に保存された *Olig2* エンハンサーエレメントをマウスゲノムより単離することに成功した。今回、この *Olig2* エンハンサーを Cre/LoxP 組み換えシステムに組み込んだ遺伝子発現系も構築させた。この遺伝子発現系を子宮内電気穿孔法で小脳原基に遺伝子導入したところ、*Ptf1a*-*Ngn2* エレメントを用いた時と同様に高い特異性でプルキンエ細胞が選択的に可視化された。したがって、これらの分子ツールは今後、プルキンエ細胞の軸索が構築する神経回路の形成機構を解明する上で効力を発揮すると考えられる。

(2) 先行研究の Ngn2 エンハンサーエレメントを Ptf1a-Ngn2 エレメントに置き換えた Cre/LoxP システムを子宮内電気穿孔法により遺伝子導入し、プルキンエ細胞を GFP で選択的に可視化させることで、プルキンエ細胞の軸索投射発達の詳細を in vivo の個体レベルで解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。プルキンエ細胞の最終細胞分裂直後からの可視化により、プルキンエ細胞の形態学的な発達の初期段階としての軸索形成の過程が捉えられた。ここでは、大脳皮質神経細胞をモデルとして提案されている極性形成過程とは異なり、初期のプルキンエ細胞から出現する最初の突起は、唯一、軸索だけであり、樹状突起状の突起は観察されなかった。

②プルキンエ細胞の軸索伸長が開始されて1日～2日遅れて、生後に特徴的な樹状突起形態の初期段階が見られるようになった。その後さらに、その樹状突起発達は進行し、プルキンエ細胞に特徴的な樹状突起形態の原型が見られるようになった。この結果は、軸索伸長が進行している発生期において、プルキンエ細胞が既に樹状突起形成を行なっていることを示すものであり、歴史的にもこれまでになされた多くの小脳研究からは全く予想されてこなかった結果である。したがって、小脳回路形成の新たな局面を見出すことに繋がった新規性の高い成果となった。プルキンエ細胞の軸索伸長の初期過程では、プルキンエ細胞の細胞体がある小脳原基の領域に依らず、転写調節因子 Atoh1 が発現する背側菱脳唇から離れる方向(菱脳唇とは反対の方向)に軸索を伸ばし始め、その結果、小脳原基の基部(小脳核ニューロンが存在する領域の近傍)である腹側へ伸長するパターンが観察された。前庭神経核へ伸長するプルキンエ細胞の軸索は、小脳原基の基部付近に到達した後、小脳核がある領域には侵入せず、伸長方向を急激に背腹軸から前後軸方向に変え、前庭神経核がある後側(尾側)へと伸長していくようになった。尚、前庭神経核へ伸長するプルキンエ細胞の軸索の細胞体は、小脳原基の中でも将来、虫部になる領域で多く観察された。小脳核へ伸長する軸索の挙動は、前庭神経核へ向かう軸索とは異なり、小脳原基の基部に到達した後、小脳核との境界領域までそのまま伸長を続けたが、すぐには小脳核の内部に侵入せず、境界で留まっている傾向があった。尚、小脳核との境界は小脳核ニューロンの分子マーカーである転写調節因子 Meis2 や Tbr1 による免疫染色によって正確に画定した。小脳核内へ侵入したプルキンエ細胞の軸索先端は小脳核ニューロンの細胞体に接触するような状態で存在し、その軸索成長円錐が小脳核ニューロンの細胞体を包み込むような形態のものも観察された。したがって、本研究により得られた一連の結果は、プルキンエ細胞の軸索が構築する神経回路の形成機構を分子レベルで解明する上で、基盤となる重要な成果となった。

(3) プルキンエ細胞の軸索ガイダンスにおける RORa の役割を明らかにするために、DN-RORa をプルキンエ細胞で強制発現させて、軸索投射発達への影響を個体レベルで解析した。その結果、DN-RORa が導入されたプルキンエ細胞の軸索伸長過程については、(2)で明らかになった野生型と比べて顕著な異常を認めることができなかった。そこで、ゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 によって RORa 遺伝子のノックアウトを行い同様に解析したが、プルキンエ細胞の軸索ガイダンスに異常が認められなかった。一方でこれらの結果との関連で、RORa と冗長な機能を有することが知られている核内受容体 RORb が軸索伸長期のプルキンエ細胞に発現していることが明らかとなった。したがって、RORa 遺伝子の Loss-of-function による影響が RORb によって補完されている可能性が考えられた。そこで今後、RORa と RORb のダブルノックアウトマウスを CRISPR/Cas9 によって作成し、プルキンエ細胞の軸索投射発達の表現型を解析していくことを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本耀介、辻尚弘、橘高敬太、白崎竜一
2. 発表標題 小脳の交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索ガイダンスにおけるNeuroD1の役割
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻尚弘、松本耀介、白崎竜一
2. 発表標題 小脳交連ニューロンのサブタイプ特異的な軸索ガイダンスを制御する転写調節因子
3. 学会等名 第43回 日本神経科学学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院生命機能研究科神経回路形成研究グループホームページ https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/shirasaki/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松本 耀介 (Matsumoto Yosuke)	大阪大学・生命機能研究科・大学院生 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	辻 尚宏 (Tsuji Naohiro)	大阪大学・生命機能研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	橋高 啓太 (Kittaka Keita)	大阪大学・生命機能研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	杉尾 拓飛 (Sugio Takuto)	大阪大学・基礎工学部・大学生 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関