

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650231

研究課題名(和文)Cereblonにより脳内に新生した神経細胞の機能解析

研究課題名(英文)Functional analyses of newborn neurons in CNS by Cereblon overexpression

研究代表者

安藤 秀樹(Ando, Hideki)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10251844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：Cereblon (CRBN)を一過的に過剰発現したゼブラフィッシュ胚は拡大した脳を持つ。脳内には通常より多くの神経細胞とグリアが正常な空間分布で形成される。本研究ではこれらの過剰に分化した神経系が動物の高次機能に実際に貢献しているかを以下の方法で検証した。

- 1)カルシウムセンサーによる過剰発達した脳内ニューロンの活性測定：(結果)終脳のニューロンの安静時の活性は受精後6日目の稚魚で正常個体の約1.4倍に増加した。また光刺激時の活性も有意に増加した。
- 2)光刺激と電気ショックを用いた2方向性能動的回避学習：(結果)この解析でもCRBNを過剰発現した個体群の方が高い値を示した。

研究成果の概要(英文)：Zebrafish embryos overexpressing Cereblon (CRBN) showed enlarged brain. They have excess number of neurons as well as glia cells with spatially normal pattern. In this study, we investigated whether those increased neurons actually function in higher behavior of the animal by the following approaches.

- 1) Measurement of neural activity by the use of calcium sensor: (Results) Neural activities in the telencephalon were increased to 140% of normal ones in CRBN-overexpressed larvae at 6 days after fertilization both in resting condition and in light-stimulated condition.
- 2) Measurement of learning potential by the 2-directional active avoidance assay using combination of light stimulation and electrical shock: (Results) In this experiment, CRBN-overexpressed larvae showed higher score than normal ones.

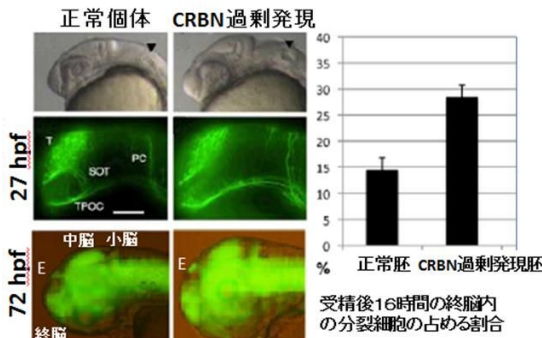
研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 脳機能

1. 研究開始当初の背景

代表者らはサリドマイド催奇性の標的因子として CRBN を同定し、四肢形成における分子機構の概要を世界で初めて明らかにした (Ito, Ando ら, Science, 2010)。代表者らは最近、CRBN をゼブラフィッシュ受精卵に一過的に過剰発現すると、中枢神経系で細胞分裂が活性化し、脳全体が拡大するとともに過剰な細胞群から多数の神経細胞が分化することを見出した (図 1)。これらの神経細胞

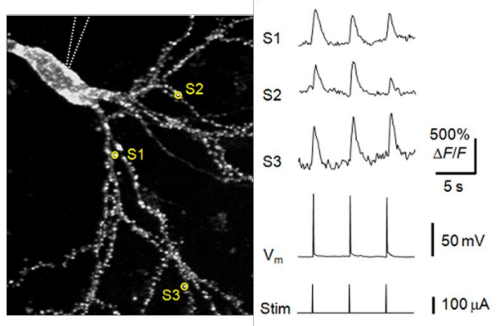


(図 1) CRBN 過剰発現胚の細胞分裂の活性化と増加した神経細胞。左図：受精後 27 時間、72 時間胚の神経系の可視化。E: 松果体。右図：受精後 16 時間胚の終脳内の分裂細胞の占める割合。

は密度の高い細胞体クラスターと太い軸索束からなる形態的に正常な神経回路網を形成し、発生の過程で消滅せず、成体まで存在する。この結果は CRBN が脳内で神経細胞を新生し維持する因子である可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、イメージングによる神経活動の解析と行動解析によって CRBN 過剰発現個体の神経系の働きを調べ、CRBN 過剰発現によって新生した神経細胞が正常に機能するかを明らかにする。それにより再生医療への応用展開を目指す。意義：脳の神経発生における CRBN の重要性が明らかにされ、神経新生時に



