

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05114

研究課題名(和文)オピオイドリガンドに対する中枢神経応答システムの生理作用特異的な分解

研究課題名(英文) Decomposition of the neuronal mechanisms of opioid receptor ligands-induced physiological responses

研究代表者

櫻井 勝康 (Sakurai, Katsuyasu)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

研究者番号：70507920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経科学の最大の目的の一つは、行動や生理反応を生み出す神経基盤、即ち神経回路がどのように情報処理を行っているのかを明らかにすることである。そのためには、複雑な脳システムを作り出しているヘテロな細胞集団の中から行動や生理反応に関わる特定の細胞群を同定し、その細胞群における情報処理システムを明らかにする必要がある。本研究課題では、入力(刺激や薬物)に対して活性化する神経細胞を特異的に標識し、その機能や神経回路さらには遺伝子発現を解析するための研究ツールを最適化した。さらには、研究ツールを発展させ、二種類の異なる入力に対して、共通して活性化する神経細胞を標識するシステムも確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、神経回路がどのように情報処理を行い、行動や生理反応を生み出すかを解明する技術的進歩にある。特に、本研究で確立したシステム 二種類の異なる入力に対して、共通して活性化する神経細胞を標識するシステム は特定の神経細胞を高精度で標識し、複雑な脳の情報処理機構を詳細に解析することを可能にする。社会的意義としては、この技術が中枢神経薬の副作用を減少させ、より特異的で効果的な治療薬の開発に貢献する可能性がある。特に、神経疾患や精神疾患の治療法の改善に役立ち、患者の生活の質向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：One of the primary goals of neuroscience is to elucidate how neural circuits, which are the neural substrates that generate behavior and physiological responses, process information. To achieve this, it is essential to identify specific population of neurons involved in behavior and physiological responses from the heterogeneous neuronal populations that constitute complex brain systems and to elucidate the information processing systems within those neurons. In this research project, we optimized the research tool to specifically label neurons activated in response to inputs (stimuli or drugs) and to analyze their functions, neural circuits, and gene expression. Furthermore, we developed this research tool to establish a system that labels neurons commonly activated in response to two different types of inputs.

研究分野：神経科学

キーワード：cFos 神経活動依存的標識法

1. 研究開始当初の背景

神経科学の最大の目的の一つは、行動や生理反応などの表現型を生み出す神経基盤、即ち神経回路がどのように情報処理を行い、そしてその情報を送り出しているのかを明らかにすることである。そして、脳内の複雑な情報処理機構を明らかにするためには、処理される情報を単純かつ特異的な要素に分解することが必要であると考えられる。例えば、感覚情報の脳内処理機構は、情動や認知機能の脳内処理機構に比べ、非常に理解が進んでいる。この理解度や進展度の違いは、感覚刺激は単純化することができ、刺激と神経活動、そしてその情報処理に関わる神経細胞群を一对一对で捉えることができるためであると考えられる。つまり、視覚-光、聴覚-音、嗅覚-匂い、などである。中枢神経薬は主に病気の治療、予防のために開発されたものであるが、その作用の特異性から、感覚情報の脳内処理機構の理解と同様に、刺激(薬)と生理作用を一对一对で捉える、すなわち単純化することができ、薬に対する生理作用に関わる情報処理機構の解明に非常に有用なツールとなりうる。しかし、多くの中枢神経薬は複数の生理作用が絡み合い、その薬理作用を示す。したがって、それぞれの生理作用を生み出す特異的な神経メカニズムを明らかにすることができれば、薬の生理作用に関わる情報処理機構の解明だけでなく、副作用の少ない、より特異的な中枢神経薬の開発に資することができる。そのためには、中枢神経薬の生理作用を分解し、各作用に関与する神経回路を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

我々ヒトを含めた哺乳類は非常に複雑化した脳神経系を有し、様々な情報処理を行っている。そして、神経科学の最大の目的の一つは、行動や生理反応を生み出す神経基盤、即ち神経回路がどのように情報処理を行っているのかを明らかにすることである。本研究では、脳内の情報処理機構を理解するために、複雑な脳システムを作り出しているヘテロな細胞集団の中から行動や生理反応に関わる特定の細胞群を同定し、その細胞群における情報処理システムを確立する。

