

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700308

研究課題名（和文）

新規逆行性越シナプストレーシング法による大脳皮質－大脳基底核ループ回路の解析

研究課題名（英文）

Analysis of cortico-basal ganglia loop circuits with novel retrograde transneuronal tracing technique

研究代表者

井上 謙一（INOUE KEN-ICHI）

京都大学・霊長類研究所・特定助教

研究者番号：90455395

研究成果の概要（和文）：

狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプストレーシング手法により、大脳皮質－大脳基底核ループの構築様式を解析し、背側線条体を含む並列閉ループ回路と、腹側線条体を含む開ループ回路の存在を明らかにした。また、狂犬病ウイルス CVS 株のフルゲノムおよび各構成遺伝子のクローニングを行い、ベクターとして利用できるようウイルスゲノム cDNA から感染性ウイルス粒子を得る回収系を構築し、GFP や RFP 遺伝子等のマーカータンパク質を利用して逆行性越シナプスの多重トレーシング手法を可能とした。

研究成果の概要（英文）：

By means of retrograde transneuronal labeling technique with rabies virus, the structural basis for cortico-basal ganglia loop circuits was analyzed in macaque monkeys. We demonstrated the existence of a closed, parallel loop involving the dorsal striatum and an open loop involving the ventral striatum. Moreover, we performed cloning of full-length genome and all genes of the CVS strain of rabies virus, and established the rescue system for a rabies virus vector from cDNA plasmid. This enables us to achieve multi-color retrograde transneuronal tracing with marker proteins such as GFP and RFP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学・脳－神経・脳情報処理・解剖学・大脳基底核・ウイルスベクター

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

大脳基底核は小脳と共に、随意運動の制御に重要な役割を担う高次中枢として知られており、大脳皮質の広い領野に由来する情報は、大脳基底核で処理された後、大部分は視床を介して大脳皮質に戻るというループ回路を形成している。この一連の情報処理様式について、Alexander らは、解剖学的な神経連絡から5つの並列なループ回路を提唱した (Alexander et al., *Annu Rev Neurosci*, 1986)。また、Parent らは線条体を大脳皮質との神経結合に基づいて3領域に分類し、並列ループ回路を提唱すると共に、各ループ回路が基底核内で影響を及ぼし合う可能性も示唆した (Parent et al., *Brain Res Rev*, 1995)。その後、高田らは、運動野に注目して電気生理学的手法と解剖学的手法を組み合わせた実験を行い、大脳皮質からの情報は線条体において、基本的には並列・分散的に処理されるが、機能的に関連のある領野からの情報は、ある程度収束・統合的に処理されるということを示した (Takada et al., *Exp Brain Res*, 1998; Nambu et al., *J Neurophysiol*, 2002)。また、Strick らや高田・宮地らは、逆行性感染伝播能を有する単純ヘルペスウイルス I 型や狂犬病ウイルスを運動野などに注入し、逆行性にラベルされたニューロン群の分布が、淡蒼球内節や黒質網様部、および線条体や視床下核においても皮質と対応した topography を持つことを示し、並列ループ回路を直接的に証明した (Miyachi et al., *Neurosci Res*, 2006)。しかしながら、このような研究が進んでいるのは運動野と基底核とのループ回路のみであり、並列ループ回路間でのインタラクションがあるのか？あるならばどのような様式なのか？という問題が未だ解決されていない。実際に宮地らは線条体において、一次運動野注入により逆行性にラベルされたニューロン群が一次運動野からの投射が無い部位にも見られることを報告しており、並列ループ回路同士が神経結合を持つ可能性、あるいは並列ループ回路間を繋ぐ別の皮質—基底核ループ回路が存在する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプストレーシング手法と、それを発展させたトレーシング手法を組み合わせ、大脳皮質—大脳基底核ループの構築様式を明らかにしようとするものである。特に、これ

までの研究で明らかになってきた並列ループ回路について、回路間に交わりがあるのかを検証し、あるのならばその様式を明らかにすることを目的とする。本研究では、これらの可能性を検証するため、まず複数の領野 (Alexander らの提唱する Moter loop, Ocuromoter loop, Prefrontal loop に属する領野) について狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプストレーシング手法を適用し、大脳皮質—大脳基底核ループの回路間での交わりの程度について調べる。本研究ではさらに、従来の狂犬病ウイルスを用いたトレーシング手法を発展させた新規神経路解析法を開発し、大脳皮質—大脳基底核ループの構築様式を明らかにするための有用なツールを作製する。

3. 研究の方法

これまでの狂犬病ウイルスを用いた研究は主に一次運動野を対象としたものであったが、本研究では、Moter loop に属する一次運動野、運動前野、Ocuromoter loop に属する補足眼野、Prefrontal loop に属する前頭前野背外側部を対象とする。まず狂犬病ウイルスをこれらの領野に注入して基底核における逆行性ラベルの分布を調べ、基礎的な知見を得ると共にその重なりについて検証する。具体的には、二次でラベルされる淡蒼球内節や黒質網様部の感染細胞の分布と、三次でラベルされる線条体・視床下核・淡蒼球外節の分布を調べ、その重なりがどの程度あるかを調べる。線条体と視床下核については、逆行性ラベルの分布と各皮質からの軸索末端の分布の知見とを比較し、閉ループの程度について検証する。

また、上記の実験の結果をより確かなものとするために、同一個体で、順行性トレーサーである PHA-L を同側のウイルス注入領野あるいは別の領野に注入する実験を行う。具体的には、電気生理学的マッピング等により皮質領野を同定した後、まず PHA-L を注入し、その3週間後に狂犬病ウイルスを注入する。ウイルス注入から3日 (2次) ないしは4日 (3次) 後にサルをホルマリン還流して脳の連続切片を作製し、逆行性ラベルの分布と各皮質からの軸索末端の分布を同一個体で比較する。

また、狂犬病ウイルス CVS 株のフルゲノムのクローニングと構成遺伝子のクローニングを行い、ベクターとして利用できるようにウイルスゲノム cDNA から感染性ウイルス粒子を得る回収系を構築する。本研究では従来

から神経トレーサーとして利用されている固定株の CVS 株を用いる。まず狂犬病ウイルス CVS 株のフルゲノム配列のシークエンシングを行い、次いで全ゲノムのクローニングを行い、ベクターとして利用できるよう改変ハンマーヘッドリボザイムおよび D 型肝炎ウイルスリボザイム配列を含むベクタープラスミドを作製する。また、構成遺伝子の N, P, M, G, L 遺伝子のクローニングを行、ヘルパープラスミドとして利用する発現プラスミドを構築する。狂犬病ウイルスゲノムに GFP や RFP 遺伝子等のマーカータンパク質を組み込み、越シナプスの神経トレーサーとして実用的なベクターを作製する。

4. 研究成果

本研究では、サル的一次運動野、運動前野、補足眼野、前頭前野背外側部・腹内側部、および高次視覚野への狂犬病ウイルス注入実験を行い、それぞれ二次性のラベルと三次性のラベルが検出できるよう生存期間（3-4 日）を調節した。一次運動野、運動前野、補足眼野に関しては皮質内微小刺激法により同定を行い、高次視覚野に関しては感覚刺激による反応性により同定を行った。また、一次運動野に関しては、順行性トレーサーである PHA-L の注入の後に狂犬病ウイルスを注入する実験も実施した。これらのサンプルにおいて、抗狂犬病ウイルスおよび抗 PHA-L 免疫組織化学を行い、大脳基底核における感染細胞の分布を解析した。その結果、いずれのサンプルにおいても、淡蒼球内節や黒質網様部が二次でラベルされ、線条体・視床下核・淡蒼球外節が三次でラベルされる結果を得た。線条体および視床下核のラベル細胞の分布はおおむね皮質からの投射部位と一致し、重なりを含みつつも閉ループ回路が存在している可能性が示唆された。一方、全てのサンプルにおいて、三次性に腹側線条体にラベルが見られ、腹側線条体を含む開ループ回路が別で存在する可能性が示唆された。

