

〈一般研究課題〉 疾患モデルマウスの長期的脳活動計測と  
行動解析による疾患発症メカニズムの解明  
助成研究者 豊橋技術科学大学 沼野 利佳



## 疾患モデルマウスの長期的脳活動計測と行動解析による 疾患発症メカニズムの解明

沼野 利佳  
(豊橋技術科学大学)

Elucidation of the disease developing mechanism by the long-term neuronal activity recording using Toyohashi probe and behavior analysis of the disease model mice

Rika Numano  
(Toyohashi University of Technology)

### Abstract :

More and more people suffer from neuronal diseases in aging society of Japan, since the elucidation of disease developing mechanism and the development of therapy have been more desired. The original Toyohashi probe of 5 $\mu$ m diameter tip, which is implanted into mice brain tissue for electro-physiological recording, is so thin and minimally invasive than other conventional electrodes, that it enables a long-term neuronal recording for several months even in fragile disease model mice.

In BDNF knockout (KO) as depression model mice, action potential in visual cortex had been measured by Toyohashi probe for several months to detect phenotype with high frequency of firing rate in response to optical stimulation. These system is useful to estimate the depression phenotype for drug screening and for analyzing the mechanism of abnormal signal transmission.

On the other hand, Toyohashi probes can perform DNA injections into live neuronal cells within brain tissues *ex vivo* and *in vivo* to genetically modify and restore cell function in the brain. This injection technique of biomolecules is powerful tool for enabling target cells to be marked by fluorescent protein expressional vectors and also genetically altering the function of living brain cells, including the injection of short hairpin RNA (shRNA) for the knockdown and gRNA and CAS9 vector DNA for genome editing.

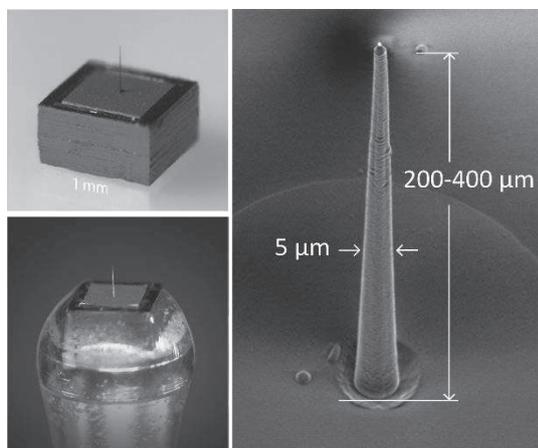
## 1. はじめに

鬱病やアルツハイマー症など発症までに時間を要する神経疾患の発症メカニズムの解明とその予防法の探索が希求されている。そのためには、疾患モデルマウスを用いて、数か月の安定的な脳の電気生理学的活動や行動解析を実施する実験系が必要である。ユタやミシガン電極など、これまで市販されている脳への刺入型電極の先端径は40~ $\mu\text{m}$ と組織への侵襲度が大きく、脆弱な疾患モデルマウスでは、長期脳計測は非常に困難であった。

豊橋技術科学大学敷地内にあるデバイス工場では、LSI・センサ・MEMSの設計から製作、評価まで一貫して行うことができる。共同研究をしている同大学の電気・電子情報工学系の河野剛士教授の研究チームが、学内の工場にて作製した直径が数 $\mu\text{m}$ の極小刺入型電極を豊橋プローブと命名した(図1)。豊橋プローブは、その細さゆえ低侵襲の電極プローブであり、このプローブを、マウス脳組織に埋め込み、神経細胞の活動電位を1年以上の長期、刺激に対する反応発火スパイクの記録に成功している。

先に述べた様に、電気生理実験において疾患モデルマウスなどの実験動物の長期的な慢性計測が必要不可欠であるが、遺伝子改変マウスは身体的に脆弱で、電極の刺入時に発生するダメージが大きな負荷となり、長期的な慢性計測を困難なものにしていた。本研究では、症状があらわれるまでに時間がかかり、症状の進行が変化する脆弱な鬱病モデルマウスの脳に、低侵襲の刺入型豊橋プローブを埋め込み、脳の神経活動を数か月間解析することを達成した。これにより、モデルマウスの行動解析の鬱症状と脳波のフェノタイプとの関連性を探求できる実験系が確立できた。

図1 刺入型神経電極豊橋プローブ



Vapor-Liquid-Solid (VLS)シリコン結晶成長を活かした独自の技術により作製された刺入型神経電極である。その直径はわずか $5\mu\text{m}$ であり、ニューロン以下のサイズである。

