

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21759

研究課題名（和文）セントラルコマンド機能を司る中枢神経細胞の解明：遺伝子改変ラットを用いた新戦略

研究課題名（英文）Studies on central command neurons and rat transgenesis

研究代表者

木場 智史（Koba, Satoshi）

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40565743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本計画ではFosTRAP法（何らかの外的刺激に興奮する神経細胞のみへの遺伝子工学的介入を可能とする方法）を行うのに必要となる遺伝子改変ラットの作出に成功した。この遺伝子改変ラットを用いて運動興奮性神経に対するラットFosTRAP法を確立し、その手順を吟味した。そしてラットFosTRAP法を用いることで、運動興奮性神経の交感神経活性を調査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FosTRAP法はある時間中に活性化した神経細胞限定的に遺伝子工学的介入を可能とする方法であり、様々な生理条件や疾患の中枢メカニズムの機序解明研究に資する技術である。運動時交感神経活性の機序解明を進めている研究代表者は、交感神経活動の実測が可能なラットでのFosTRAP法開発の重要性を確信し、本計画を立案した。本研究において確立したラットFosTRAP法は、運動時交感神経活性メカニズムの解明のみならず、様々な生理学・神経科学研究に応用・活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we have successfully generated a novel rat strain that expresses the tamoxifen-dependent recombinase CreER in an activity dependent manner from the endogenous locus of the immediate early gene Fos. With this rat strain, we next established the “FosTRAP” protocol to obtain permanent genetic access to distributed neuronal populations that are activated by 1-2 h voluntary treadmill running exercise. By combining the rat FosTRAP with optogenetics and in vivo physiological experiments, we further investigated the role of treadmill exercise-activated hypothalamic neurons in regulating sympathetic nervous system activities. The FosTRAP technique in rats will contribute to our understandings of brain mechanisms underlying physiological phenomenon in health and disease.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：FosTRAP 遺伝子改変ラット 運動 交感神経 光遺伝学 セントラルコマンド CRISPR-Cas9

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

運動時の交感神経活性を司る脳メカニズムは、一世紀以上に渡る運動生理学の課題[Johansson 1893]である。「脳高位より生じる運動発現の意志 = セントラルコマンド(CC) は、運動系と交感神経系とを活性する」とされるが、その実体は不明である。そこで研究代表者はCCの明文化を目指し、その中枢回路の解明を進めている。最近、中脳歩行誘発野から延髄吻側腹外側野へとつながるグルタミン酸作動性の中枢経路(MLR-RVLM 経路)は走行運動時の運動制御と交感神経活性の両方を担う、すなわちCCの中枢回路の一端である、ことを突き止めた[Koba *et al.* *in revision*]。ただしこの中枢経路の構成神経の全てが走行運動によって興奮したものではない(神経活性マーカータンパク質である Fos の発現調査から)。運動によって興奮する神経がCCの真の根幹であると考えるのが合理的であり、CCの明文化のためには運動興奮性神経の機能を非興奮性神経と切り分けて理解する必要がある。

何らかの外的刺激に興奮する神経細胞のみへの遺伝子工学的介入を可能とする、遺伝子改変マウスを用いた手法が確立されている(FosTRAP法, Guenther *et al.* 2013. doi: 10.1016/j.neuron.2013.03.025.)。FosTRAP法で用いる遺伝子改変マウスでは神経活性マーカータンパク質である Fos 発現細胞において Cre と改変型エストロゲン受容体 ER^{T2} との融合タンパク質が発現する。通常時にはこの融合タンパク質は細胞質に局在するが、ER^{T2} のアゴニストであるタモキシフェンが存在すると核へと移行する。すなわち、特定の刺激をあたえるとともにタモキシフェンを投与することによって、その刺激によって興奮した (=Fos 発現が誘導された) 細胞のみに Cre-loxP 部位特異的の DNA 組換え反応を誘導できる。

FosTRAP法を用いれば、運動によって興奮した神経のみの機能や形態・投射回路を調査できる。しかしマウスはその小ささから、CC機能の評価に必要な *in vivo* 生体信号(交感神経活動等)を得るための外科手術の多くが実施できず、CCメカニズムの解明研究に不向きである。

