

論文審査の結果の要旨

氏名：小 林 秀太郎

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：A new method for determination of *Thy1*-GCaMP6s using two-photon microscopy in mice
(2光子励起顕微鏡を用いた新たな *Thy1*-GCaMP6s 発現判定法)

審査委員：(主査) 教授 篠 田 雅 路

(副査) 教授 外 木 守 雄

教授 小 林 真 之

教授 白 川 哲 夫

Thy1-GCaMP6s 遺伝子改変マウスは *Thy1* プロモーター制御下にカルシウム指示タンパク質である GCaMP6s を発現させたマウスである。大脳皮質及び海馬における興奮性神経細胞に発現させた GCaMP6s は、カルシウム濃度上昇に応じてその緑色蛍光強度が上昇し、これを利用することで神経活動を蛍光強度の変化として可視化できる。*Thy1*-GCaMP6s マウスはヘミ接合体を交配に用いることから、繁殖で得られる個体のうち半数のみが GCaMP6s を発現している。そのため、実験に用いる前に、その表現型を同定する必要がある。通常は、尾の生検を行い Polymerase chain reaction 法 (PCR 法) によって仔マウスの遺伝子型の判定を行うが、時間と費用がかかるため、研究を遂行する速度を低下させる要因ともなる。そこで、本研究では *Thy1* プロモーター制御下に GCaMP6s が末梢神経等においても発現している可能性に着目し、新たな表現型判定法の開発を目的とした。雄性ヘミ接合型 *Thy1*-GCaMP6s 遺伝子改変マウスと雌性野生型マウスを交配して得られた 3-4 週齢仔マウスの尾部先端約 2 mm を 4%イソフルラン麻酔下において切断し、得られた尾を 1 mm に再切断して得られる尾断面を 2 光子励起顕微鏡によって撮像した。励起波長は 940 nm に設定し、得られる光を GCaMP6s が発する蛍光の波長（緑色: 495-540 nm）と、それよりも長波長（赤色: 575-645 nm）に分離しそれぞれの蛍光強度を計測した。

その結果、以下に示す知見を得た。

1. 2つの蛍光画像の重ね合わせを行うと、赤色と緑色が重なることで橙色を呈する領域に加えて強い緑色蛍光を呈する組織が認められる群 (type 1) と、橙色を呈する組織のみが認められる群 (type 2) の2群が存在した。
2. type 1 では緑色輝度値から赤色輝度値を引いた差分値が正となる画素が多数存在したのに対して、type 2 ではほぼ 0 や負を示す画素が大半を占めた。
3. type 1 では大脳皮質神経細胞に GCaMP6s 発現を認めるのに対して、type 2 では発現を認めなかった。
4. 血液の付着した尾断面では、緑色蛍光画素数が減少した。
5. 強い緑色蛍光を発する尾部組織内部には軸索を認めた。
6. 切断から 24 時間経過後の尾断面では、緑色蛍光強度の低下を認めた。

以上から、*Thy1*-GCaMP6s マウスは、尾部組織においても GCaMP6s を発現している組織が存在し、その発現を観察することで、表現型を判定できることが明らかとなった。本研究で考案された表現型判定法は、短時間、低コストを実現するものであり、同系統の遺伝子改変マウスを用いた歯学研究に貢献するものである。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 4 年 3 月 1 0 日