3. 研究の方法

本研究では、活性化した神経細胞を特異的に標識・操作するために、CANE システム (Sakurai et al., 2016) を用いた。なお、本研究において、この CANE システムを改良、さらには改変しており、その詳細は研究成果に記載している。

4. 研究成果

(1) CANE システムの改良

薬物(中枢神経薬)の生理作用のメカニズムを明らかにするためには、その薬物によって活動する神経細胞を中心とした神経回路、機能、さらには遺伝子発現を明らかにする必要がある。そのための研究アプローチ一つは、薬物によって活性化した神経細胞のみを特異的に標識・操作する方法である。我々は、神経活動依存的な標識・操作法である CANE (Capturing Activated Neural Ensembles) システムを用いることにより、薬物によって活性化した神経細胞を特異的に標識することにした。CANE システムは、神経活動依存的に発現が誘導される *Fos* 遺伝子の性質を利用した技術であり、*Fos* の発現依存的にウイルスレセプターである TVA を発現するノックインマウス (*Fos^{TVA}* マウス) と、TVA レセプターに特異的に結合する変異型レンチウイルス (CANE-LV-GeneX) から構成される。CANE システムを用いて特定の薬物によって活性化する神経細胞を標識するためには、まず、*Fos^{TVA}* マウスに薬物を投与し、標的神経細胞を活性化させる。この際、活性化した標的神経細胞では、*Fos* だけでなく、TVA が発現する。したがって、この標的神経細胞の近傍に CANE-LV-GeneX を微量注入することにより、活性化した神経細胞にのみ CANE-LV-GeneX が感染し、標識することが可能となる。これまでの研究により、標的神経細胞の標識において、その標識の高い特異性(非特異的な標識が少ない)と高効率(活性化した神経細胞の多く)の標識を達成するための問題点が浮き彫りになった。その問題点とは以下の3点である。1. 純度の高い CANE-LV-GeneX が必要、2. 高力価の CANE-LV-GeneX が必要、3. 非特異的な標識を減少させる。本研究成果においては、これら3つの問題点を解消することができた。

1. 純度の高い CANE-LV-GeneX の作製

ウイルス作製の際に混入する煩雑物が多ければ多いほど、ウイルス注入部位の細胞死もしくは非特異的な活性化が引き起こされてしまう。これまでの研究において、煩雑物の多くはウイルス作製の際に用いる血清(FBS)由来である可能性があった。そのために CANE-LV-GeneX を作製する際には、低い濃度の血清でも細胞増殖などに影響を与えない細胞培養液に 2%FBS を加えた細胞培養液を用いるようにしていた。これにより、ウイルス作製の際に混入する煩雑物を減少することができたが、できるだけ煩雑物が少ないウイルスを安定的に作製することができなかつた。これは、血清のロットなどの違いによるところが大きいと推察された。そこで、血清(FBS)由来の煩雑物をより安定的に減少させるために、これまでは行ってこなかった血清の濾過をお

こなった。その際、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いた濾過と $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いた濾過の二段階濾過を行った。その結果、これまでウイルス注入部位で見られたデブリ（おそらくウイルスに含まれていた煩雑物）の減少が認められた。

2. 高力価の CANE-LV-GeneX の作製

これまで高力価の CANE-LV-GeneX を作製するために、低速（6000 G）の遠心を長時間（18 時間以上）行ってウイルスを含んだ細胞培養液を濃縮したのちに、沈殿したウイルスを PBS（phosphate buffer saline）で再懸濁し、さらに遠心濃縮チューブで濃縮していた。この方法で高力価のウイルスを作製することができたが、安定的に高力価のウイルスを作製することが困難であった。これまでに報告されているウイルスの作製方法を参考に、試薬、トランスフェクション方法を変更したが、いずれの場合でも高力価のウイルスを安定的に作製することはできなかった。しかし、遠心濃縮チューブを不動化することにより、これまで安定して作製できなかったウイルスを作製できるようになった。つまり、CANE-LV は遠心濃縮チューブの限外ろ過膜に吸着しやすい性質を持っていた可能性が考えられた。なお、不動化の際には 1% の BSA を用いた。

