

博士論文（要約）

ニワトリ胚発達期神経回路の分枝形成メカニズムに関する研究

平成28年度

東北大学大学院生命科学研究科

生命機能科学専攻

加藤 秀理

## 【要約】

発達期の中枢・抹消神経回路では神経細胞が軸索を伸長させて標的細胞と一過性に過剰なコネクションを形成する(図 1)。この時、軸索上では多数の分枝が形成され複数の標的細胞と一度にコネクションを構築する。しかし、この過剰なコネクションは発生の進行とともに最適な数まで減少し(図 2; Coleman, 2005)、結果として発達期後期に神経回路の成熟と機能的な回路の構築をもたらす。

発達期初期の神経細胞の軸索では、多数の分枝を形成する一方で、余分な分枝を除去して残りの分枝を伸張させることが確認された。(Luo et al, 2005)。例えば、脊椎動物の末梢神経系の neuromuscular junction (Sanes & Lichtmann, 1999) や哺乳類の中枢神経系である大脳新皮質で同時期に軸索分枝の伸長と退縮が報告された(Antonini & Stryker 1993; Portera-Cailliau et al. 2005)。このように、機能的な神経回路の構築には軸索分枝の伸長と退縮のバランスが重要であり、発生が進行するとこのバランスが徐々に退縮に傾き始めると考えられる。しかし、伸長と退縮のバランスを調整する分子メカニズムについては、多くの未知が残されている。

近年の研究から細胞死を引き起こす因子として知られている caspase super family が non-lethal な機能を有することが報告された。Executioner caspase に属する caspase 3 (casp-3)は retinal ganglion cell の軸索分岐点及び軸索先端部で局所的な活性を示した一方で、培養海馬スライスの神経細胞はミトコンドリア経由の caspase 活性化経路を活性酸素で誘導する mito-killerred を用いた局所的な casp-3 の活性化によって細胞死を誘導することなく樹状突起のスパインを減少させた (Campbell et al, 2013; Erturk et al, 2014)。このように casp-3 が細胞死を誘導せずに

局所的な働きにより軸索の形態を制御することから、発達期で見られる軸索の伸長と退縮に *csap-3* が作用すると考えた。

この仮説を検証するにあたり、本研究はニワトリ胚毛様体神経節(ciliary ganglion: CG)を研究モデルとして用いた。ニワトリ胚の CG は前述の哺乳類の大腦新皮質と同様に、伸長と退縮を経て神経回路が構築される(図 3;Dryer, 1994)。CG は眼球の裏にある副交感神経節で、瞳孔収縮や遠近調節の機能を担っている。CG 内で中脳の Edinger-Westphal 核(EW)の神経細胞から伸張してきた軸索が標的細胞の ciliary cell とシナプス結合をする。EW からの軸索は発達初期に神経節内に進入して多数の分枝を形成し、多くの神経節ニューロンとシナプスを一時的に形成する。しかし、大多数の分枝は発達の進行とともに刈り込まれていき、最終的に単一の神経節ニューロンとのシナプス結合だけが残る。CG 内で見られる一連の神経回路形成の流れは 40 年以上前に既に報告されているが(Landmesser et al, 1974)、その分子メカニズムは未解明である。

一方で、ニワトリ胚 CG は、発達期における神経回路形成のモデルとして優れており、多くの知見の積み重ねがあるとともに遺伝子レベルの胚操作の技術が確立している(Hou et al,2011; Egawa et al, 2013)。例えば、CG は E6-E12 の決まった期間に軸索再編成を示し、*in ovo electroporation* による遺伝子導入による分子遺伝学的な介入が可能である。また、軸索分枝が最終的に 1 ～ 2 本しか残らない劇的な形態変化を示すため、分子遺伝学的操作による軸索形態異常を明確に捉えることが可能である。

本研究においては、毛様体神経節ネットワークをモデルシステムとし、発達期神経回路形成のプロセスを *caspase system* が制御しているとする仮説を検証し

た。

仮説を検証することに先立って、研究モデルとなる EW 神経細胞の軸索中で caspase-3 が働くことを caspase-3 の活性化を検出するプローブ (CD8-PARP-Venus)を用いて解析した。

発達期初期(E6-E12)の native caspase-3 の酵素活性は酵素活性を失った mutant caspase (caspase-3 dominant-negative; C3DN)コーディングプラスミドを標的細胞で強制発現させることにより抑制した。また、抑制細胞を他の神経細胞と区別するために mutant caspase にはマーカーとして tdTomato を C 末端に付与した。高解像度の軸索画像を取得するために、神経節は透明化試薬 CUBIC 用いて透明化処理を施した上で、2光子顕微鏡によるイメージングを行なった。

軸索形態を定量的に評価するファクターとして、本研究は4つの計測値【① Max branch order ( $M$ )、②軸索中の分岐点の数 (Number of nodes,  $N$ )、③Node 間の平均軸索長 (mean inter-nodal length,  $K$ )、④平均最終分枝長(mean terminal length,  $L$ )】を定義して解析した。

native caspase-3 の活性化をプローブを用いて解析したところ、発達期初期に軸索中で局所的に（軸索分岐点、軸索末端部）働くことが明らかとなった。

caspase-3 の局所的な働きが明らかとなったので、nativecaspase-3 の活性を抑制するために発達期初期に酵素活性を失った mutant caspase (caspase-3 dominant-negative; C3DN)の強制発現を行い、軸索の形態を4つの計測値から解析した。その結果、native caspase-3 は軸索の分岐点の減少と分枝の伸長制御に関与していることが示唆された。

研究結果から、発達期初期の軸索分枝は短い分枝を多数形成して標的細胞を

探す pathfinding mode と標的細胞に対して優先的に分枝を伸長させ余計な分枝を除去する targeting mode のバランスを操作することによって神経回路を構築する可能性がある。今回の実験結果から内在性 casp-3 は分岐点の形成促進と分枝の伸長を抑制することで、神経細胞の軸索投射パターンを pathfinding mode にシフトさせることに作用すると考えられる。