

論文の内容の要旨

論文題目 **Genetic and optogenetic investigation of functional modularity in the rat brain**
(遺伝学的、光遺伝学的手法を用いた、ラットにおける脳機能局在性の研究)

坪田匡史

Broca によるヒト言語野の発見以来、大脳皮質には様々な機能局在が存在することが示されてきた。このような皮質領域ごとの機能の特性は、主に解剖学的な入出力関係の差から生じる可能性が考えられる。一方で、大脳皮質には遺伝子発現にも領域ごとの特性があることが知られている。このことは、同一の遺伝子でも、大脳皮質の領域ごとにその発現の量やタイミング、さらにはその機能にも違いが生じることを示唆するが、それが大脳皮質の機能局在にどの程度関わっているのかについては、現在までにほとんど知見がない。これは、従来の手法では局所的な遺伝子操作、たとえば大脳皮質機能カラムに局限した操作など、を行なうことが難しかったためであると考えられる。本研究では、ラットを用いて、大脳皮質局所の遺伝子操作により、特定の大脳皮質機能カラムおよび特定の大脳皮質層における遺伝子機能の解明を目指した (目的 1)。

一方、小脳皮質もまた、大脳皮質と同じくその領域ごとに機能局在を持つと考えられている。これは、小脳皮質への入力・出力の解剖学的な接続パターンに領域ごとの明確な違いが認められるためである。事実、前庭動眼反射の責任領域など、その局在が明らかにされてきた機能も存在する。しかし、小脳皮質の多くの領域の機能はまだ明らかになっていない。これは、従来の小脳皮質の機能マッピングに用いられてきた手法が細胞種特異性を欠いていたことが大きな原因の一つであると考えられる。本研究では、光遺伝学的手法を用いることにより、小脳皮質の出力神経細胞であるプルキンエ細胞の活動を特異的に操作する手法を開発し、小脳皮質の局所的な機能の解明を目指した (目的 2)。

ウイルスベクターの脳実質への直接摂取は、ウイルス粒子の拡散が脳実質により物理的に制限されるため、局所への遺伝子導入の手法として用いることが可能である。本研究では、レンチウイルスベクターを用いて、1) 目的 1 では 人工 miRNA の発現による目的遺伝子ノックダウンを、2) 目的 2 では channelrhodopsin-2 (ChR2) または halorhodopsin (NpHR) といった光活性化タンパク質の発現による細胞種特異的な光遺伝学的神経活動操作を、それぞれ行なった。

目的 1 において、局所遺伝子操作の有効性を示すための実験系として、私は体性感覚野バレル皮質における、バレル地図の経験依存的可塑性に着目した。げっ歯類のバレル皮質第 4 層には、対側のウィスカーのパターンに対応した感覚地図が存在する。この感覚地図は、大人の個体であっても、ウィスカーの感覚遮断に伴う経験依存的な可塑的变化を示すことが知られている。

バレル皮質の可塑的变化の際には、樹状突起スパインの大きさや構造安定性に変化が起こる。

このことは、細胞骨格たんぱく質の一つであり、スパインに高い密度で存在してその構造安定性に重要な役割を果たしているアクチンフィラメントが、可塑的变化に伴って再構成されることを示唆する。しかし、その直接の証明は存在しない。

そこで私は、アクチン脱重合因子の **cofilin1 (CFL1)** に着目し、**CFL1** 遺伝子のノックダウンが神経細胞の反応可塑性に与える影響を、**in vivo** の細胞外電気生理記録により調べた。**CFL1** をノックダウンするための **miRNA** を発現するレンチウイルスベクター溶液を、内在性信号光イメージングによって同定した **D2** バレルカラムの皮質 **2/3** 層へ局所接種した。その結果、目的領域に局限した **CFL1** 遺伝子発現の低下が認められた。

感覚遮断実験においては、遺伝子発現を 2 週間待った後、ウイルスを接種した脳半球とは対側の顔面において、一本のウィスカー (**D1** ウィスカー) のみを残してその他のウィスカーを全て切ることで、感覚遮断を行なった。遮断を 3 週間以上継続した後、1 週間ウィスカーを再生させ、**D2** カラムの **2/3** 層から電気生理記録を行なった。野生型のラットの **D2** 神経細胞では、感覚遮断によって、唯一残されていた **D1** ウィスカーに対する反応が上昇し、遮断されていた **D2** ウィスカーに対する反応が減少した。一方、**CFL1** がノックダウンされた神経細胞で同様のことを調べると、**D1** ウィスカーに対する反応上昇が認められない一方で、**D2** ウィスカーに対する反応の減少は保存されることが分かった。**CFL1** のノックダウンそのものはウィスカー刺激に対する神経細胞反応性に有意な変化をもたらさないことから、**CFL1** のノックダウンは感覚遮断に伴う可塑的变化に対して影響を与えたと考えられる。以上の結果は、感覚遮断に伴うバレル皮質 **2/3** 層の神経活動の可塑的变化には、アクチンフィラメントの再構成が必要であることを示唆する。