(豊橋技術科学大学豊橋プローブプロジェクトテクニカルレビューより)

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、神経細胞の生存維持、神経突起の伸長促進、神経伝達物質の合成促進などの機能を持ち、脳内のセロトニン作動性ニューロンの生存維持に作用している物質である。BDNFノックアウトマウスは鬱病モデルマウスであることが報告されているが、そのマウスの大脳皮質視覚野に豊橋プローブを埋め込み、光刺激に対する応答の脳活動を野生型と探索した。また、新規に確立したBDNF過剰発現マウスも鬱症状をしめし、この組換えマウスも同様に、光刺激に対する応答の脳活動を測定し、データを比較する。

この豊橋プローブは、簡単に脳などの組織の深部に刺入でき、非常に侵襲性は低く組織にやさしいアプローチが可能で、留置型のプローブでは、1年以上に渡り長期の脳計測が可能であり、その

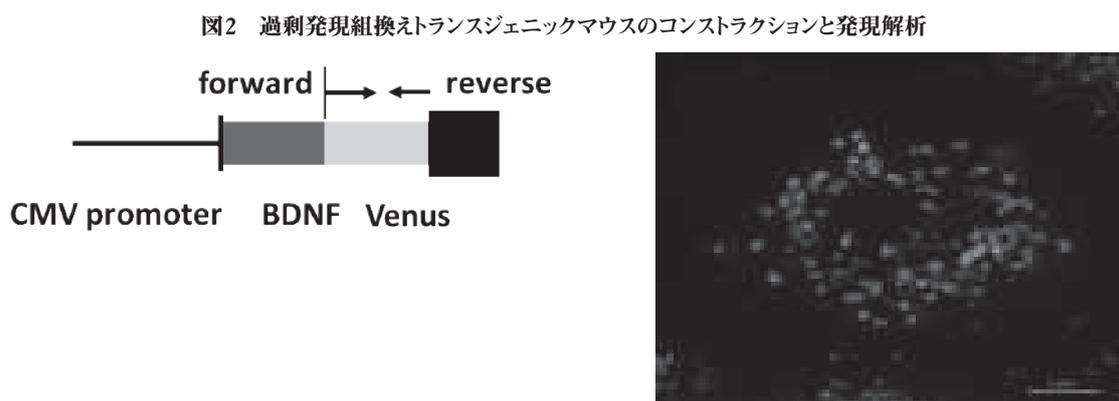
ため、疾患の特徴的な形質を症状の進行とともに観察することができる。この疾患モデルマウスの長期脳計測の実験系は、発症メカニズムの解明や、薬剤候補のスクリーニング、将来は、iPS細胞を用いた神経疾患の再生医療にも貢献できると考えられる。

## 2. 試料および実験方法

まず、鬱病の疾患モデルマウスであるBDNFノックアウトマウスの大脳皮質視覚野における光刺激反応スパイクを、市販のタングステン電極により1日の急性実験にて計測した。フィジオテック製の微小電極であるタングステン電極を、マウスの右脳にある一次視覚野(V1領域)に差し込み、マウスの目LED点灯による光刺激を行い、脳内で行われた神経活動を電気信号として記録する。同様に、野生型兄弟マウスも、光刺激反応を測定比較する(図3,4)。

BDNFノックアウトマウスはうつ病モデルマウスであることが示唆されているが、一方、BDNF過剰マウスも精神疾患に寄与する可能性が高いと報告されており、今回、Venus(YFPの変異体)の蛍光シグナルでその分泌を検出できるようなBDNFとVenusの融合タンパクを発現する強制発現マウスを作成した。

BDNFを強制発現させ、蛍光シグナルでその分泌を検出できる組換えトランスジェニックマウスを作成した(図2)。このBDNF発現マウスでは、外来性の遺伝子の発現は、脳や視床下部で自家蛍光より2.5倍ほど高い発現をしめした、また、組換えマウスが、オープンフィールドや強制水泳などの一連の行動実験で鬱症状をしめすことを確認した。現在、N数が少なく統計処理できていないが、ノックアウトと比べて、トランスジェニックマウスのフェノタイプは弱い。そこで、BDNF強制発現マウスにおいても、ノックアウトマウスと同様に、大脳皮質視覚野における光刺激反応スパイクを、市販のタングステン電極により急性実験にて計測した。



