

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14564

研究課題名(和文) 順行性ウイルスベクターを用いた知覚神経回路形成機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of sensory perception circuit formation using anterograde viral vectors

研究代表者

花嶋 かりな (Hanashima, Carina)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・准教授

研究者番号：80469915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質を構成するニューロンは共通の投射標的をもつ6層のニューロンを領野ごとに修飾し、複雑かつ秩序だった3次元の神経回路をつくることで視覚・体性感覚・聴覚等の高次の知覚を発現する。この知覚神経回路の構築には内因性の遺伝子プログラムに加え、末梢感覚器官からの神経入力が必要な役割を担うと考えられているが、その寄与については不明な点が多く残されていた。本研究では、知覚神経回路形成過程の入力依存性を明らかにするために、順行性シナプス移行型のウイルスベクターによる入力可視化および神経活動の制御を行い、神経活動依存的な大脳皮質神経回路構築機構について新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The cerebral cortex consists of six neuronal layers that share common input and output connections to form a complex but ordered three-dimensional neuronal circuit. It has been postulated that sensory inputs from peripheral organs play an important role in construction of the sensory circuit in addition to endogenous gene program, however the contribution of input-dependent sensory circuit formation has remained largely elusive. In this study, we assessed the input and neuronal activity dependent mechanisms of sensory circuit formation by utilizing an anterograde trans-synaptic viral vector system and neuronal activity manipulation. Our results indicate that the precise neuronal wiring and areal establishment requires activity-dependent mechanisms of thalamocortical input and layer neuron maturation.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 神経回路形成 経シナプストレーサー 知覚神経回路

1. 研究開始当初の背景

脳の知覚神経回路の形成には、内因性の遺伝子プログラムに加えて末梢感覚器官からの神経入力が必要であると考えられてきたが、その寄与については不明な点が多く残されてきた。大脳皮質を構成するニューロンは共通の投射標的をもつ6層のニューロンを領野ごとに修飾し、複雑かつ秩序だった3次元の神経回路をつくることで視覚・聴覚・体性感覚等の高次の知覚機能を発現する。これまで大脳皮質神経回路の構築原理を理解するために、神経幹細胞自身にコードされる分子の遺伝学的操作により、層特異的なニューロンの分化決定を制御するプログラムを明らかにしてきた (Kumamoto et al. *Cell Reports* 2013; Gonda et al. *Cereb Cortex* 2013)。また国内外の研究により各層のニューロンの分化を制御する遺伝子が同定され、大脳皮質神経回路形成を担う内因性機構については知見が得られつつある。一方で大脳皮質の神経回路形成には内因性制御のみならず、細胞間コミュニケーションを介したシグナル伝達に依存することが近年の研究により見出されているが (Toma et al. *J Neurosci* 2014)、大脳皮質を始めとして一般的に脳神経回路形成における外因的な制御の寄与とその実体については不明な点が多い。そこで本研究は神経回路形成過程の入力依存性を明らかにするために、特定の末梢感覚入力を細胞レベルで可視化・制御するシステムを確立し、特異的な神経活動の操作による大脳皮質神経回路構築への作用を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

大脳皮質のように複雑な結合様式をもつ脳神経回路の動作原理を理解する上では、神経細胞同士のつながりを可視化し、目的遺伝子の発現を操作するシナプス移行型のトレーサーは有用なツールである。これまで経シナプストレーサーとして汎用されているラブドウイルスを主体とした逆行性ウイルストレーサーは神経回路研究において大きな革新をもたらしたが、投射標的細胞に移行して遺伝子の発現を操作する順行性型の経シナプストレーサーについては汎用性のあるものが確立されておらず、例えば大脳皮質の視覚野の形成においては、眼から伝達される入力情報が、発生段階で時空間的にどの範囲に作用するのかを正確に判断するのは困難であった。また従来の研究において領野の境界の判別には複数の発現マーカー分子の組み合わせが用いられてきたが、とりわけ周産期や生後発達

期の脳においては遺伝子の発現変動が非常にダイナミックで、各領域間の境界が不明瞭であった。これらの状況を考慮し、感覚器の受容ニューロンからの入力を蛍光タンパク質等にて可視化し、その最終投射先まで標識できるシステムがあれば、特定時期に感覚入力を受容する大脳皮質領域を細胞レベルで解析することが可能となることが考えられた。そこで本研究では改変型水泡性口内炎ウイルス (VSV) を用い、生体での簡便かつ特異性の高い順行性経シナプスウイルストレーサーを用いることによって、神経回路形成過程の入力依存性を明らかにし、知覚神経回路の形成機構とその動作原理の理解に向けて新たな進展を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