目的 2 における小脳皮質の機能マッピング方法について、従来は、皮質電気刺激や **lesion** といった手法がこの目的に用いられてきた。しかしこれらの操作は細胞種特異性を欠くため、小脳皮質の唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞以外にも、顆粒細胞や、小脳皮質への入力を担う苔状繊維や登上繊維に対しても影響を与え得る。よって、その影響を受けた領域を空間的に限定することが難しい。また、細胞種特異性を持たない操作は、プルキンエ細胞に対して抑制性の出力を送っている小脳皮質の介在神経細胞群に対しても影響を与えてしまう。この場合、例えば小脳皮質を刺激した場合でも、出力細胞であるプルキンエ細胞の活動が全体として上昇するのか、あるいは減少するのか不明瞭になってしまう。

上記の問題は、プルキンエ細胞の活動のみを特異的に操作することにより解決されることが考えられる。この目的を達成するため、本研究では、短縮型 **L7** プロモータを搭載したレンチウイルスベクターによって、**ChR2** あるいは **NpHR** をプルキンエ細胞特異的に発現させた。**NpHR** は橙色光で活性化する塩化物イオンポンプであり、光照射により発現神経細胞活動は減少する。まず、レンチウイルスベクターを接種したラット脳の免疫組織化学により、大部分のプルキンエ細胞 (**ChR2**, 92.6%; **NpHR**, 95.3%) で目的遺伝子発現が認められることを確認した。次に、**in vivo** でプルキンエ細胞活動のシングルユニット記録を行なったところ、**ChR2** 光刺激または **NpHR** 光刺激によって、記録したほぼ全てのプルキンエ細胞 (**ChR2**, 100%; **NpHR**, 93.8%) で興奮、

または抑制の効果が観察された。

次に、この手法を実際の小脳機能の解析へと応用するため、私は小脳皮質虫部第9小葉に存在する循環機能調節領域に着目した。この調節領域は、その電気刺激、またはグルタミン酸などの化学物質による刺激時に血圧や心拍数などの循環系の指標に変化を与えることが知られている。今回私は、光遺伝学を用いることで、従来の手法では調べるのが困難だった第9小葉プルキンエ細胞活動と動脈圧応答との因果関係を、ウレタン麻酔下のラットで調べた。まず、レンチウイルスベクターの局所接種により、ChR2 または NpHR を第9小葉に限局した形で発現させた。これにより、光照射の影響を受ける神経細胞は第9小葉プルキンエ細胞に限定される。こうして限局した神経活動操作を行なった結果、第9小葉プルキンエ細胞活動の上昇および減少は、動脈圧の下降および上昇を引き起こすことが明らかとなった。

この循環調節領域の生理学的な役割については、この領域が前庭核と密接に接続をしていることから、姿勢変化時の循環制御の一端を担うのではないかと考えられてきた。しかし、その直接の証明は現在までに存在しない。そこで私は、麻酔下のラットの姿勢変化時にプルキンエ細胞特異的な活動抑制を行ない、その際の動脈圧応答の解析を行なった。その結果、第9小葉プルキンエ細胞活動の特異的抑制は、血圧の姿勢変化直後の回復過程に対して、その回復を妨げる方向に働くことが示された。よってこの結果は、第9小葉が姿勢変化時の血圧維持を行なっている可能性を示唆する。

以上より、本研究では、1) 局所的な遺伝子操作、2) 神経活動の局所的な光遺伝学的操作、という2つの異なる手法を用いて、大脳皮質および小脳皮質の機能局在の研究を行なった。本研究で採用したアプローチは、両者の機能構築に新たな知見をもたらすと考えられる。一方で、大脳皮質の中でも2/3層よりもさらに薄い層(4層など)や、小脳皮質に存在する parasagittal zone など、レンチウイルスベクターのみを用いた特異的ラベルが困難なケースも存在する。より精度・自由度の高い遺伝子導入・発現システムの構築が今後の課題と考えられる。