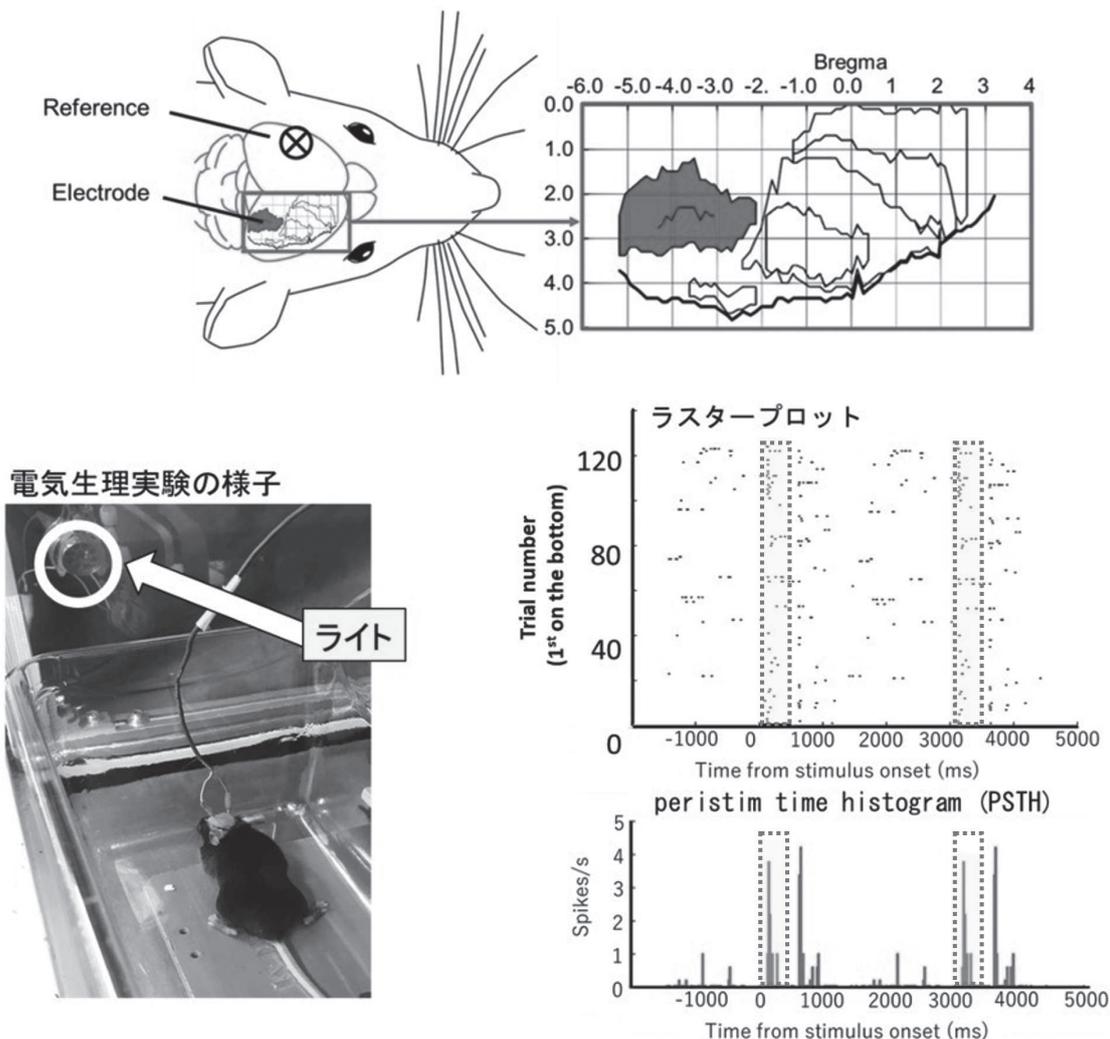
過剰発現組換えトランスジェニックの脳細胞にて、外来遺伝子由来に融合タンパクである蛍光蛋白Venusの発現を、超解像度顕微鏡(Nikon N-SIM)にて観察した。強い蛍光シグナルが、分泌顆粒内でみとめられ、BDNFが過剰発現している。

そこで、BDNF強制発現マウスにおいても、ノックアウトマウスと同様に、大脳皮質視覚野における光刺激反応スパイクを、市販のタングステン電極により急性実験にて確認した。

次に、フェノタイプとして強い鬱症状をしめすノックアウトマウスについて、豊橋プローブの埋め込みにより、光刺激反応の長期脳計測を実施した。

本実験では、野生型マウスと遺伝子改変マウスに豊橋プローブをそれぞれのマウスの右脳にある一次視覚野に埋め込み、タングステン電極と同様に、マウスに対して光刺激を行うと脳活動信号を計測することができた(図5)。