2. 研究の目的

ラットはマウスよりも大きく、マウスでは実施困難な外科手術を行うことが可能である。また運動嗜好性が高く、運動生理学研究に適する。近年のCRISPR-Cas9によるゲノム編集技術の飛躍的革新は、ラットの遺伝子改変を簡便・確実とした。本研究では、Fos発現とともに Cre と ER^{T2} の融合タンパク質を発現する遺伝子改変 Fos-CreER^{T2} ラットを作成してラット FosTRAP法の確立を目指した。そして走行運動時に興奮する脳神経集団の交感神経活性能を解析した。

3. 研究の方法

「(1) 遺伝子改変 Fos-CreER^{T2} ラットの作出」「(2) 作出したラットを用いた運動興奮性神経に対するラット FosTRAP法の確立」「(3) ラット FosTRAP法を用いた運動興奮性神経の機能調査」を行った。具体的な実験手順は、「4. 研究成果」内に結果とともに記した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変 Fos-CreER^{T2} ラットの作出

内因性 Fos の promoter 下に融合タンパク質を挿入することで遺伝子改変 Fos-CreER^{T2} ラットの作出を試みた。そのためには Fos の 1 アレルを欠損させる必要があり、Fos のヘテロ欠損がラット性状に与える影響を明らかにする必要があった。そこで、Fos の DNA 配列を認識するガイド RNA および Cas9ヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質を顕微注入したラット受精卵を、偽妊娠ラットに卵管移植した。PCRによる遺伝子検定から確認した KO ラットの繁殖からヘテロおよびホモ KO ラットを得、それらの性状を調査した。ホモ KO ラットでは切歯の欠損など骨格系の発育不良が見られた一方で、ヘテロ KO ラットではそれらの異常は認められなかった。この知見は論文原稿にまとめ、2022年6月現在投稿中である(Yoshimura *et al.*)。また、ホモ KO ラットはナショナルバイオリソースプロジェクト-ラットに寄託しており、論文発表次第公表予定である。

そして CreER^{T2} のノックインのために、Fos の DNA 配列のガイド RNA、Cas9 タンパク質、および CreER^{T2} 遺伝子を含むノックインベクターをラット受精卵に顕微注入した。偽妊娠ラットに卵管移植後、得られる産仔から抽出した DNA を用いて PCR による遺伝子検定を行った。Fos-CreER^{T2} ラットの作出成功を確認し (F0, 4/18 頭)、選抜・繁殖させた。

(2) Fos-CreER^{T2} ラットを用いた運動興奮性神経に対するラット FosTRAP法の確立

ナショナルバイオリソースプロジェクト-ラットを介して、Cre 依存に tdTomato を発現するレポーターラット (NBRP Rat No: 0734) (Igarashi *et al.*, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0155687.) を入手した。このレポーターラットと Fos-CreERT2 ラットとを交配させ、タモキシフェン作用中に興奮する神経細胞に tdTomato が発現する遺伝子改変ラット (F1 ラット) を作出、選抜し、繁殖させた。

随意的トレッドミル走行運動による興奮神経に対する FosTRAP法の妥当性を、F1 ラットを用いて検証した。当研究グループのプロトコルに従って (Kumada *et al.*, 2017. doi: 10.1016/j.autneu.2017.09.014.)、F1 ラットがトレッドミル走行運動 (18 m/分、傾斜なし、1-

2時間)を随意的に行うようになるように訓練した。「随意的トレッドミル走行運動によって興奮する神経細胞に FosTRAP 法を適用できるか」を検証するために、一時間の運動あるいはコントロール試行(走行運動をせずにトレッドミル上にいる)直後に四水酸化タモキシフェン(4-OHT, 12.5 mg)を腹腔投与し、ケージに戻した。二週間以上後にかん流固定、抜脳して冠状切片を作成し、免疫染色によって tdTomato シグナルを増強した後に顕微鏡観察した。運動群では tdTomato 陽性細胞が脳の様々な領域で分布した一方で、非運動・対照群では脳内の tdTomato 陽性細胞の存在は限定的であった(図1)。この結果から tdTomato 発現上昇の原因は随意運動であると結論でき、随意的トレッドミル走行運動によって興奮する神経細胞への FosTRAP 法の確立に成功したと判断した。

