

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02485

研究課題名(和文) 神経幹細胞の光操作を用いた生後脳ニューロン新生の機能的意義の全脳レベルでの解析

研究課題名(英文) Analysis of functional significance of postnatal neurogenesis with whole brain imagings

研究代表者

今吉 格 (Imayoshi, Itaru)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60543296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の脳神経系を構成するニューロンのほとんどは胎児発生期においてのみ産生されると考えられてきたが、近年の研究により、生後脳・成体脳にも神経幹細胞が存在し、特定の脳領域ではニューロンの新生が続いていることが明らかになってきた。ニューロン新生の機能的・生理的意義についても研究が進んでいるが、全脳レベルでの神経回路の発達・成熟・恒常性維持における生理的意義については未だ明らかになっていなかった。本研究課題の成果により、特に、記憶の忘却や修正過程において、どのように新生ニューロンが関与しているのかについて、そのメカニズムが明らかになった。また、遺伝子発現の光操作手法のアップデートに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題で得られた研究成果により、生後脳・成体脳におけるニューロン新生が、哺乳類の脳神経回路の発達・成熟・恒常性維持においてどのような役割を担っているのかについて、その一端が全脳レベルで明らかになったとともに、ニューロン新生という現象の進化的意義や、将来の脳神経系の再生医療実現につながる新規知見が得られた。また、神経幹細胞の光操作のために開発した各種光作動性転写因子は、幹細胞の人工的操作に限らず、さまざまな生命科学や基礎医学研究に応用可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although most of the neurons consisting mammalian nervous system were thought to be produced only during embryonic development, recent studies have revealed that neural stem cells are present in the postnatal and adult brain, and that neurogenesis continues in the certain brain regions. The functional and physiological significance of postnatal neurogenesis has also been studied, but its physiological significance in the development, maturation, and homeostasis of neural circuits at the whole brain level has not yet been clarified. The results of this research project have revealed, in particular, the mechanism of how newborn neurons are involved in the process of memory forgetting and modification. In addition, we have successfully updated the method of optical manipulation of gene expression.

研究分野：神経科学

キーワード：ニューロン新生 海馬 神経幹細胞 光操作

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳神経系を構成するニューロンのほとんどは胎児発生期においてのみ産生されると考えられてきたが、近年の研究により、生後脳・成体脳にも神経幹細胞が存在し、海馬や嗅球といった特定の脳領域ではニューロンの新生が続いていることが明らかになってきた。ニューロン新生の機能的・生理的意義についても研究が進んでいるが、全脳レベルでの神経回路の発達・成熟・恒常性維持における生理的意義については未だ明らかになっていない。

本申請課題では、神経幹細胞の光操作と遺伝学的除去により、ニューロン新生を活性化、もしくは、選択的阻害し、ニューロンの新生の機能的意義を全脳レベルで明らかにする。具体的には、行動課題遂行中の実験マウスの記憶痕跡細胞を、任意の二時点で多色蛍光標識できる遺伝子改変マウスを用いて、ニューロン新生が神経回路の発達・成熟・恒常性維持に担う役割を全脳レベルで解析する。恐怖音条件付けにおける **Reinstatement**(再燃)と呼ばれる実験パラダイムを用いて、記憶の獲得・消去学習・再燃を惹起させ、蛍光標識された記憶痕跡細胞の脳内動態を全脳レベルで解析する。記憶痕跡細胞集団の全脳イメージング解析には、**block-face serial microscopy tomography: FAST type-D** を適用する。

神経幹細胞の光操作には、申請者がこれまで樹立してきた、遺伝子発現の光操作手法を用いる。また、ニューロン新生の阻害には、細胞分裂を行いニューロンを産生している神経幹細胞に細胞死を誘導できる **GFAP-TK** マウスを用いる。本申請課題で得られる研究成果により、生後脳・成体脳におけるニューロン新生が、哺乳類の脳神経回路の発達・成熟・恒常性維持においてどのような役割を担っているのかについて全脳レベルで明らかになるとともに、ニューロン新生という現象の進化的意義や、将来の脳神経系の再生医療実現につながる新規知見が得られると期待された。