図3 一次視覚野に豊橋プローブの埋め込みにより、光刺激反応の長期脳計測



豊橋プローブを視覚野に埋め込んだマウスに光刺激を与え、光刺激後の応答発火スパイクを計測する。上のグラフはラスタプロットで、スパイクが発生した時間を点で表示したものであり、神経活動によるスパイク発生のタイミングなど全体的な傾向とばらつきがわかる。下のグラフはラスタプロットに表示されている点を時間ごとに合計して表示したperistim time histogram (PSTH)。PSTHは、単位時間(今回の実験では0.02秒)あたりに発生したスパイク数をトリアル数分すべて加算し平均したものを縦軸に表したグラフである。

また、先端を先鋭化した豊橋プローブで、細胞内にベクターDNAなど核酸分子をインジェクションし、測定細胞の同定のため、細胞のマーキングが可能であることを確かめた。

具体的には、マウス脳の培養スライスや、麻酔下の生きてマウス脳の細胞に、豊橋プローブで、蛍光タンパク質をコードするベクターDNAの遺伝子導入を行い、数日後に、個々のプローブがアプローチした標的細胞の蛍光シグナルを観察する。さらに、shRNA(ショートヘアピンRNA)分子を発現するベクターDNAや、ゲノム編集ができるgRNA(ガイドRNA)とCAS9蛋白をコードするベクターDNAを遺伝子導入し、細胞の機能変化も可能かをしらべた。このことは、豊橋プローブを用いて、ターゲット遺伝子の機能改変を計測と同時に行うことができ、疾患発症メカニズム解明に、役立つと考えられる。特にゲノム編集を用いると、機能改変効果は持続する。

