

【目的】 自律神経活動は視床下部を中心とする中枢神経ネットワークによって制御される。近年では、中枢性の自律神経調節機構に関して、ストレスや情動、痛みなどといった様々な要因による自律神経の変調メカニズムに関する研究が飛躍的に進んできている。一方で、従来の研究において見逃されている視点の一つに、末梢神経系で構成される末梢神経回路による自律神経調節機構がある。中でも腹腔神経節は、腸管を支配する感覚神経の側枝または腸管神経叢からの投射、神経節内に介在神経が存在するという報告がなされており、末梢神経内に小さな神経回路の存在が示唆されてきた。本研究では、交感神経節を構成する個々の細胞について、次世代シーケンスを用いた snRNA-seq (Single-nucleus RNA-sequence) 法をもちいて、シングルセルレベルで遺伝子プロファイルを明らかにする。また、この網羅的遺伝子解析に加え、摘出した組織サンプルに対し直接的に電気生理学的解析を行うことで、交感神経節内神経回路の仕組みについてもアプローチを行う。これらの発現遺伝子解析と電気生理学的解析を組み合わせることにより、これまで不明であった末梢神経内で行われる交感神経制御基盤の全容を明らかにすることを目的とする。

【方法】 雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットの腹腔神経節を用いて snRNA-seq 解析を行った。データの取得には次世代シーケンサーを用いて、ライブラリ調製したサンプルの塩基配列を取得した。得られた生データはクオリティコントロール後に `seurat` パッケージを用いてクラスター解析を行った。また、電気生理学的解析として、Whole-mount 腹腔神経節標本を用いた Patch-clamp 法を行った。記録には 7 週齢の雄性 SD ラットを用い、腹腔神経節標本の作製を行った。サンプル処理として 0.05% コラゲナーゼと 0.05% Dispase II による 5 分間の酵素処理を行った。pressure-clamp パッチクランプ法を用いてホールセルパッチクランプを行い、voltage-clamp 法と current-clamp 法により神経細胞の機能特性の解析を行った。

【結果】 腹腔神経節を構成する各種細胞の発現プロファイルを明らかにするため snRNA-seq 法を行い、取得したデータについては UMAP にて次元削減を行った。腹腔神経節に局在する個々の細胞をクラスター分類し、マーカー遺伝子でアノテーションした結果、腹腔神経節を構成する細胞は大きくグリア細胞、神経細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞 (resting, activated)、免疫細胞、分裂細胞、血管内皮細胞の 7 種類の細胞群に分類することができた。さらに神経細胞のみで再クラスタリング解析を行うと、遺伝子発現プロファイルが異なる 4 つの群に分類することができた。whole-mount の腹腔神経節標本を用いたパッチクランプ法を行った結果、自発性のシナプス後電位 (sEPSCs) の記録に初めて成功し、アセチルコリンによるシナプス伝達が行われていることを確認することができた。また、各種神経伝達物質への反応性の違いを検討した結果、アセチルコリンではない他の伝達物質も交感神経活動調節に積極的に関わっていることが明らかとなった。

snRNA-seq 法による腹腔神経節構成細胞のメガクラスター解析

