

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
研究開発課題名		マーモセット中枢神経系の細胞種特異的、回路特異的遺伝子発現ウイルスベクターの開発
機関名		国立大学法人群馬大学
研究開発	所属 役職	大学院医学系研究科脳神経再生医学分野 教授
担当者	氏名	平井 宏和

2. 研究開発成果の内容

① マーモセットの線維芽細胞から iPS 細胞の誘導および、各種の神経細胞への分化誘導

プロモーター活性及び細胞種特異性の確認において、使用するマーモセット個体を減らすためにマーモセット iPS 細胞を誘導し、そこから各種神経細胞を分化させる計画であったが、iPS 細胞化は一部成功しているものの、安定した培養が確立できなかった。中核機関の国立研究開発法人理化学研究所の岡野栄之先生に相談し、マーモセット線維芽細胞から iPS 細胞を経ずに直接ニューロンに分化させることとした。

② 抑制性ニューロン特異的プロモーターの開発

マーモセットとマウスのゲノムから 2.3 kb の長さをもつ VGAT プロモーターをクローニングし、ウイルスベクターに組み込んだ後、マウス脳で抑制性ニューロン特異性をもつか検討した。その結果、小脳では抑制性ニューロン特異性をもつことが明らかとなったが、大脳では興奮性ニューロン選択的に発現が観察された。

③ プルキンエ細胞特異的プロモーターの開発

マーモセットゲノムから場所の異なる 2 つのプルキンエ細胞特異的プロモーター候補領域をクローニングした。レンチウイルスベクターに組み込んだ後、ウイルス粒子を作成、注入してマウス小脳で検討したところ、2 つのうち 1 つがプルキンエ細胞特異的で比較的強いプロモーター活性をもつことが明らかになった。

④ 運動ニューロン特異的プロモーターの開発

種々の長さの VACHT プロモーター、ChAT プロモーターをクローニングし、ウイルスに組み込んで、脊髄、線条体、大槽、脳室等に注射し、運動ニューロン特異的発現が見られるか検討した。しかし、いずれのプロモーターも非特異的発現が見られた。そこで VACHT と ChAT プロモーターをあきらめ、運動ニューロン特異的と報告されている Hb9 プロモーターのスクリーニングに変更した。3 種類の異なる長さの Hb9 プロモーターを平成 28 年度の検討に備えてクローニングした。

⑤ マイクログリア特異的プロモーターの開発

遺伝子改変マウスにおいて、マイクログリア特異的に働くと言われている Iba1、CD11b、CD68、CX3CR1 の各プロモーター領域を種々の長さでクローニングし、ウイルスに組み込んだ後、炎症を惹起（マイクログリアを活性化）したマウス脳にウイルスベクターを注入してマイクログリア特異的発現が見られるか検討した。しかし、いずれのプロモーターも非特異的発現が強く見られ、目的のプロモーターが得られていない。

⑥ 同定したアストロサイト特異的プロモーターのマーモセットでの検証

マーモセットゲノム由来の 0.3 kb の GFAP プロモーターが、マーモセット中枢神経系でアストロサイト特異的に遺伝子発現させるために必要、かつ十分な領域であることを明らかにした。またこの 0.3 kb の領域内に存在する転写因子(STAT3)結合領域が、アストロサイト特異的発現に重要であることを見出した。

⑦ プロジェクトの総合的推進

開発した細胞種特異的プロモーターを国立研究開発法人理化学研究所の平瀬肇チームリーダー、国立大学法人北海道大学の渡辺雅彦教授、国立研究開発法人理化学研究所の合田裕紀子チームリーダー、国立大学法人東京大学の狩野方信教授に供給した。また国立研究開発法人理化学研究所の下郡智美チームリーダーと、本課題で開発した細胞種特異的プロモーターを用いた新規分子の機能解析を連携して行った。