また、FosTRAP 法を施すのに最適な 4-OHT 投与量も検討した。4-OHT 投与量が 6.25 mg の場合では運動群における tdTomato 陽性細胞が顕著に減少した一方で、投与量を 25 mg に増量しても tdTomato 陽性細胞数の劇的な増加は認められなかった。そこで、12.5 mg を 4-OHT の投与量として採用することとした。さらに、走行運動時間を二時間とし、運動開始一時間後に 4-OHT (12.5 mg) を投与するプロトコルでも、運動興奮性神経を”FosTRAP”できることを確認した。

次に、「ある日の運動によって興奮した神経細胞は別日の運動によっても興奮するか」について、F1 ラットを用いて検証した。ある日の運動によって興奮する神経細胞を FosTRAP 法による tdTomato 発現によって判別し、別日の運動によって興奮する神経細胞を Fos の免疫染色によって判別した。延髄吻側腹外側野や視床下部外側野(LH)、皮質運動野などにおいて、tdTomato と Fos の共陽性神経細胞が多く見つかった(図2)。ある日の運動によって興奮した神経のおおよそは別日の運動によっても興奮したものと考えられる。運動のたびに活性化する神経は、セントラルコマンドの機能生成の根幹かもしれない。

(3) ラット FosTRAP 法を用いた運動興奮性神経の機能調査

上述の tdTomato と Fos の発現を解析した実験において両者の共陽性神経細胞が多く見つかった脳領域のうち LH に着目した。FosTRAP 法および光遺伝学を組み合わせた *in vivo* 生理実験から、運動興奮性 LH 神経の交感神経調節能を調査した。Fos-CreER^{T2} ラットの LH に Cre 依存に青光感受性陽イオンチャネル ChR2 をコードするアデノ随伴ウイルス(AAV)液を注入した。AAV 注入後 3 週以上後に、運動興奮性神経への FosTRAP 法を施すことで(二時間の随意的トレッドミル走行運動の運動開始一時間後に 4-OHT (12.5 mg) を投与)、運動興奮性 LH 神経における ChR2 発現を誘導した。FosTRAP を実施してから三週以上後、麻酔 Fos-CreER^{T2} ラットの LH あるいは RVLM への青光照射に対する交感神経活動および循環反応を記録した。運動興奮性 LH 神経の光遺伝学刺激(LH への青光照射)は腎交感神経活動を抑制した一方で、RVLM に投射する運動興奮性 LH 神経の刺激(RVLM への青光照射)は昇圧反応を誘導した(図3)。交感神経活性を持つ LH 神経は RVLM への投射を介して運動時の交感神経活性反応に貢献する可能性が考えられた。

以上のように、本計画では遺伝子改変 Fos-CreER^{T2} ラットの作出に成功した。そして運動興奮性神経に対するラット FosTRAP 法を確立し、その手順を吟味した。さらに、ラット FosTRAP 法および光遺伝学を組み合わせた *in vivo* 生理実験から、運動興奮性神経の交感神経制御能を調査した。CC の脳内メカニズムの解明研究の推進のために、今回開発したラット FosTRAP 法を活用する予定である。

実験動物としてラットはマウスにはない特徴・長所を有する。本計画で確立したラット FosTRAP 法は様々な生理学・神経科学研究に応用が可能であり、今後の活用が期待される。