3. 非特異的な標識の減少

前述のように CANE システムで活性化した神経細胞を標識するためには、標的脳領域にウイルスを微量注入する必要がある。その際、脳の傷害を極力減らすために、微細ガラスピペットを用いてウイルスを注入する。これまでの研究において、この微細ガラスピペットが通った標的脳領域までの経路や標的脳領域において、刺激非依存的な標識を認めることがあった。つまり、非特異的な標識である。この非特異的な標識が認められる場合と、認められない場合があったが、その原因はわからなかった。可能性の一つとしては、微細ガラスピペット挿入によって傷害が引き起こされた神経細胞が活性化した（Fos を発現した）可能性が考えられた。しかし、非特異的な標識が認められる場合と認められない場合があったことから、傷害依存的な非特異的な標識の可能性は低いのではないかと考えた。その他の原因としては、ウイルス注入の際の craniotomy の際に認められる体液もしくは血液が微細ガラスピペットをつたわって脳内に流入し、神経細胞の非特異的な活性化を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、体液や血液の流入を極力防ぐために、craniotomy をおこなった脳の表面に滅菌吸収性ゼラチンスポンジを貼付し、滲出する血液や体液を吸収させ固着した。その結果、非特異的なウイルス感染が劇的に減少した。したがって、これまで認められた非特異的な標識は傷害依存的よりも、craniotomy を行った脳表面の体液もしくは血液が流入したことによる可能性が示唆された。

上記の 1~3 によって CANE システムを改良した。改良した CANE システムを検証するために、一般麻酔（イソフルラン曝露）によって活性化する視床下部の一部の神経細胞群の標識を試みた（図 1）。その結果、非特異的な標識はほとんど認められず、一般麻酔で活性化した神経細胞を特異的かつ高効率で標識することができた。

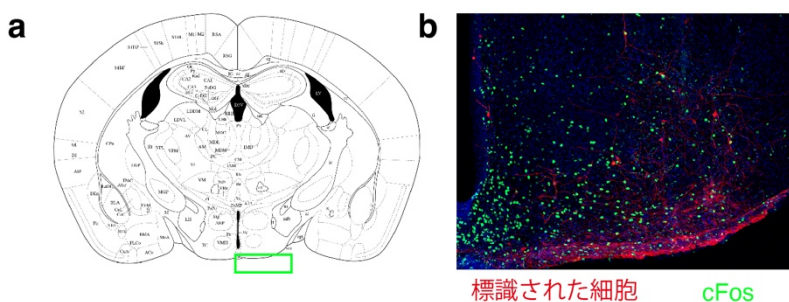


図 1. CANE システムによる一般麻酔で活性化する視床下部の神経細胞の特異的標識

a. 一般麻酔で活性化する視床下部の領域の模式図（cFos を発現）。b. CANE システムで一般麻酔で活性化した神経細胞を特異的に標識した（赤色）。標的領域以外での標識はほとんど観察されない。

(2) CANE システムの改変

前述のように薬物（中枢神経薬）の生理作用のメカニズムを明らかにするためには、標的となる神経細胞を中心とした神経回路、機能さらには遺伝子発現の解析が必要である。そのためには、標的神経細胞を特異的に標識する必要がある。

マーカー遺伝子依存的な標識法は、神経科学の研究手法において現在でも非常に有用な手法である。しかし、ヘテロな細胞集団において、特定の行動に関わる細胞群のみに発現しているマーカー遺伝子は非常にまれである。しかし、二種類のマーカー遺伝子が共発現している細胞群を捉えることができれば、ヘテロな細胞集団の中からより特定の細胞群のみを標識することが可能となる。我々を含めた研究グループはこれまでに、二種類の異なる遺伝子が共発現する細胞群

