

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830017

研究課題名(和文) 樹状突起の脳内での発達機構解明 光遺伝学とイメージングによる新しいアプローチ

研究課題名(英文) In vivo mechanisms of dendritic development

研究代表者

竹尾 ゆかり (Takeo, Yukari)

慶應義塾大学・医学部・研究員

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

研究成果の概要(和文)：神経細胞の多様な樹状突起形態は、神経回路の形成と機能発揮に重要であると考えられる。本研究ではマウスの小脳プルキンエ細胞が、特徴的な樹状突起形態を完成させる分子機構の解明を目指した。まず、生後の脳の発達の初期過程において転写因子ROR が樹状突起形成と維持に幅広く必須の役割を果たすことを解明した。さらに、生きたまま脳内の樹状突起形態をin vivo2光子イメージング法で観察し、樹状突起が1本に剪定される際に、活発な退縮・伸長を繰り返すことを見出し、さらにこの過程が神経活動およびカルシウムシグナリングを介して制御されることを明らかにした。脳神経回路形成機構の理解に貢献する成果と考えている。

研究成果の概要(英文)： Neurons develop cell-type specific dendritic morphology which is thought to be important for normal circuit development and functions. This study aimed to reveal the in vivo mechanisms for dendritic development. I focused on the cerebellar Purkinje cells, which has unique and elaborate dendritic morphology. First, I revealed that ROR, a transcriptional factor, is crucial for both development and maintenance of dendrite morphology (J Neurosci, 2015). Next, using in vivo two-photon imaging method, I revealed that multiple dendrites actively change their morphology before pruning. Furthermore, this process requires neural activities and intracellular calcium signaling. These results contribute to understanding of the mechanisms how neural circuit develops in vivo.

研究分野：神経科学

キーワード：樹状突起 イメージング 神経活動

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

神経細胞は、種類に応じて多様かつ固有の樹状突起形態を持つ。その形態は回路形成や神経系の機能と密接に関係すると考えられる。実際に発達障害や精神疾患において、樹状突起形態に異常がみられることが報告されている。しかし、ほ乳類中枢神経細胞における多様な樹状突起形態の発達機構は、あまりよく分かっていない。この原因として、従来の固定標本を用いた観察や、培養系における分子機構解析では、*in vivo* における時間的・空間的な制御機構をとらえることが難しかったことがあげられる。一方、近年新たな手法として、*in vivo* ライブイメージングが発達してきたため、*in vivo* で分子機構を操作しながら経時的に観察することが可能となってきた。そこで本研究では、*in vivo* 2光子イメージング法を用いて、発達期に樹状突起形態が形成される分子機構を明らかにしようと考えた。樹状突起形成機構解明のモデルとして、本研究では、小脳プルキンエ細胞に着目した。

固定標本の観察により、小脳プルキンエ細胞の樹状突起発達過程は、生後に形態を大きく変化させながら進行することが知られている (図 1 A、Sotelo and Dusart, *Neuroscience*, '09)。生後 0 日のプルキンエ細胞は、長い突起を数本伸ばした紡錘形を取るが、これらの突起は生後 4 日目までに退縮する。小脳失調を示す *staggerer* 突然変異マウスにおいてはこの過程に異常がみられることから、*staggerer* の責任遺伝子である ROR 遺伝子が、この過程を制御されることが示唆されていた。その後、生後 8 日目前後において、1本の太い 1 次樹状突起と、多数の枝分かれを単一平面上に扇状に伸展させた特徴的な樹状突起が形成される。この生後 8 日目前後に起きるダイナミックな形態変化は、細胞ごとに、短い期間に完成するため、固定標本からはその変化過程は推測することが難しい。そこで本研究では、この、1本の樹状突起と平面状の枝分かれが形成される過程を、*in vivo* イメージングにより経時的に観察して明らかにしようと考えた。プルキンエ細胞は、生後に、脳の表層部近くで樹状突起を発達させるため、2光子イメージング法を応用するのに適している。また、小脳皮質神経回路は、神経回路が比較的単純であるため、神経入力やグリア細胞の役割を検討しやすい。