## 2. 研究の目的

ヒトを含めた哺乳類の脳でも、新しいニューロンが生後・成体においても新生しており、様々な脳機能の発達・成熟・維持に関与していることが明らかになってきている。議論はあるが、ヒトの脳でもニューロン新生が確認され、その破綻が精神疾患や神経変性疾患に与える影響についても注目を集めている。哺乳類の生後・成体脳で新生したニューロンは、嗅球や海馬の神経回路ネットワークに取り込まれるが、大脳新皮質・基底核への細胞移動・定着についても報告されている。しかし、動物種によって、ニューロン新生の規模や脳部位は大きく異なっており、動物種の脳機能の進化との関係についても議論されている。また、このような健常脳でのニューロン新生の機能的意義の解明は、将来の脳神経系の再生医学実現のために、重要な知見を与えることが期待される。しかしながら、ニューロン新生の発見以来、我々の研究グループも含めて、多くの脳機能との関連が報告されているが、ニューロン新生が全脳レベルでの神経ネットワークの機能発現にどのように関与しているのかについては、全く明らかになっていない。

本研究課題では、神経幹細胞の光操作手法の改良を行い、生後脳・成体脳における神経幹細胞の操作を通じて、ニューロン新生に介入できるような新規手法の開発を行う。また、開発する神経幹細胞の操作技術も含めて、ニューロン新生への介入操作を行った際に、どのような神経回路への影響が生じるのかについての検証を通じて、ニューロン新生が全脳レベルでの神経ネットワークの機能発現にどのように関与しているのかについて新規知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 光作動性転写因子の開発について：

本研究課題では、ニューロン新生を活性化する手法として、申請者がこれまで開発してきた遺伝子発現の光操作技術を用いた。低分子化合物 Dox に加えて、青色光の照射により遺伝子発現誘導活性を高精度で制御できる PA-Tet 1.0、及び、その改良版である PA-Tet 2.0 を用いた。PA-Tet および、TRE-Ascl1 コンストラクトを成体脳神経幹細胞に高効率で導入する方法として、ウイルスベクターを用いる。また、より大きな遺伝子発現誘導能をもち、かつ、暗所でのリーク活性の低いような新規の光応答性転写因子の開発ができれば、より信頼性の高い神経幹細胞の光操作が可能になるため、光応答性転写因子の分子開発についても並行して行った。

#### 生後脳ニューロン新生が関与する脳機能の探索について：

ニューロン新生の阻害には、細胞分裂を行いニューロンを産生している神経幹細胞に細胞死を誘導できる GFAP-TK マウスを用いた。生後脳・成体脳神経幹細胞には GFAP が高発現しており、このトランスジェニックマウスでは、神経幹細胞において HSV-TK (チロシンキナーゼ) を発現しており、ガンシクロビル (VGCC) を投与することで、活発に細胞分裂をおこなっている神経幹細胞に特異的な細胞死を誘導することが可能である。

また、合成ステロイドである 4-OHT によって活性誘導できる部位特異的組み換え酵素を、神経活動依存的に転写誘導がおこる IEG (最初期) 遺伝子のプロモーター下に発現するトランスジェニックマウスを樹立した。IEG プロモーター中の神経活動に反応する DNA 配列のコピー数を増幅させる工夫や、部位特異的組み換え酵素の活性や、プロモーター活性のモニタリングに用いる蛍光タンパク質の半減期を短縮するなど、最適化を行なった。このトランスジェニックマウスでは、脳サンプリング時に神経活動が活発なニューロン群を黄色蛍光タンパク質で可視化できるとともに、4-OHT 投与により、RFP など別種の赤色蛍光タンパク質の発現を誘導できることができ、任意の二時点における活性化したニューロン群を黄色蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質を用いて効率よく多色標識できることが可能になった。これらのニューロン新生阻害マウスと、記憶痕跡細胞の脳内分布を解析できるトランスジェニックマウスを交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作成した。