順行性シナプストレーサーは、水泡性口内炎ウイルス (VSV) と単純ヘルペスウイルス (HSV-1) の2つが同定されているが、HSV-1 のゲノムは大きく複雑で (150kb) 精製が困難であり、細胞障害性に関する改善策が示されていない。本研究ではウイルスベクターの条件として、①神経細胞に発現、②多段階シナプスを介した標的細胞においても機能遺伝子が高発現し、③調整・維持が容易であり、そして④順行性の移行特異性をもつ、という条件を網羅する材料として VSV に着目した。VSV はこれまで多様なサブクロニングの実績があり、ウイルス産生が比較的容易であるが、神経科学研究での用途は限られていた。そこで本研究ではウイルスベクターの改変による導入遺伝子発現の強化を図り、神経回路形成研究への新たなツールの開発を試みた。特に知覚神経回路形成においては感覚入力特異的な入力遮断・亢進による機能解析は、遺伝子発現の機能欠損、機能獲得実験と同様に有用な情報が得られることが期待され、可塑性の高い高次脳の回路形成において神経入力後の遺伝子操作による個々の細胞の挙動を捉えることが可能となる。このため本研究では当該ウイルスを生体内での神経回路研究に応用するために、①任意の遺伝子を搭載可能な改変型ベクター系の樹立、②胎児/新生児の神経回路形成期への適用の評価、③機能遺伝子の生体での発現レベルの強化を行い、知覚神経回路の形成原理を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

本研究では1) VSV を用いたコンストラクトの作製、2) ウイルスの産生・Cre 酵素活性、3) 胎児及び新生児への感染方法について検討し、さらに4) 神経活動依存的な感覚野の形成機構について解析を行った。まず VSV をコードする5つの構成遺伝子のうち、G タンパク質と L タンパク質の間に GFP を挿入した VSV-GFP、および GFP 領域に mCherry、Cre または mCherry-Cre 配列を挿入した新規の Cre 導入型ウイルスの作製を行った。これらのウイルスを用い、初めに培養細胞でのウイルスの産生効率および Cre 酵素活性について検討した。培養細胞としては 293T、Huh7 細胞、神経細胞の Neuro2a 細胞、および Cre 依存的レポーターを導入した ES 細胞を用い、pVSV、また比較として pCAGGS ベクターに Cre またはレポーター遺伝子を導入したベクターを用い、免疫細胞染色およびウェスタンブロットティングにより発現レベルについて解析を行った。これらにより VSV ベクターがレポーター遺伝子の発現と Cre の誘導による組み換えにおいて有用であることが確認された。

次に VSV-Cre 依存的に TdTomato レポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを交配し、感覚器官の感染効率および末梢感覚器官と大脳皮質の結合性についての解析を進めた。特にウイルスの感染濃度や部位、時期についての条件検討を行い、各感覚器官に感染させた VSV により Cre が視床へ到達すると、Cre 依存的にレポーター遺伝子の発現 (Cre/loxP システム) が誘導される系においての組み換え効率について検討を進めた。この結果、VSV を感染させた入力経路のみシナプス伝達を可視化する条件を見出し、全脳および凍結切片を用いた蛍光免疫染色、3次元画像の取得により、脳スライスおよび細胞レベルでのイメージング解析を行った。さらにこれらのウイルスの周産期および新生児マウスへの感染手法および感染効率についても検討を行った。これまで VSV を生後早期に感染させた実験は報告が少ないが、今回の結果から成体と比較し幼若期マウスではインターフェロン産生による VSV の不活性化が低減されている可能性が示され、効率的な遺伝子発現の誘導が見出された。この結果、網膜に感染させた VSV により大脳皮質第4層ニューロンにおける mCherry タンパク質の発現、および知覚神経回路にける Cre 依存的なレポーターの発現が確認され、本システムが生体内における解析に有用であることが示された。

上記と並行し、さらに VSV 由来の Cre を大脳皮質の1段階前である視床で機能させるためのマウスシステムとして、tetR 応答性配列 (tetO) をプロ

モーターの下流でシナプス伝達を阻害する破傷風神経毒素 (TeNT) と GFP をもつマウス (tetO-TeNT-EGFP) についても合わせて検討した。これまでの研究から tet-トランスアクチベーターシステムは高レベルの遺伝子発現の誘導において有効であることが示されており、本システムにおいても Foxg1-tTA マウスシステムとの交配により、胎生 18 日目の大脳皮質での GFP の発現レベル、TeNT 活性化による VAMP2 切断と発現量減少を確認した。これらの結果、本システムが生体内で目的遺伝子を高レベルで発現させ、かつ発現時期と部位特異的な制御において有用であることが確認された。次に知覚神経回路形成の神経活動依存性を明らかにするために、神経活動抑制を行ったマウスについて生後7日目と21日目の視覚野および体性感覚野における樹状突起のパターニング、またマーカー遺伝子の発現を用いた領野の配置についての定量的解析を行った。これらの解析の結果、知覚神経回路形成における神経活動依存的なニューロンの分化と統合機構が新たに示された。