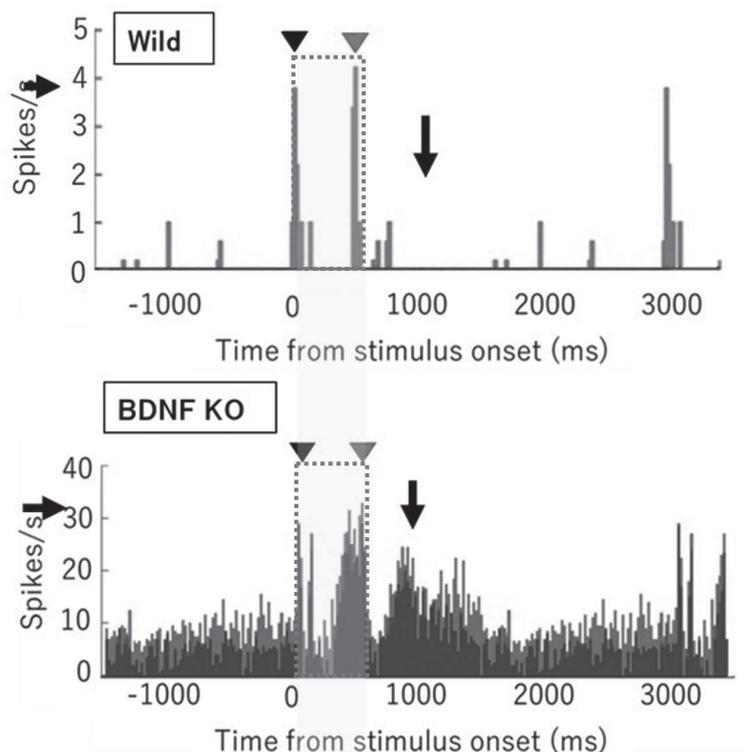
### 3. 実験結果

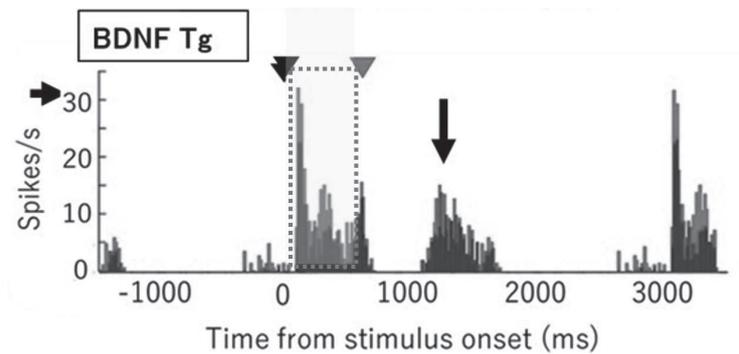
#### 3.1 タングステン電極による急性実験脳計測

市販のタングステン電極による大脳皮質視覚野における光刺激反応スパイク測定を急性実験にて実施した。

図4に各系統マウスから計測された脳活動信号を示す。グラフの横軸は計測時間であり、縦軸はスパイク数であり、ラスタプロットに表示されている点を時間ごとに合計して表示したヒストグラムで、0.02秒あたりに発生したスパイク数をトライアル数分すべて加算し平均したものを縦軸に表したグラフである。黒色の三角形は光刺激(ON)後に観測された最大のスパイク数の位置を、灰色の三角形は光刺激(OFF)後に観測された最大発火スパイク数の位置を示している。その結果、全体的に、BDNFのノックアウトマウスでは、スパイク頻度が、光刺激の無い基底状態を含めて、測定時間を通して、野生型マウスに比べて高い(図4の横軸全体に渡りスパイクが出現する)ことがしめされた。

図4 BDNF KOマウスと過剰発現マウスのタングステン電極を用いた光誘導性神経活動の解析





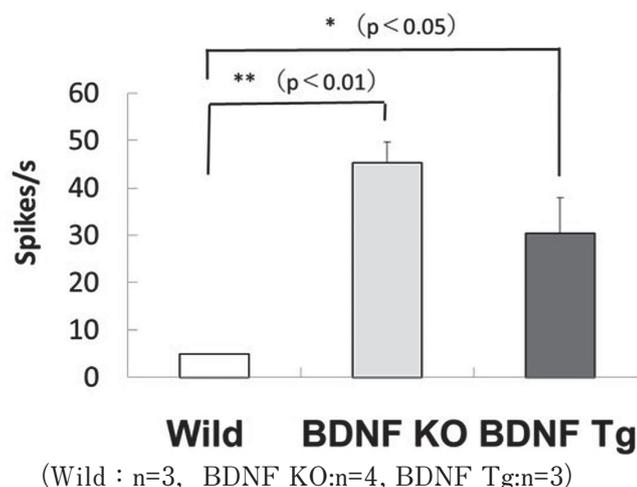
横軸が時間、縦軸はスパイク数を示す。刺激時間は0から500msとなっていて、点線で囲まれた領域で示す。黒の三角と灰の三角は光刺激がONになってからとOFFになってからの光刺激に誘導される神経活動の最大スパイク数の箇所を示す。

また、新規に作成したBDNFの過剰発現マウスは、オープンフィールドテストでは、野生型と比べて警戒行動が優位に増加し、強制水泳テストや垂尾テストにて無働時間の延長、モリス水迷路などでは、やる気や記憶量低下の傾向が見られた(プレリミナリーデータ)。これらの結果は、うつ病モデルマウスのBDNFノックアウトマウスのフェノタイプと比べ、程度は低いにしろ類似しており、鬱傾向を示すことが示唆された。

そこで、鬱傾向の行動をしめすBDNF過剰発現マウスも、同様に、市販のタングステン電極による大脳皮質視覚野における光刺激反応スパイク測定を行った。その結果、スパイク頻度が、光刺激の無い基底状態を含めて、測定時間を通して、野生型マウスに比べて高いという、ノックアウトと同様の結果がえられた(図4)。その結果、光照射ON刺激後0.1秒後の反応やと光照射OFFの後の反応スパイクは、ともに野生型同様に観察されるが、光照射ON刺激後1-2秒後の光照射していない暗期において、やはり高い頻度でスパイクが出現するという傾向がある。

図5に、ここでの最大発火スパイク数を各系統マウスでTurkey-Kramer検定により比較した結果を示す。これにより野生型マウスに比べ、BDNFに異常があると発火頻度高くなる傾向が見られた。

図5 刺激ON直後における平均最大発火数のTurkey-Kramer検定の比較結果



縦軸はスパイク数で、横軸が各系統マウスを示す。光ON刺激によって誘導されるスパイク数において、Wildタイプマウスと比較し、BDNFノックアウト(KO)と過剰発現(Tg)マウスで有意に発火頻度が高いことが示された。

ノックアウトマウスとBDNF過剰発現組換えマウスともに、基底状態と刺激後も発火頻度が高いというフェノタイプがみられた。BDNFの発現異常が、大脳皮質の神経活動の異常の原因となることが示唆された。このことにより、BDNFのちょうどよい発現量が、鬱傾向をしめす脳機能の発達には、必要であることがわかった。

### 3.2 豊橋プローブによる長期脳計測

次に、野生型マウスとうつ病モデルマウスであるノックアウトマウスの脳活動信号を豊橋プローブ埋込みにて、長期的に計測した。

手術の2週間後の脳活動信号は、PSTHで、横軸は計測時間、縦軸はスパイク数となっている。これらのグラフは、120回以上の光刺激によって行われた一度の計測から得られたデータを0秒の時点で視覚刺激が行われている。そのためこれらのグラフは視覚刺激直後から3秒後までを平均したもとなっている。それぞれのグラフに表示されている黒色の三角形は光刺激(ON)後に観測し、最大の発火スパイク応答率の位置を、灰色の三角形は光刺激(OFF)後に観測し、最大発火スパイク数の位置を示している(図6)。

まず、タングステン電極と同様に、豊橋プローブを用いても各系統マウスにおけるそれぞれの光刺激の応答が確認できた。

刺激ON直後における最大発火数の比較では野生型マウスとノックアウトマウスは有意差に差があることが示された。これにより野生型マウスに比べ、BDNFの発現量の欠乏は常時自然発火が高い傾向が見られた(図7)。

図6 野生型の豊橋プローブを用いた光誘導性神経活動の解析

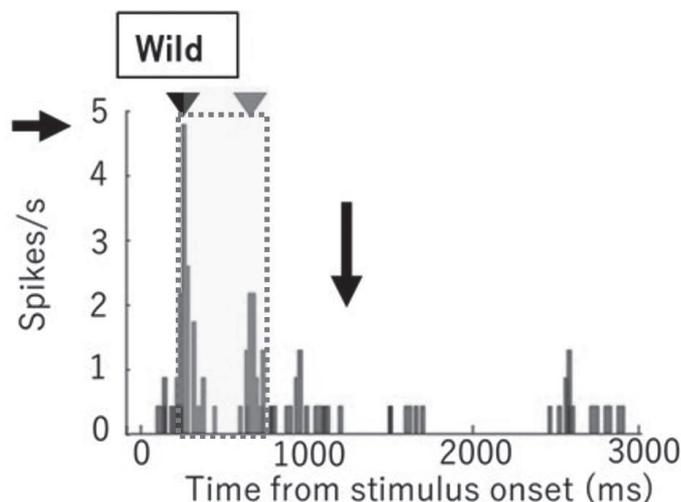
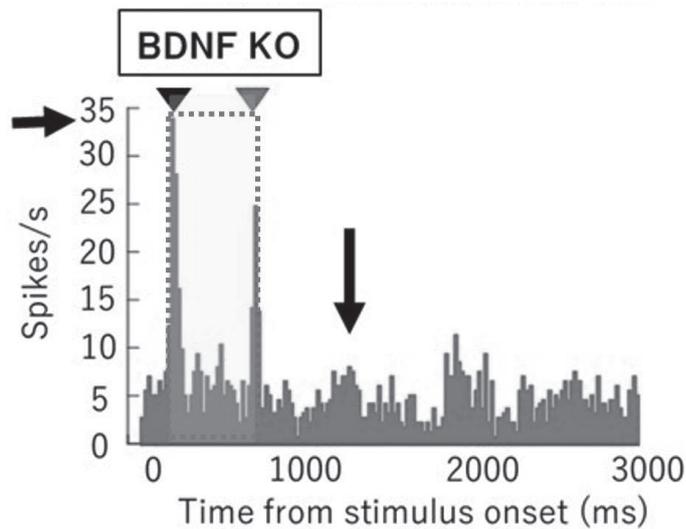


図7 ノックアウトマウスの豊橋プローブを用いた光誘導性神経活動の解析



疾患モデルマウスの豊橋プローブによる数カ月にわたる長期計測については、まだ、BDNF KO マウスは、半年の長期計測にはいたっていない。野生型では先行して実施し、成功している。

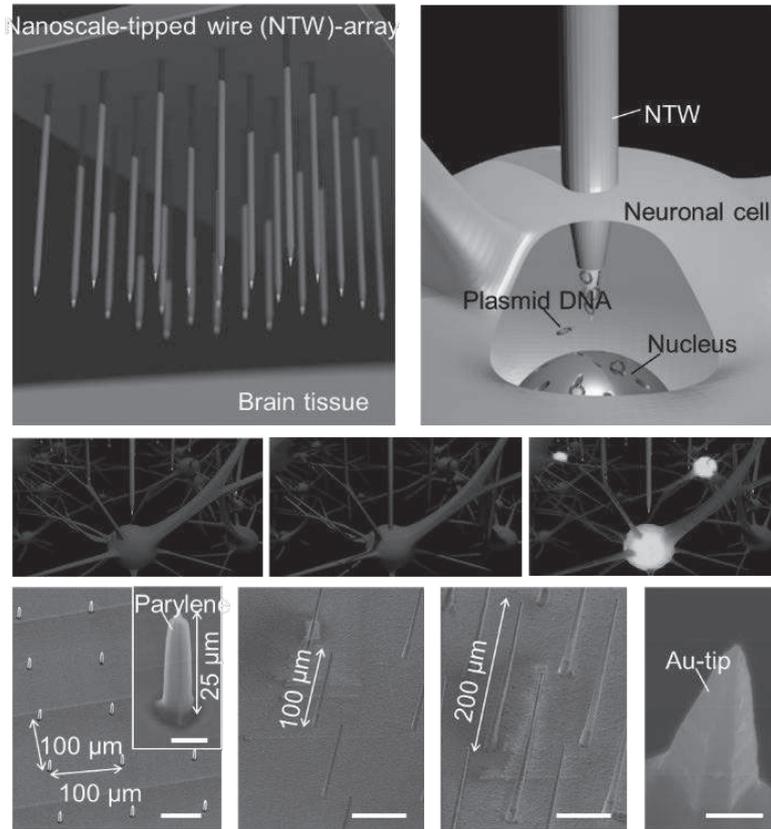
BDNFノックアウトマウスは、鬱症状を示すことが知られているため、光応答の頻度が高いフェノタイプが、BDNF発現異常にともなう鬱病傾向があると判断できることが示唆された。今回の結果から、BDNF因子の発現の異常が、大脳皮質での神経活動の異常として豊橋プローブを用いて定量的、経時的に評価できることが示唆された。

### 3.3 豊橋プローブによる外来性遺伝子の導入

長さ200 $\mu\text{m}$ の先鋭化した豊橋プローブで脳組織の深部の細胞にDNAなど外来性分子を導入することができることをたしかめた。培養した脳スライスや生きたマウスの脳内で、長さ200 $\mu\text{m}$ の豊橋プローブで、蛍光タンパクコード遺伝子を導入すると、プローブ長の8割ほどの160 $\mu\text{m}$ に近い深部の細胞まで、蛍光シグナルをしめすことから、豊橋プローブで、どの細胞から電気信号を測定したかをマーキングすることができた(図8,9)。

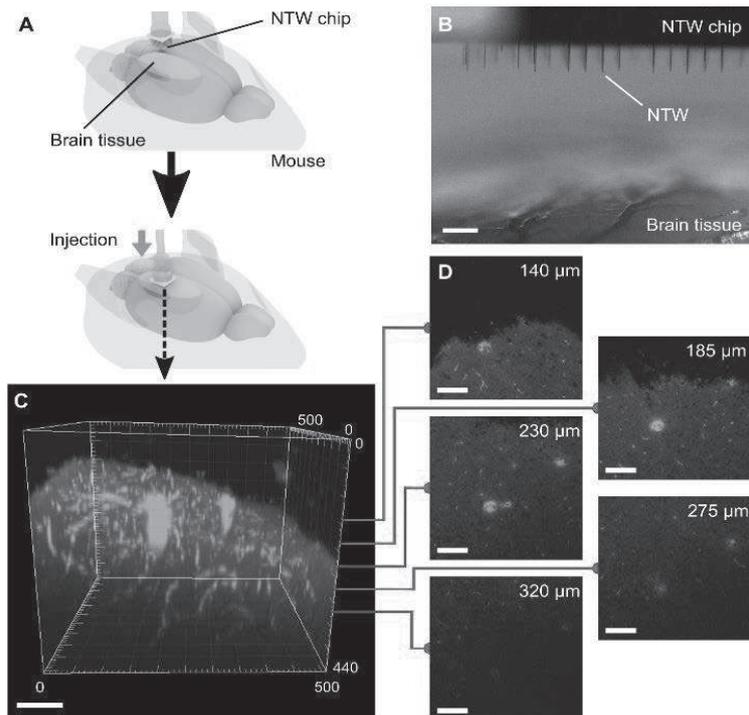
さらに、豊橋プローブで遺伝子の機能に変化を及ぼす核酸を同時に導入することができshRNA (ショートヘアピンRNA)分子を導入したところ、遺伝子機能をノックダウン(抑制)することができた(図10)。またgRNA(ガイドRNA)とCAS9蛋白をコードするベクターDNAを遺伝子導入すると、ゲノム編集により蛍光シグナルが発するようなシステム分子を豊橋プローブによる挿入にて、細胞に導入した、その結果、脳スライスの多くの細胞から蛍光シグナルが観察されたことから、ゲノム編集も可能であることがわかった(参考論文)。

図8 先鋭化した豊橋プローブによる、脳の細胞への核酸インジェクション



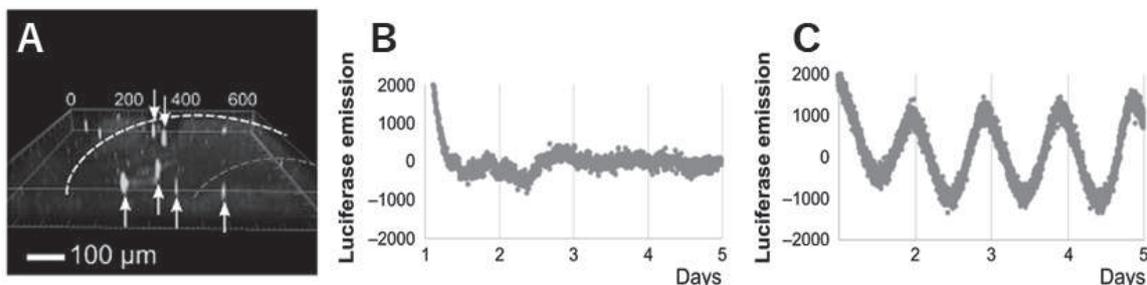
鋭化した複数本豊橋プローブをマウス組織細胞にアプローチすることで、遺伝子を脳細胞へのインジェクションし、蛍光シグナル発現など機能改変ができる模式図。

図9 豊橋プローブにて、アプローチしたマウス組織の細胞をマーキングできる技術



先鋭化した豊橋プローブにて、蛍光蛋白コードDNAをマウス脳に物理的に挿入することにより、豊橋プローブがアプローチした細胞は、蛍光シグナルマーキングができる。

図10 豊橋プローブでshRNAを導入し、遺伝子の機能がノックダウンする



(A)豊橋プローブにて、蛍光蛋白コード遺伝子とともに時計遺伝子*Bmal1*のshRNAを遺伝子導入した視交叉上核(概日リズム中枢器官)を含む脳スライス中の蛍光シグナル観察。蛍光シグナルを発する細胞では、shRNAが導入されていることを示す。(B)概日リズムを規定する時計遺伝子*Bmal1* 遺伝子のshRNAと(C)溶媒のみを遺伝子導入した視交叉上核脳スライス中の概日リズムを、発光リズムとして観察した結果。(B)では、時計遺伝子*Bmal1*遺伝子の機能がノックダウンされることで、概日リズムの発振機能が阻害されて発光振動が弱くなっている。

#### 4. 今後の展望

低侵襲シリコンマイクロニードル電極である先端直径が  $5\ \mu\text{m}$  の豊橋プローブは、他の従来型神経電極よりも細いためダメージが抑えられる。そのため、この豊橋プローブを用いることで、視覚野の光応答反応を、うつ病モデル遺伝子改変マウスにおいて、視覚野の光応答反応を、少なくとも3か月~1年計測でき、市販の測定電極と同様なフェノタイプを計測できた。この結果から、BDNFの異常発現が、認知能力や精神疾患様のフェノタイプに及ぼす影響を、豊橋プローブによる数ヶ月単位の経時的な脳計測にて、評価できることを示した。また、生きたマウスは長期の計測が可能であるため、行動実験なども同時に実施できる。このことは行動フェノタイプの検出と同様に、豊橋プローブによる経時的な脳計測は、進行に時間のかかる精神疾患のメカニズム解析や治療薬の薬効の評価に、非常に有効な実験系であることを示す。つまり、豊橋プローブ埋め込みマウスに、候補薬剤を投薬し、神経発火活動や行動が、野生型の形質に近づくかを調べることで、薬剤スクリーニングが可能であると考えられる。さらに、疾患の発症メカニズムを分子レベルで調べることも、豊橋プローブで計測前に、遺伝子機能変化を与えることも可能である。

## 参考文献

Numano R, Goryu A, Kubota Y, Sawahata H, Yamagiwa S, Matsuo M, Iimura T, Tei H, Ishida M and Kawano T

The long nanowire DNA stamper transfers gene directly into brain cells *ex vivo* and *in vivo*. FEBS Open Bio, 12(4),pp835-851. doi: 10.1002/2211-5463.13377. (発表論文)