を特異的に捉えるシステムとして、シアノバクテリアで発見されたペプチドである intein を介したタンパク質スプライシング (Evans et al., J Biol Chem, 2000) を利用した、split-intein-split-Cre システムを開発した (Wang et al., Sci. Rep., 2012)。この split-intein-split-Cre システムは、intein ペプチドのトランス-プロテイン-スプライシング作用を利用することにより、N 末側と C 末側に二分した Cre リコンビナーゼが非常に効率よく再結合して機能的な Cre リコンビナーゼとして機能する。例えば、CreN-inteinN と inteinC-CreC をそれぞれ異なる遺伝子の制御化で発現させることにより、これらの遺伝子が共発現する細胞のみで Cre リコンビナーゼが機能する。split-intein-split-Cre システムは標的とする細胞群で発現している遺伝子が既知のものであれば、非常に強力なツールとなる。しかし、遺伝子発現を網羅的に解析し、共発現するマーカー遺伝子を探索する必要がある。

作用機序が異なるが、その表現型 (生理作用) が同一の 2 種類の薬物がある場合、その生理作用に関わる神経細胞は同一である可能性が考えられる。したがって、2 種類の異なる薬物によって共通して活性化する神経細胞を同定し、その神経細胞を中心とした神経回路、機能、遺伝子発現を解析することによって、その薬物作用の中心的な役割を担う神経システムを明らかにすることが期待できる。そのためには、2 種類の異なる薬物によって共通して活性化する神経細胞を特異的に標識する必要がある。そのために、我々は、CANE システムと split-intein-split-Cre システムを融合し、Split-CANE システムの開発を試みた。

まず、CANE-LV-CreN と CANE-LV-CreC を作製し、TVA および Cre 依存的にレポーター遺伝子である mCherry が発現する HEK293 細胞に感染させた。その結果、CANE-LV-CreN、CANE-LV-CreC を単独で感染させた場合には mCherry の発現は認められなかった (図 2)。しかし、CANE-LV-CreN と CANE-LV-CreC を共感染させた細胞では mCherry の発現が認められた。このことから、Split-CANE システムは *in vitro* の実験系では機能することが確認できた (図 2)。次に Split-CANE システムが *in vivo* の実験系でも機能するかを検証した。その際、2 種類の異なる刺激 X と Y で共通して活性化する脳領域である視床下核 (PVT) を標的とした (図 3)。まず、刺激 X を与えた後に PVT に CANE-LV-CreN を微量注入した。これより、刺激 X で活性化した PVT の神経細胞に CANE-LV-CreN が感染し、CreN が発現する。2-3 週間、マウスの回復を待った後に、同一のマウスに刺激 Y を与え、PVT に CANE-LV-CreC を微量注入した。これにより、刺激 Y で活性化した PVT の神経細胞に CANE-LV-CreC が感染し、CreC が発現する。刺激 X と Y で共通して活性化した PVT の神経細胞では、CreN と CreC が共発現し、Cre リコンビナーゼが機能する。共通して活性化した神経細胞を可視化するために、Cre 依存的にレポーター遺伝子である mCherry が発現するアデノ随伴ウイルスを共注入している。その結果、刺激 X と Y で共通して活性化した神経細胞で mCherry の発現が認められた (図 3)。

脳は外部からの多様な刺激と内部状態を絶えず統合し、認識、意思決定、学習、記憶などの高次機能を実現する複雑な情報処理機構を持っている。この情報統合のプロセスの解明は、脳の動作原理を理解する上での中心的課題であり、特定の神経細胞が異なる情報源からの入力をどのように統合し、適応的な行動や意思決定を支えているのかの理解は、新しい治療法の開発に繋がる可能性を秘めている。異なる刺激に対して共通して活性化し、複数の情報源からの入力を統合することで、特定の反応や行動を誘導する神経細胞は、脳の情報処理における「統合の枢軸」として機能し、脳の高次機能において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。したがって、そのような特定の神経細胞の機能や神経回路、さらには遺伝子発現の解析において、Split-Cre システムは強力な研究ツールとなることが期待できる。