上述したモデルマウスについて、各種行動解析を実施した。本研究課題では、恐怖音条件付け (Tone-cued fear conditioning) における Reinstatement (再燃)・Renewal と呼ばれる実験パラダイムを使用した。これらの行動課題を遂行したモデルマウスについて、全脳イメージングシステムを用いて、記憶痕跡細胞の脳内分布や共局在について解析を行った。

#### 全脳イメージング技術を用いた生後脳ニューロン新生が神経回路可塑性に与える影響について：

脳機能の発現に関与する神経回路ネットワークの、全脳イメージングデータの解析手法の整備を行った。全自動かつ高速化した順次断層撮影法による全脳イメージングデータを、標準脳座標にマッピングし、三次元描画を行うとともに、定量解析や相関解析を行うための解析パイプラインの構築を行った。特に、記憶形成や想起・忘却に関与すると考えられるニューロンを蛍光標識したモデル動物脳について、全脳イメージングを行なったデータの解析を行った。そのために、オープンソース画像解析ソフトである ImageJ/FIJI 上で動作するプラグインである BIRDS (Wang et al., eLife 2021) を利用し、順次断層撮影法による全脳イメージングデータを Allen institute によって作製された標準脳アトラス (CCF ver. 3) に registration する手法の最適化を行った。取得された蛍光顕微鏡データの画質や前処理が、registration 精度に与える影響を解析し、高精度の registration が安定して稼働するための条件検討を行った。また、標準脳アトラスに registration したデータを、3次元画像データ解析ソフトである Imaris へと変換するプラグインの最適化を行い、Imaris 上でのレンダリングを安定的に実施する条件検討を行う。加えて、蛍光標識された細胞の、数や空間分布パターン、他の蛍光シグナルとの共局在について、定量解析を可能にするための、解析パイプラインの構築を行った。

#### 4. 研究成果

##### 改良型の光作動性転写因子の開発について：

先行研究において、光応答性転写因子を組み込んだ遺伝子発現の光操作システムを用いることで、Ascl1 などの bHLH 型転写因子の発現動態を人工的に制御することで、神経幹細胞の細胞分裂やニューロン分化を操作することが可能であることが示されていた。しかし、モデル動物の脳内での制御には、より信頼性の高い遺伝子発現の光操作システムの開発が引き続き求められていた。本課題では、Gal4/UAS システムと Tet 遺伝子発現操作システムについて、そのような開発を実施し、機能改良型 PA-Gal4 転写因子 (eGAV) を開発し、論文発表を行った (Nagasaki et al., 2023)。eGAV は、既存のツールに比べて、より大きな遺伝子発現誘導能をもち、かつ、暗所でのリーク活性はより低く保たれている。また、小型の光受容ドメイン Vivid (VVD) を用いているため、分子サイズの小型化に成功しており、レンチウイルスベクター・アデノウイルスベクター・アデノ随伴ウイルスベクターなど、各種ウイルスベクターへの搭載が可能になるとともに、モデル動物脳内の神経幹細胞への効率のよい導入が可能になった。

機能改良型 PA-Gal4 転写因子 (eGAV) の樹立を通じて得た先行知見に基づいて、Tet 遺伝子発現操作システムについても、機能改良型 PA-Tet 転写因子の開発に取り組んだ。現在のところ、複数の有望なコンストラクトが得られており、それらの機能評価を継続している。eGAV と同じく、既存のツールに比べて、より大きな遺伝子発現誘導能をもち、かつ、暗所でのリーク活性はより低く保たれている PA-Tet 転写因子の開発を目標としている。加えて、点変異導入を行い、低分子化合物である Dox によって、逆に転写活性が付与される機能改良型 PA-Tet-ON システムの構築にも成功した。現在、これらの機能改良型 PA-Tet-OFF/ON システムの性状評価を継続するとともに、論文公表のためのデータ取得を行っている。