本研究で作製した改変型 VSV ベクターは任意の遺伝子を搭載することが可能で、既に確立している細胞や組織、時期特異的な遺伝子発現操作モデルとの組み合わせにより、幅広い実験系への対応が可能であり、また電圧等の物理的刺激を与えることもなく感染法としても簡便で、遺伝子導入効率が高いことが示された。従来のウイルスベクターは成熟した回路標識にのみ適用されてきたが、動的な神経回路形成過程を捉えるにあたってはその結合性の時空間的な変化やニューロンの配置挙動を細胞レベルで解析することで、より明確な情報が得られるという利点がある。今後本手法を用いた、周産期から生後早期にかけての単一細胞レベルでの回路形成過程への適用や、GFP や mCherry 等蛍光レポータータンパク質のみならず、近年活用されている時期特異的 (tet-トランスアクチベーターシステム)、部位選択的 (Cre/loxP システム)、および刺激特異的 (チャンネルロドプシン) 遺伝子発現操作法に加えて細胞アブレーション (ジフテリア毒素) との組み合わせにより、神経回路形成の解析手法等への応用の可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Kumamoto, T, Hanashima, C. Evolutionary conservation and conversion of Foxg1 function in brain development. (2017) *Development, Growth & Differentiation* 査

- 読有, 59, 258-269
- ② Hou, P.S., Kumamoto, T., Hanashima, C. (2017) A Sensitive and Versatile In Situ Hybridization Protocol for Gene Expression Analysis in Developing Amniote Brains *Methods in Molecular Biology* 査読無, 1650, 3189-334
- ③ 當麻憲一, 花嶋かりな (2016) 大脳皮質層ニューロンの分化と統合メカニズム 生体の科学 大脳皮質 — 成り立ちから機能へ 査読無, 68, 19-23

[学会発表] (計 10 件)

- ① Hanashima, C. (2017) The role of Foxg1 in the development of neocortex. International Symposium and Conference on Congenital Anomaly and Developmental Biology. Yogyakarta, Indonesia
- ② Hanashima, C. (2017) Mechanisms of neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex. Janelia Conference 2017 'Control of Neuronal Identity II' Ashburn, USA
- ③ Wang, T.C. Hanashima, C. (2016) Roles of neuronal activity in the establishment of neocortical neuron identity. Neuroscience 2016, SfN's 46th Annual Meeting, San Diego, USA
- ④ Hou, P.S. Hanashima, C. (2016) Temporal dynamics of laminar subtype neuron differentiation in developing mouse neocortex. Neuroscience 2016, SfN's 46th Annual Meeting, San Diego, USA
- ⑤ Hanashima, C. (2016) Establishing neuronal identity in the cerebral cortex. Volga Neuroscience Meeting 2016 'Molecular Neuroscience' Saint Petersburg-Nizhny Novgorod, Russia
- ⑥ 花嶋かりな (2018) 時空間制御による大脳皮質ニューロン産生のメカニズム. シンポジウム「多角的視点から紐解く大脳皮質の発生と機能」第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 東京
- ⑦ Hou, P.S. Hanashima, C. (2017) Transcriptional mechanisms underlying the establishment of sensory areas. 次世代脳プロジェクト 合同若手シンポジウム, 東京
- ⑧ Wang, T.C. Hanashima, C. (2017) Early thalamocortical connectivity is established through activity-dependent specification of layer 4 neurons. 第 40 回日本神経科学大会, 幕張

- ⑨ Hanashima, C. (2016) Mechanisms that establish cell fate in the cerebral cortex. 第 39 回日本分子生物学会 シンポジウム「神経細胞の誕生と初期神経回路形成の分子メカニズム」横浜
- ⑩ Wang, T.C. Hanashima, C. (2016) Intrinsic and extrinsic control of layer IV neuron identity in the cerebral cortex. 第 39 回日本神経科学大会, 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://hanashima-lab.wixsite.com/waseda>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花嶋かりな (HANASHIMA, Carina)
理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー
研究者番号: 80469915

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

なし