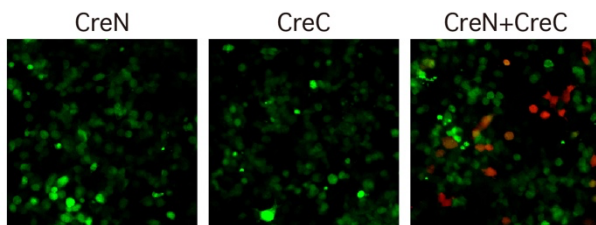


図 2. Split-CANE システム (*in vitro*)

緑：TVA が発現している細胞

赤：CreN と CreC の両方を感染させることにより、レポーター遺伝子の mcherry (Flex-mCherry) が発現する。

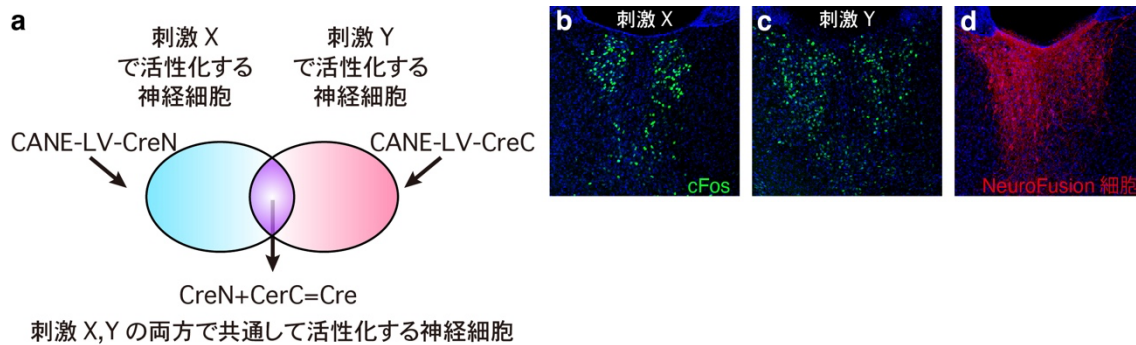


図 3. Split-CANE システム (in vivo)

a. Split-CANE システムの模式図。

b, c. 刺激 X, Y は同じ領域を活性化させる (cFos を発現)。

d. Split-CANE システムによって、刺激 X, Y で活性化した神経細胞にそれぞれ CreN, CreC を発現させた。X, Y で共通して活性化した神経細胞にのみ機能的 Cre が発現し、レポーター遺伝子を発現する。

<引用文献>

- ① Evans TC Jr, Martin D, Kolly R, Panne D, Sun L, Ghosh I, Chen L, Benner J, Liu XQ, Xu MQ. Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of *Synechocystis* species PCC6803. *J Biol Chem.* 2000 Mar 31;275(13):9091-4. doi: 10.1074/jbc.275.13.9091. PMID: 10734038.
- ② Wang P, Chen T, Sakurai K, Han BX, He Z, Feng G, Wang F. Intersectional Cre driver lines generated using split-intein mediated split-Cre reconstitution. *Sci Rep.* 2012;2:497. doi: 10.1038/srep00497. Epub 2012 Jul 6. PMID: 22773946; PMCID: PMC3390602.
- ③ Sakurai K, Zhao S, Takatoh J, Rodriguez E, Lu J, Leavitt AD, Fu M, Han BX, Wang F. Capturing and Manipulating Activated Neuronal Ensembles with CANE Delineates a Hypothalamic Social-Fear Circuit. *Neuron.* 2016 Nov 23;92(4):739-753. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.015. Epub 2016 Oct 27. PMID: 27974160; PMCID: PMC5172402.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakurai Katsuyasu	4. 巻 175
2. 論文標題 Rethinking c-Fos for understanding drug action in the brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 377 ~ 381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻井勝康
2. 発表標題 新規機能的コネクトーム解析法
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井勝康
2. 発表標題 ON-OFFを見る -神経活動の遷移の大規模な可視化-
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------