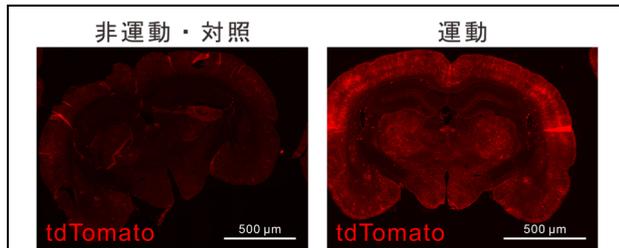


図1 視床下部(ブレグマより 3.0 mm 尾側)の冠状切片。

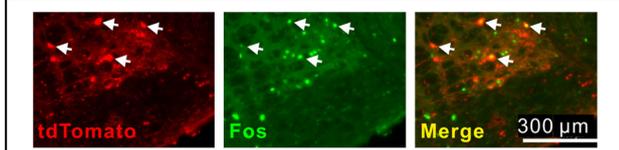


図2 RVLM における一回目の運動での興奮神経(tdTomato)と二回目の運動での興奮神経(Fos)。矢印は共陽性神経。

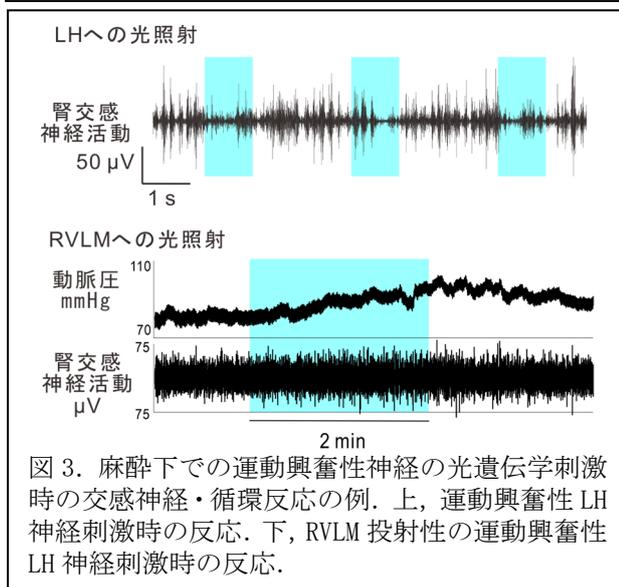


図3 麻酔下での運動興奮性神経の光遺伝学刺激時の交感神経・循環反応の例。上、運動興奮性 LH 神経刺激時の反応。下、RVLM 投射性の運動興奮性 LH 神経刺激時の反応。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Koba Satoshi, Hanai Eri, Kumada Nao, Watanabe Tatsuo	4. 巻 319
2. 論文標題 Sympathoexcitatory input from hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to rostral ventrolateral medulla is enhanced after myocardial infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H1197 ~ H1207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00273.2020	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 -

1. 著者名 木場 智史, 奈良井 絵美	4. 巻 58
2. 論文標題 セントラルコマンド機能を生成する脳幹神経回路	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 101 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32272/ans.58.1_101	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 -

1. 著者名 木場智史	4. 巻 70
2. 論文標題 痛みの働き	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 体育の科学	6. 最初と最後の頁 704~708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe
2. 発表標題 Sympathomotor activation by midbrain locomotor neurons is mediated through glutamate release in the rostral ventrolateral medulla
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 (covid-19により開催中止、抄録集に抄録掲載) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈良井絵美, 渡邊達生, 木場智史
2. 発表標題 ラット視床下部背側領域による歩行・循環反応の生成
3. 学会等名 第72 回日本生理学会中国四国地方会, ウェブ開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Emi Narai, Tatsuo Watanabe, Satoshi Koba
2. 発表標題 Sympathoexcitation and locomotion by dorsal hypothalamic neurons
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会の合同大会, ウェブ開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 心不全の交感神経制御の脳内回路と運動
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 運動とストレス
3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Emi Narai, Tatsuo Watanabe, Satoshi Koba
2. 発表標題 Fos expression in lateral hypothalamic neurons projecting to the mesencephalic locomotor region of rats following voluntary wheel running
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	吉村 祐貴 (YOSHIMURA Yuki) (50771242)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	
研究分担者	中村 和臣 (NAKAMURA Kazuomi) (90598137)	鳥取大学・医学部附属病院・特命助教 (15101)	

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