

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650171

研究課題名(和文) In vivo イメージングによるプルキンエ細胞樹状突起形態形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Approaching the mechanisms of dendritic formation using in vivo two-photon imaging

研究代表者

竹尾 ゆかり (Takeo, Yukari)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：90624320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：神経細胞樹状突起の形成機構の解明は、神経系の正常機能や疾患の理解に重要な課題である。本研究では、小脳プルキンエ細胞を用いて樹状突起形成のメカニズム解明を目指した。プルキンエ細胞は生後2週目に成熟型樹状突起を発達させる。その過程でRORalpha遺伝子が枝分かれおよび突起のスパイン形成に必須であること、また、神経活動が不要な一次突起の除去および、突起の同一平面上への伸長を制御することを見出した。さらに、2光子顕微鏡を用いたin vivoイメージング法により、脳内で樹状突起が成熟する過程を経時的に可視化した。これらの成果は、哺乳類神経系における樹状突起形成機構の解明に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study explored mechanisms which underlie how mammalian dendrites grow in vivo during neural development. Using cerebellar Purkinje cells which develop their dendrites postnatally, I investigated molecular mechanisms of dendritogenesis during 2nd postnatal week. I found that RORalpha is crucial for formation of mature dendritic branch and spines, while neuronal activities are required for stem dendrite pruning and formation of monoplanar architecture of dendritic tree. Furthermore, live imaging using two-photon microscopy revealed dynamic remodeling of developing dendrite in vivo. These results provide insights into in vivo mechanisms of dendrite formation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：樹状突起 in vivo イメージング プルキンエ細胞

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は種類に応じて非常に多様な樹状突起形態を形成する。発達障害や精神疾患において樹状突起形態の異常が見られることも知られており、神経細胞の樹状突起形成機構の解明は、神経細胞の形態と神経回路における機能を理解するうえで重要な課題である。

樹状突起形態形成は遺伝子にコードされた内因的なプログラムのほか、神経活動や細胞外因子などの外因的要因によって制御される。しかしそのメカニズムについては不明な点が数多く残されている。その原因のひとつは、発達中の神経系における未熟な神経細胞の樹状突起の形成過程を、*in vivo* で機能修飾を施し、経時的に観察することが容易ではないことが挙げられる。

この課題に挑むため本研究では小脳プルキンエ細胞に着目した。小脳プルキンエ細胞は、細胞体から伸びた1本の1次樹状突起が、微細に枝分かれ一平面上に大きく広がった、複雑な美しい形態を示す。面白いことに、この樹状突起形態は生後約1週間の間のめまぐるしい形態変化を経て形成されることが、固定標本を用いた観察により知られている。生後直後のプルキンエ細胞は数本の細長い突起を伸ばした紡錘形をしているが、生後5日目までにいったんこれらの突起をすべて失う。この過程は ROR 遺伝子のはたらきにより内因的に規定されると考えられている。その後、再びすべての方向に樹状突起を放射状に伸張したのち、生後7-8日の間に、先端部分の1本の樹状突起を残して他の樹状突起が退縮し、突起分枝が単一平面上に並ぶようになる。この、複数の突起から樹状突起が1本化する過程の分子メカニズムはまったく不明である。

多くの神経細胞が樹状突起形成の主要な過程を胎生期に終了するのに対し、プルキンエ細胞は生後に樹状突起を発達させること、また特徴的な樹状突起形態を示すことから、プルキンエ細胞は古くから樹状突起研究の対象として注目されてきた。にもかかわらず、発達過程のメカニズム研究が遅れてきた理由の一つは、生後1週間未満という未熟なプルキンエ細胞を *in vivo* で可視化し、経時的に形態を観察することが困難だったことにある。

本研究ではこの問題点を克服するために、子宮内電気穿孔法を用いたプルキンエ細胞への遺伝子導入法と、2光子顕微鏡を用いた *in vivo* ライブイメージングによって、発達中のプルキンエ細胞の樹状突起形態を経時的に観察し、樹状突起の形成機構を解明していくことを着想した。

2. 研究の目的

本研究は、小脳プルキンエ細胞をモデルとして、神経活動などの外的因子が樹状突起形成を制御する分子機構を *in vivo* で解明する

ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 子宮内電気穿孔法の確立

In vivo の未熟なプルキンエ細胞へ、時期を選ばず、複数の遺伝子を発現させるための遺伝子導入法として、これまで大脳皮質や海馬において多くの実績がある子宮内電気穿孔法を、小脳神経回路へ応用することを着想した。まずプルキンエ細胞への遺伝子導入法を確立したのち、プルキンエ細胞へシナプスを形成する顆粒細胞(平行線維)と下オリブ核神経細胞(登上線維)そして、プルキンエ細胞のシナプス機能を制御することが知られているバグマングリアへ、特異的に多様な遺伝子導入を行う画期的な手法の開発を目指した。子宮内電気穿孔法は従来、胎生期に終末分化を遂げる細胞を標的とした遺伝子導入法であったが、最近、トランスポゾンを利用し胎生期前駆細胞のゲノムに目的遺伝子を組み込むことで、生後に発生・増殖する細胞種への遺伝子導入を可能とする手法が報告された。そこで本研究ではこのトランスポゾンシステムを応用し、生後に細胞発生ピークを迎える顆粒細胞およびバグマングリアへの子宮内電気穿孔法による遺伝子導入法樹立を試みた。

(2) *In vivo* イメージングの確立

マウス小脳プルキンエ細胞は、生後7-8日目の間にダイナミックな形態変化を経て成熟型樹状突起を形成させる。本研究ではマウス小脳プルキンエ細胞の樹状突起形態を生後7日目から数日間にわたって観察するため2光子顕微鏡による *in vivo* イメージング法の確立に取り組んだ。

具体的には、子宮内電気穿孔法によりプルキンエ細胞へ蛍光蛋白質 EGFP 遺伝子を発現させたマウスに対し、頭蓋骨部分切除による観察窓形成手術を行い、2光子顕微鏡を用いて同一のプルキンエ細胞を一定時間おきに撮影した。

4. 研究成果

本研究では子宮内電気穿孔法を用いたプルキンエ細胞への遺伝子導入法を確立した (European Journal of Neuroscience, 2012) 本手法により、複数のプラスミド遺伝子をプルキンエ細胞に選択的に発現させることが容易となった。また薬剤依存性 Cre/loxP システムの応用により、時期選択的に遺伝子発現を制御することも可能となった。本手法はプルキンエ細胞の樹状突起形態発達研究に多大に貢献するとともに、シナプス機能の発達過程などプルキンエ細胞を標的としたメカニズム解明に適した強力なツールである。

このように開発した遺伝子導入法により、プルキンエ細胞へ EGFP 蛋白質を発現させ、2光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージング法により、生後7~14日目までプルキンエ細胞

の形態を経時的に観察することに成功した。将来成熟型樹状突起となる突起の伸長および不要な突起の退縮を経て、1本の1次樹状突起と平面に広がった分枝が形成される過程を可視化し、同一の神経細胞の形態発達過程をはじめ経時的に観察した画期的な結果と言える。また子宮内電気穿孔法を応用して、登上線維、および、バグマンガリア細胞への遺伝子導入にも成功しており、今後これらの細胞とプルキンエ細胞の同時イメージングにより、シナプス入力やグリア相互作用が神経活動、および樹状突起形成を制御する分子機構にさらに迫っていく。

プルキンエ細胞樹状突起形成において外的な神経活動が果たす役割を解明するため、生後6日目から、神経活動を抑制する目的で内向き整流性カリウムチャンネルをプルキンエ細胞へ過剰発現させた。すると興味深いことに、通常は1本である成熟型1次樹状突起が、過剰に形成され、また分岐した突起の平面化が阻害されることが分かった。すなわち、プルキンエ細胞成熟型樹状突起の形成に、生後6日目以降の神経活動が必要であることが示唆された。

一方、古くからプルキンエ細胞において樹状突起形態発達に重要であることが示唆されている内的因子として、ROR 遺伝子が知られている。ROR の機能を喪失したプルキンエ細胞は、出生直後に見られる紡錘形の細胞形態を示すことから、ROR は出生直後の突起退縮過程を担うと考えられてきた。本研究では突起退縮後の樹状突起形成過程において内的因子の役割を確かめるため(図1)、ROR の発現を生後4日目からノックダウンしたところ、枝分かれに乏しく長い突起を発達させた、紡錘形の異常な形態を示すことを見出した。すなわち、ROR は、出生直後の突起退縮過程のみならず、成熟型樹状突起の形成過程にも必要である。さらにROR のノックダウンを行う時期を変えて、プルキンエ細胞樹状突起がほぼ成熟型の原型を形成する生後8日目以降にノックダウンを行うと、樹状突起は発達できないばかりか分岐が減少し、形態の委縮が観察された。樹状突起の委縮は、樹状突起形態を終了した生後3週目以降からノックダウンを行った場合にも観察された。

すなわちROR は、プルキンエ細胞で成熟型樹状突起の発達および維持に、幼若期から成体期にわたって重要な役割を果たすことが明らかになった。

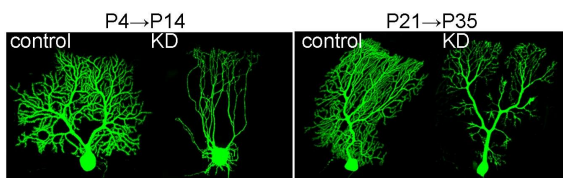


図1. 生後4日目(左)、21日目(右)からROR 遺伝子をノックダウンしたプルキンエ細胞の樹状突起形態

このように、本研究では、*in vivo* でプルキンエ細胞樹状突起の正常な形成にかかわる内的因子(ROR)および外的因子(神経活動)を明らかにした。今後、これらがどのように制御されながら樹状突起形態を形成させるのか、*in vivo* イメージングと、プルキンエ細胞へのシナプス入力・グリア相互作用の可視化および機能制御を組み合わせるさらなる分子機構を解明していきたい。

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 1 件)

(1)

Nishiyama J*, Hayashi Y*, Nomura T, Miura E, Kakegawa W, Yuzaki M (*co-first authors).

Selective and regulated gene expression in murine Purkinje cells by *in utero* electroporation. *European Journal of Neuroscience*, (査読有) 36:2867-2876. (2012).

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)

Yukari H Takeo, Eriko Miura, Wataru Kakegawa and Michisuke Yuzaki

Stage-specific roles of ROR□ in morphogenesis and maintenance of dendrites in the developing and mature Purkinje cell. *Neuro2013*, 2013年6月21日, 国立京都国際会館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹尾 ゆかり (TAKEO YUKARI)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：90624320

(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：