2. 研究の目的

本研究では、小脳プルキンエ細胞をモデルとして、発達期にダイナミックな形態変化を経て樹状突起が形成される分子機構を *in vivo* で明らかにすることを目的とする。特に、*in vivo* における細胞外環境の役割として、神経活動やグリア細胞が樹状突起形成に及ぼす影響を明らかにする。

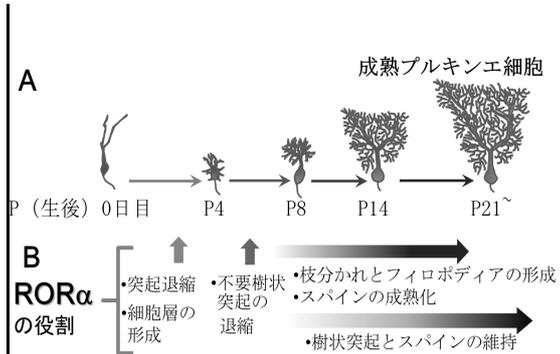


図1 A. マウスプルキンエ細胞の樹状突起成熟過程
B. 本研究で解明したROR α の役割 (発表論文②より改変)

3. 研究の方法

樹状突起形態を観察し分子機構を明らかにするには、少数の神経細胞にまばらにかつ強力に遺伝子発現を可能とする遺伝子導入法が求められる。申請者はこれまでに子宮内電気穿孔 (*in utero* electroporation, IUE) 法を用いたマウス小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入法を確立した。本手法を用いることで、生後早期から、プルキンエ細胞特異的に、同時に複数の遺伝子を発現させることができる。IUE 法によって蛍光タンパク質やタンパク質性カルシウム指示薬をプルキンエ細胞に発現させ、あるいは各種機能分子の過剰発現もしくはノックダウン法によって特定の細胞内機構を操作したうえで、*in vivo* 2光子イメージングを行うことで、樹状突起形成過程における分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

まず、古くからプルキンエ細胞樹状突起形成に重要な遺伝子として示唆されてきた ROR 遺伝子の役割について検討した。IUE 法と薬剤依存的 Cre/loxP システムを組み合わせ特定の発達時期における遺伝子ノックダウンを行うことで、ROR 遺伝子が、生後から成熟後に至るまでそれぞれの時期に応じて樹状突起および樹状突起スパインの形成と維持に必須の役割を果たすことが明らかになった (*J Neurosci* 2015)。特に、生後早期においては、ROR は生後 4 日目までの突起退縮および細胞体の配列に必要なこと、さらに、生後 4 日目以降に起こる樹状突起 1 本化・平面化過程および枝分かれの形成にも必須であることが明らかになった。ROR は転写因子であり、プルキンエ細胞において内因的に遺伝子発現調節を介して樹状突起形成を支えていると考えられる (図 1B)。

次に、樹状突起形成過程において、*in vivo* での神経活動の役割を明らかにするため、IUE 法を用いてプルキンエ細胞に内向き整流性カリウムチャネル Kir2.1 を過剰発現させることで、プルキンエ細胞の神経発火を抑制した。すると、樹状突起が 1 本化・平面化する過程が阻害された。ROR の発現や、細胞体の配列には異常が見られないことから、生後直後の突起退縮と細胞体配列以降の

過程に神経活動が必要であることが示唆された。実際、薬剤誘導性 Cre/loxP システムを用いて生後 6 日目以降に Kir2.1 を過剰発現しても同様の異常が見られたことから、生後 6 日目以降の神経活動が、樹状突起 1 本化・平面化に必須であることがわかった。