(図 2) 改良型 G-CaMP による測定例。改良型 G-CaMP を発現するマウス海馬 CA3 細胞。プレの神経線維を電気刺激 (Stim) し、ポストの CA3 細胞から電位 (Vm) と蛍光を記録した。閾値上の刺激に反応して spine (S1 ~ S3) で蛍光変化が捉えられている。

働く CRBN を介した全く新しいシグナル伝達経路が発見される可能性がある。また、CRBN シグナル伝達因子を標的とした創薬開発が可能となり、脳神経疾患、外傷による脳損傷、老化による痴呆などに対する神経の再生医療への応用展開が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 全脳の神経活動の検討

ゼブラフィッシュでは GAL4-UAS 発現システムを用いたジーントラップラインが整備されている。すべての神経細胞で GAL4 を発現するトラップラインと UAS-G-CaMP4 ラインとを交配することによって全脳で高性能の改良型 G-CaMP (図 2) を発現するラインを作成する。

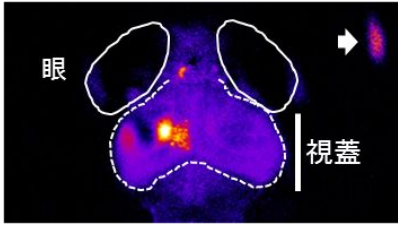
で作成した全脳で G-CaMP を発現する系統の受精卵に CRBN をコードする RNA をマイクロインジェクションし、CRBN 過剰発現個体を作成する。

CRBN 過剰発現個体と未処理個体を用いてイメージング解析を行なう。稚魚をアガーに埋めて保持し、低倍率の対物レンズを用いて G-CaMP の蛍光を CCD カメラで測定する。測定は稚魚が平静状態になったと判断された時点から行なう。全脳の大まかな脳活動を G-CaMP の蛍光によって解析し、両者の脳全体での安定した神経活動のレベルを比較することによって CRBN 過剰発現個体で異常な神経活動の亢進や減少がないかどうかを検討する。

ゼブラフィッシュのイメージングはメラニンの産生を阻害する 0.003 % 1-phenyl-2-thiourea (PTU) にて受精卵を処理し色素細胞の色をなくした個体を用いる。

(2) 感覚入力に対する脳内投射神経での活動性の検討

視蓋や小脳の GAL4 トラップラインを用いて、改良型 G-CaMP を視蓋や小脳に発現するトランスジェニック系統が既に作成されている。遺伝学研究所の川上博士と連携研究者の中井博士との共同研究で餌を見た時の視蓋のイメージングが行なわれている (図 3) (Muto ら, Current Biology



(図 3) 改良型 G-CaMP を視蓋に発現させた魚にエサを見た時の反応を CCD カメラで撮影した。右上の白矢印はエサ。中央は視蓋。エサに対応して左の視蓋に蛍光変化が見られる。上図の様な低倍率でははっきりしないが、高倍率では神経細胞 1 つ 1 つの活動が追える。

23, 307-311, 2013)。この系統の受精卵に CRBN をコードする RNA をマイクロインジェクションし、過剰発現個体を作成する。LED ディスプレイを用いて稚魚に赤い光が動くように見せて、視蓋の神経活動を可視化し、光刺激と視蓋の蛍光変化を対応付けて機能的マッピングと定量的な解析を行なう。

(3) 学習の行動解析

CRBN 過剰発現個体に対する恐怖条件付けに対する学習行動

まず正常個体と CRBN 過剰発現個体の若齢魚を用いて特定の波長光 (条件刺激) と忌避非条件刺激 (電気ショック) による 2 方向性能動的回避学習 (Pradel ら、1999) を行う。未処理の個体と CRBN 過剰発現個体に水槽内で条件刺激を提示後、一定時間内に電気ショックが与えられない側に回避するまでに要した試行回数と時間を統計的に比較し有意な差があるかを検証する。

optokinetic response (OKR) (運動学習) 正常および CRBN 過剰発現個体の稚魚で実験を行う。

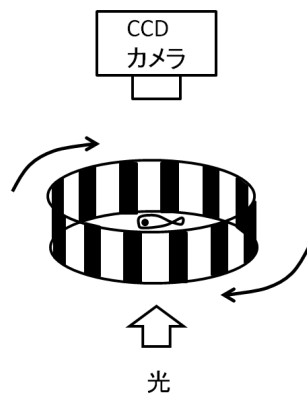
1) OKR 用視覚刺激装置について: 円筒形の筒に白黒のストライプを付けて、円筒形の筒を電動モーターで回転できるような装置 (Beck ら、J

Neurophysiol., 2004) を作成済みである (図 5)。

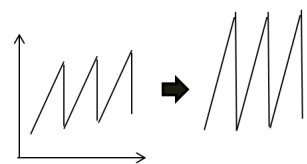
2) OKR による運動学習実験: 1 時間の OKR 刺激トレーニングを 4 時間ごとに 3 回行う。トレーニングの間隔は検討する (図 6)。

3) OKR の測定: 実体顕微鏡の上

に OKR 用視覚刺激装置を置き、円筒の中央に稚魚の入った小ペトリディッシュを置く。3%メチルセルロースを入れておき稚魚の体の移動を抑制する (眼の動きには影響しない)。稚魚の下から光を照らして、実体顕微鏡を



(図 5) 視覚刺激装置と OKR の測定の模式図



(図 6) OKR のトレーニングにより眼振の運動量が大きくなる。

介して上から CCD カメラで撮影する。画像を二値化して、目の部分は黒いので輝度により眼の部分抽出し、サッケードの角度、速度をコンピュータソフトで計算する。

4. 研究成果

(1) カルシウムセンサーによる過剰発達した脳内ニューロンの活性測定:(結果)ニューロンの活性の測定は蛍光が観察しやすい終脳に限定した。終脳のニューロンクラスター全体の安静時の活性は受精後 6 日目の稚魚で正常個体の約 1.4 倍に増加した。また光刺激時の活性も同様な倍率で有意に増加した。ただし LED による光刺激は包埋したアガー内の位置、個体の生理条件によって誤差があるので、今後さらなる測定条件の改良が必要である。

(2) 光刺激と電気ショックを用いた 2 方向性能動的回避学習:(結果)この解析でも CRBN を過剰発現した個体群の方が高い値を示した。試行回数は解析に用いた個体数により受精後 6 日から 3 か月まで $n=50$ から $n=10$ まで幅があるので各発生時期ごとの統計処理を分厚く行い、学習能力の発達過程を定性化することが重要である。また成魚の場合、CRBN 過剰発現個体では通常時の運動量 (10 秒当たりの尾びれ振り回数) も正常個体の約 1.4 倍であった。これが単なる運動の活性化によるものか、検査者 (ヒト = 給餌者) に対する学習によるものかは検証を要する。

(3) OKR による運動学習:(結果)OKR の測定では未処理個体と CRBN 過剰発現個体の間に有意な差は認められなかった。しかし円筒の回転数とトレーニングの間隔の最適な条件の検討は終わっておらず、最終的な結論には至っていない。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Hideki Ando, Takumi Ito, Hiroshi Handa. Cereblon, a new regulator of stem cell proliferation in zebrafish central nervous system. 1st zebrafish for personalized/precision medicine conference (Invited). Oct 16-18, 2013. St. Michael's Hospital, Toronto, Canada

[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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 秀樹 (ANDO, Hideki)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10251844

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

半田 宏 (HANDA, Hiroshi)
東京医科大学・医学部・特任教授
研究者番号：80107432

中井 淳一 (NAKAI, Juniti)
埼玉大学・総合研究機構脳科学融合研究センター・教授
研究者番号：80237198

安藤 恵子 (ANDO, Keiko)
埼玉大学・総合研究機構脳科学融合研究センター・特任准教授
研究者番号：40221741