##### 生後脳ニューロン新生が関与する脳機能について：

生後脳に存在する神経幹細胞の大部分は休眠状態にあると考えられている。したがって、一部の活発に細胞分裂を行っている神経幹細胞を除去できれば、ニューロン新生を選択的に阻害することが可能になる。このような前提のもと、ニューロン新生の阻害には、細胞分裂を行いニューロンを産生している神経幹細胞に細胞死を誘導できる GFAP-TK マウスを用いた。先行知見の通り、生後脳・成体脳神経幹細胞には GFAP が高発現しており、このトランスジェニックマウスでは、神経幹細胞において HSV-TK (チロシンキナーゼ) を発現しており、ガンシクロビル (VGCC) を投与することで、活発に細胞分裂をおこなっている神経幹細胞に特異的な細胞死を誘導することが可能であった。また、数ヶ月にわたる長期の実験においても、大部分のガンシクロビル投与マウスの健康状態は良好に保たれていた。したがって、恐怖音条件付け (Tone-cued fear conditioning) における Reinstatement (再燃)・Renewal と呼ばれる実験パラダイムでは、ガンシクロビルの投与時期や期間を変動したマウス群を作出することができ、新生ニューロンがこれらの記憶学習課題に積極的に貢献していると考えられるタイムウインドウを絞り込むことが可能になった。現在、論文公表に可能なサンプルサイズを確保するとともに、別課題で共同研究者が開発していた数理モデリングから得られた知見も取り入れて、ニューロン新生が本記憶学習課題にどのように関与しているのかについて、さまざまな角度から検証を継続している。

##### 全脳イメージング技術を用いた生後脳ニューロン新生が神経回路可塑性に与える影響について：

行動解析の表現型、それに基づいた数理モデリングを通じて、ニューロン新生が、どのように神経回路の機能発現に貢献しているのかについて検証をおこなった。記憶の獲得に続いて、それらの忘却や修正には、どのような神経基盤が関与しているのか、そして、そのようなプロセスに、ニューロン新生がどのように関与しているのかについて、検証を行った。具体的には、ある記憶の想起に関与していると考えられる神経細胞集団の活性状態を、忘却や修正の過程において、どのように変遷させていくかについて海馬ニューロン新生が関与していることを示唆する実験データを取得することが出来つつある。また、これらのニューロン新生を光操作の手法を用いて人工的に賦活化することで、このような神経細胞集団の状態変化が、どのように影響を受けるのかについて検証を継続しており、これらの実験データが揃い次第、論文公表を行うことを

予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Tachiki Yuto, Suzuki Yusuke, Kurahashi Mutsumi, Oki Keisuke, Mavuk Ozgan, Nakagawa Takuma, Ishihara Shogo, Gyoten Yuichiro, Yamamoto Akira, Imayoshi Itaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Scale Space Calibrates Present and Subsequent Spatial Learning in Barnes Maze in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0505-22.2023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/eneuro.0505-22.2023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagasaki, S.C., Fukuda, T.D., Yamada, M., Suzuki, Y.I., Kakutani, R., Guy, A.T. and *Imayoshi, I.	4. 巻 48
2. 論文標題 Enhancement of Vivid-based Photo-Activatable Gal4 Transcription Factor in Mammalian Cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Struct Funct.	6. 最初と最後の頁 31-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.22074.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 今吉格
2. 発表標題 Analysis of neural stem cell regulatory mechanisms using optogenetics
3. 学会等名 Cellular mechanisms of learning and memoryシンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今吉格
2. 発表標題 Analysis of neural stem cell regulatory mechanisms using optogenetics
3. 学会等名 International Symposium on Neural Development and Diseases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長崎真治、今吉格
2. 発表標題 Enhancement of Vivid-based Photo-Activatable Gal4 Transcription Factor in Mammalian Cells.
3. 学会等名 第16回神経発生討論会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 高速超解像から大規模3Dまで、バイオイメージングを遍くカバーする最新顕微鏡技術群
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 Analysis of neural stem cell regulatory mechanisms using optogenetics
3. 学会等名 第1回 CJK 国際会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 Roles of postnatal and adult neurogenesis in brain development and maturation
3. 学会等名 The 80th Fujihara Seminar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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