樹状突起 1 本化・平面化の過程に神経活動がどのように影響するか明らかにするため、まず、正常なプルキンエ細胞樹状突起の形成過程を *in vivo* 2 光子イメージング法により経時的に観察した。すると、生後 8 日目から 10 日目前後までの間に、プルキンエ細胞の突起は活発に伸長・退縮を繰り返すことが分かった。その後、1 本のみが大きく伸長するとともにその他の突起が退縮することで樹状突起が 1 本化することが観察された。また、平面を形成しない枝分かれは樹状突起が 1 本化した後も大胆に退縮することも見出された。一方、Kir を過剰発現し神経活動を抑制したプルキンエ細胞では、突起の伸長・退縮があまり観察されず、突起形態が変化しないまま複数の突起が残ることが分かった。神経活動による活発な突起の動態が、樹状突起 1 本化・平面化に必要であることが示唆された。

さらに、樹状突起形態を制御する分子機構を解明するため、プルキンエ細胞において各種候補分子を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトし、樹状突起形態への影響を検討した。その結果、CaMKII のノックアウトによって、樹状突起 1 本化・平面化が阻害されることを見出した。すなわち、神経活動によるカルシウム濃度上昇が CaMKII の活性化を引き起こすことで、樹状突起が 1 本化・平面化するという仮説が導かれた。

続いて、プルキンエ細胞へのシナプス入力、樹状突起形態を制御する神経活動の源であるかどうかを検討した。プルキンエ細胞へのシナプス形成に必須である各種遺伝子のノックアウトマウスを用いて、プルキンエ細胞樹状突起の形態を解析したところ、平行線維プルキンエ細胞シナプスの数が激減する Cbln1 欠損マウスにおいて、樹状突起 1 本化・平面化が損なわれていることが明らかになった。すなわち、平行線維シナプスの形成あるいは入力、樹状突起形成を制御することが示唆された。今後、光遺伝学法もしくは DREADD 法を用いて、平行線維シナプスの神経活動を直接制御しその影響を検討することで、シナプス入力の役割を解明していく。

以上の成果から、*in vivo* での樹状突起形成過程の詳細を明らかにするとともに、分子メカニズムを紐解くことができた。

5. 主な発表論文等

{ 雑誌論文 } (計 4 件)

Hayashi Y (林は旧姓), Nishimune H, Hozumi K, Saga Y, Harada A, Yuzaki M, Iwatsubo T, Kopan R, Tomita T. A novel non-canonical Notch signaling regulates expression of synaptic vesicle proteins in excitatory neurons. *Scientific Reports*, 査読有、6:23969、2016

DOI: 10.1038/srep23969.

竹尾 ゆかり、柚崎 通介

Purkinje 細胞の樹状突起形成機構 新しい方法で古い転写因子 ROR の役割解明に挑む *医学のあゆみ*、査読無、255(1):940-946、2015.

Takeo YH, Kakegawa W, Miura E, Yuzaki M. ROR regulates multiple aspects of dendrite development in cerebellar Purkinje cells *in vivo*.

Journal of Neuroscience、査読有、35(36):12518-34、2015.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0075-15.2015.

Kakegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu SI, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M

Anterograde C1q11 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron*、査読有、85:316-329、2015.

DOI: 10.1016/j.neuron.2014.12.020.

{ 学会発表 } (計 4 件)

竹尾 ゆかり、

Multiple roles of ROR in dendritic development of cerebellar Purkinje cells *in vivo*

第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Junnosuke Endo, Yukari Takeo, Optogenetic control of the function of the Golgi apparatus in neurons、2014 Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research、2014 年 11 月 17-21 日、ホノルル (米国)

Junnosuke Endo, Yukari Takeo, Optogenetic control of the function of the Golgi apparatus in neurons、第 8 回神経糖鎖生物学領域班会議 “ Glycans in

Neuroscience” (Satellite Symposium II)、
2014年11月16日、ホノルル(米国)

竹尾ゆかり、Stage-specific roles for ROR
in morphogenesis and maintenance、第
48回慶應ニューロサイエンス学会、2014年8
月9日、慶應大学(東京都新宿区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 件)

〔その他〕
なし

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・特別研究員
研究者番号：90624320

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし