

主論文の要旨

**Visualization of *Arc* promoter-driven neuronal
activity by magnetic resonance imaging**

磁気共鳴イメージング (MRI) を用いた *Arc* プロモーター活性に
基づく神経活動履歴の可視化

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
分子医薬学講座 薬物動態解析学分野

(指導：澤田 誠 教授)

吴 起

【緒言】

脳機能を理解するために生体における神経活動を直接的に可視化することは、神経科学分野における重要な課題の一つである。MRIは高い空間分解能で対象物を断層画像化できる生体イメージング手法で、神経活動をモニタリングするためにfMRIがしばしば用いられる。しかし、fMRIは脳内で生じる活動に基づく脳血流量の変化を可視化するものであり、直接的な神経活動を見ているわけではない。近年、鉄貯蔵タンパク質Ferritinをレポーターとすることにより、生体内の遺伝子発現をMRIで可視化できるようになってきた。また、最初期遺伝子の1つ*Arc*は記憶、学習など多様な神経活動に相関して速やかに遺伝子発現が誘導されることが知られている。そこで本研究では、*Arc*プロモーター制御下で鉄貯蔵タンパク質Ferritin及び不安定化配列を組み込んだ赤色蛍光タンパク質mKate2を発現する*Arc-Ferritin-mKate2* (AFM) マウスおよび神経細胞株N18_AFM細胞を作製し、*Arc*プロモーター活性に基づくMRIを用いた神経活動履歴の可視化について検討した。

【方法】

末梢神経への影響を排除する目的で、前処理としてムスカリン受容体拮抗薬MethylscopolamineをAFMマウスの腹腔内に投与した。その後、中枢神経興奮を誘導するために非選択的ムスカリン受容体アゴニストPilocarpineを300mg/kgで腹腔内投与し、投与後0~24hの経時的なMRI撮像を行った。また、並行して経時的に脳組織を採取し、mKate2の発現を蛍光により測定した。さらに、Ferritin、mKate2の分布及び発現量をそれぞれ免疫組織化学的手法及びWestern Blottingにより解析した。個体で観察された現象が神経細胞での変化であることを確認するために、N18_AFM細胞をPilocarpineで刺激し、経時的な細胞内への鉄の取り込みとMRIの造影効果の関連性について検討した。

【結果】

MRIによりマウス個体の神経活動が直接観察できるかどうかを検討するために、AFMマウスに中枢神経興奮作用を持つPilocarpineを投与し、経時的なMRI撮像を行った (Fig.1.A)。Pilocarpine投与4時間後をピークとして、海馬および大脳皮質においてT2強調画像の顕著な陰性信号増強が検出できた。一方、Ferritin-mKate2に由来する蛍光は、Pilocarpine投与1h後で最大となり、24h後には刺激前と同程度まで低下した (Fig.1.B)。海馬におけるFerritin-mKate2融合タンパク質の分布を明らかにするため、免疫組織化学的染色を行ったところ、mKate2及びFerritinのいずれの抗体で検出した場合でもPilocarpine投与1h後で歯状回からCA1に至るまで劇的に上昇し、その後徐々に低下して24hでPilocarpine投与前と同程度まで戻った (Fig.2.A and B)。また、Pilocarpine刺激によりFerritin-mKate2を発現する細胞は神経細胞マーカーのMAP-2陽性であることから神経細胞であることが確認できた (Fig.2.C)。Pilocarpine刺激によるFerritin-mKate2融合タンパク質の経時的な発現変化をWestern Blottingにより解析した (Fig.2.D)。大脳皮質および海馬においてFerritin-mKate2融合タンパク質の発現は1時間をピークとして上

昇し、その後徐々に低下し24時間で刺激前と同程度まで減少した。一方、内在性Ferritinの発現に変化は見られなかった。Pilocarpine投与によって遺伝子導入したFerritin-mKate2融合タンパク質のみ変化していることが確認できた。

神経細胞でのFerritin-mKate2融合タンパク質の発現とMRI信号の関連について詳細に検討するために、培地にPilocarpineを添加したN18_AFM神経細胞株を経時的にMRIおよび光イメージングで観察した。細胞内のT2強調画像信号強度は、Pilocarpine投与4時間後に顕著な陰性信号増強が確認でき、24時間までに刺激前と同程度までに戻った (Fig.3.A)。一方、mKate2赤色蛍光は1時間で最大となり、24時間までに刺激前と同程度までに戻った (Fig.3.B)。MRIの造影効果が細胞内のFerritin発現量と鉄の濃度変化に相関するのかを調べるために、この時細胞内の鉄濃度を測定したところ、Pilocarpine添加4時間後に最大となり、24時間までに元に戻ることがわかった (Fig.3.C)。

【考察】

本研究では、神経活動に連動して発現が増大する*Arc*プロモーター制御下でFerritin-mKate2を導入したマウス個体を用いることにより神経活動をMRIで直接可視化することができることを示した。AFMマウスをPilocarpineで刺激すると、海馬および大脳皮質の神経細胞においてFerritin-mKate2融合タンパク質の発現が速やかに増加し、24時間までに元に戻った。海馬や大脳皮質には数種類のムスカリン受容体が発現していることが知られているので、今回観察できたMRI信号の変化は非選択的ムスカリン受容体アゴニストであるPilocarpineに対する直接的な神経応答と、それに伴う2次的な神経活動の両方を可視化していると考えられる。

今回の実験では、Ferritin-mKate2融合タンパク質の発現とMRIで見られるT2強調画像陰性信号増強効果の間にピークギャップが生じることが判明した。細胞内の鉄濃度を調べてみると、細胞内の鉄濃度が最大となるタイミングに一致してMRIの信号増強が増大することがわかった。これらのことから、細胞内の鉄濃度の調節系などの働きにより、誘導されたFerritin-mKate2融合タンパク質と鉄の結合に時間がかかることでタイムラグを生じている可能性が考えられた。

先行研究から細胞膜の透過性を向上させるとMRIの信号増強が向上することが明らかになっている。また、生体膜を介した鉄輸送に関わるTransferrin受容体を過剰発現させることで細胞内の鉄の取り込みを向上させられることが報告されているので、Transferrin受容体とFerritinとをレポーターとして共発現させることで、生じているピークギャップを短縮させられる可能性がある。さらに、現在細胞質側に発現させているFerritinを膜提示型に改変することによってもピークギャップを短縮させられる可能性が考えられた。

【結論】

*Arc*プロモーター制御下でFerritinをレポーターとして発現させることにより、*Arc*プロモーター活性に基づく神経活動をMRIで非侵襲的に可視することに成功した。本手

法は神経活動の履歴を直接的に見ることができるので、認知機能などの高次機能発現における神経系メカニズムの解明や神経変性疾患など種々の病態における神経活動変化の分析など多岐にわたり役立てられると考えられる。