

Title	Generation of a MOR-CreER knock-in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling(Abstract_要旨)
Author(s)	Okunomiya, Taro
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2020-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k22366
Right	許諾条件により本文は2020-10-25に公開; This is the peer reviewed version of the following article: [Okunomiya T, Hioki H, Nishimura C, Yawata S, Imayoshi I, Kageyama R, Takahashi R and Watanabe D. Generation of a MOR-CreER knock-in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling. <i>genesis</i> . 2020;58:e23341.], which has been published in final form at [https://doi.org/10.1002/dvg.23341]. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Use of Self-Archived Versions.
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医学)	氏名	奥宮 太郎
論文題目	Generation of a MOR-CreER knock-in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling (ミューオピオイド受容体 (MOR) のシグナル伝達および神経回路制御機構解析を目的とする MOR-CreER ノックインマウスの開発)		
(論文内容の要旨) ミューオピオイド受容体 (MOR) は疼痛や報酬・嗜癖行動などの様々な脳機能に関わる G タンパク質共役型受容体である。MOR 発現細胞は様々な脳領域に散在し、発生期と成体で発現パターンが変化する。そのため、MOR を発現する神経回路を正確に同定し、その機能を解析することは従来困難であった。この問題を解決するため、本研究では、生体内で MOR 発現細胞を時期特異的に遺伝学的に同定できるマウスモデルを開発することを目的に、MOR 発現細胞特異的なタモキシフェン (Tm) 誘導型 Cre 組換え活性をもつマウス系統を開発した。 まずマウス ES 細胞を用いて、T2A ペプチドと変異型エストロゲン受容体結合型のコドン最適化型 Cre 組換え酵素 (iCreER ^{T2}) 配列を、MOR をコードする <i>Oprm1</i> 遺伝子のエクソン 4 の終止コドン部位に相同組換えを用いてノックインした。ES 細胞からキメラマウスを経て、MOR-CreER マウスを作製した。 次に、Cre 組換え活性を可視化するため、MOR-CreER マウスと、Cre 依存的に HA タグ付き蛍光タンパク質 (bright teal fluorescent protein, mTFP1) を発現する R26-CAG-LoxP-mTFP1 マウスとを交配した。このマウス成体に Tm を計 15 日間投与し、神経系において mTFP1 発現細胞の分布を調べた。mTFP1 発現細胞は、嗅球、大脳皮質、線条体ストリオソーム区画、海馬、扁桃核、視床、視床下部、脚間核、上丘、下丘、中脳水道周囲灰白質、傍腕核、蝸牛神経核、縫線核、脳幹網様体、疑核、孤束核、脊髄、後根神経節を含む広範な領域に分布していた。これらの分布は既報の <i>Oprm1</i> mRNA の分布にほぼ合致していた。さらに、MOR 発現細胞への特異性を確認するため、 <i>Oprm1</i> mRNA に対する <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション (ISH) 法と HA タグに対する免疫組織化学による蛍光二重染色を行ったところ、線条体、大脳皮質感覚野第 V 層、海馬 CA1 領域、内側手綱核、視床下部外側野、傍腕核、疑核、後根神経節において、HA 陽性細胞の 95%以上で ISH シグナルを認めた。これは、Cre 組換えが MOR 発現細胞に特異的に生じることを示す。 哺乳類の線条体は、MOR を強く発現するストリオソーム区画と、その周囲のマトリックス区画からなる。線条体神経回路の機能解明のためにストリオソーム選択的な Cre 組換え活性をもつマウスは有用と考えられる。そこで、MOR 免疫組織化学によってストリオソーム区画を定義し、Cre 組換え活性の分布を調べた。その結果、mTFP1 発現細胞のストリオソーム区画における細胞密度は、マトリックス区画に比べ 7-15 倍高かった。さらに、線条体に Cre 依存的な AAV ベクターを注入しても同様の結果を得た。これは、MOR-CreER マウスがストリオソーム選択的な Cre 組換え活性をもつことを示す。 最後に、発生期における有用性を調べた。マウスの胎生期線条体において、 <i>Oprm1</i> mRNA は成体と異なりびまん性に分布することが知られている。MOR-			

CreER マウスと R26-CAG-LoxP-mTFP1 マウスを交配し、胎生 17 日目に Tm を投与すると、出生 0 日目の線条体において、mTFP1 発現細胞は広範に分布していた。これは、MOR-CreER マウスが発生期において、時期特異的に MOR 発現細胞を標識できることを示す。

以上から、本研究で作製した MOR-CreER マウスは、MOR 発現細胞特異的な Cre 組換えを可能にし、MOR のシグナル伝達および神経回路制御機構解析に応用できる新規遺伝子改変マウスであると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

現代の神経科学において、対象とする神経細胞集団選択的に Cre 組換えを生じる遺伝子改変マウスは強力な研究ツールである。本研究は、ミューオピオイド受容体 (MOR) 発現細胞特異的にタモキシフェン (Tm) 誘導型 Cre 組換え酵素を発現する新規の遺伝子改変マウス (MOR-CreER) を作製し、その特徴を解析したものである。まず Rosa26 レポーターマウスを用いて、全脳・脊髄において Tm により誘導される Cre 組換え活性の分布を調べたところ、既報の MOR 発現細胞の分布と概ね一致した。次に蛍光 ISH 法により、この Cre 組換えが MOR 発現細胞に特異的であることを示した。また線条体では、この Cre 組換えはストリオソーム区画に選択的であることを示した。さらに Cre 依存的な アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、ストリオソーム区画選択的な EGFP 蛍光タンパク質の発現に成功した。最後に、発生期線条体においても Tm 依存的な Cre 組換えを生じることを示した。これらの結果より、MOR-CreER マウスは MOR 陽性細胞特異的かつ Tm 依存的な Cre 組換え活性を有し、MOR のシグナル伝達および神経回路制御機構解析に有用と考えられる。

以上の研究は線条体ストリオソーム区画をはじめとする MOR 陽性神経回路の機能解明に貢献し、疼痛や報酬予測・嗜癖行動を司る神経回路基盤研究の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 3 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降