また、本研究では狂犬病ウイルス CVS 株のフルゲノムおよび各構成遺伝子のクローニングを行い、ベクターとして利用できるようウイルスゲノム cDNA から感染性ウイルス粒子を得る回収系を構築した。まず狂犬病ウイルス CVS-26 株のフルゲノム（約 12kb）及びヘルパープラスミド作製に必要な各遺伝子（N：約 1.5kb；P：約 1kb；G：約 1.5kb；L：約 6.5kb）のクローニングを行った。各遺伝子に関しては、ヘルパープラスミドとして CMV プロモーターでドライブさせる発現プラスミドを作製し、神経芽腫細胞 N2a 株に導入

してその発現を抗体染色法により確認した。フルゲノムに関しては、6 フラグメントに分けてクローニングを行ったため、ベクター構築のためのミュレーションを加えつつ、両端に改変ハンマーヘッドリボザイムと D 型肝炎ウイルスリボザイムを加えた形で CMV プロモーター系のプラスミドにサブクローニングを行った。完成したプラスミドのシークエンシングを行ってその配列を確認し、ゲノム DNA および mRNA のダイレクトシークエンスの結果と異なる部位については修正を加えて、狂犬病ウイルスのリバースジェネティクスに用いる基本ベクターの構築を完了した。次に、フルゲノムプラスミド中のゲノムの G 遺伝子部位および偽遺伝子部位を削除し、削除部位にマルチクローニングサイトを組み込んだベクタープラスミドを作製した。また、N-P 遺伝子間に発現制御配列およびマルチクローニングサイトを組み込んだ高発現タイプのベクタープラスミドの作製も完了した。この結果を受け、ベクターとして利用できるようウイルスゲノム cDNA から感染性ウイルス粒子を得る cDNA 発現系を構築し、研究代表者らが開発した新規回収法により、改変プラスミドから組み替えウイルスが効率的に得られることを確認した。この成果により、狂犬病ウイルスゲノムに GFP や RFP 遺伝子等のマーカータンパク質を組み込んだ越シナプスの神経トレーサーベクターを作製することができ、異なる領域に別々のベクターを注入することにより、大脳皮質-大脳基底核ループの構築様式（特に各ループ間のインタラクションの程度）についてより直接的な検討が行えるようになった。

本研究の成果により、大脳皮質-大脳基底核ループ回路における回路間での相互作用様式の一部が解明され、大脳皮質-大脳基底核連関の構造基盤に関する重要な知見が得られた。また、本研究で開発された新規狂犬病ウイルスベクターによる逆行性越シナプストレーシング手法は、狂犬病ウイルスを用いた従来の逆行性越シナプスラベル法の利点を活かしつつ、より詳細なトレーシングを実現できるという点で、高次脳機能の基盤となる大脳皮質のネットワーク構築を解明する上でも必須の手法になると考える。

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 4 件）

① Inoue K, Hashimoto M, Takahara D,

Hirata Y, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Hoshi E, Motor and nonmotor projections from the cerebellum to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor cortex in macaques. *European Journal of Neuroscience*, 査読有, Vol.31, 2010, pp. 1402-1413

- ② Ohara S, Inoue K, Witter MP, Iijima T. Untangling neural networks with dual retrograde transsynaptic viral infection. *Frontiers in Neuroscience*, 査読有, Vol. 3, No. 3, 2009, pp. 344-349
- ③ Ohara S, Inoue K, Yamada M, Yamawaki T, Koganezawa N, Tsutsui K, Witter MP, Iijima T. Dual transneuronal tracing in the rat entorhinal-hippocampal circuit by intracerebral injection of recombinant rabies virus vectors. *Frontiers in Neuroanatomy*, 査読有, Vol. 3, 2009, pp. 1-11

[学会発表] (計 14 件)

- ① Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M. Their hierarchic ranks and converging geniculate inputs from magno- and parvocellular layers. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2009.10.19, Chicago
- ② 井上謙一、宮地重弘、西 克典、岡戸晴生、南部 篤、高田昌彦、ウイルスベクターを用いた黒質ドーパミン細胞へのカルビンディン遺伝子導入によるパーキンソン病の進行抑制、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.18、名古屋
- ③ 二宮太平、澤村裕正、井上謙一、高田昌彦、LGN から V4、MT への多シナプス性入力様式、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.18、名古屋
- ④ 平田快洋、井上謙一、高原大輔、二宮太平、宮地重弘、丹治順、高田昌彦、星 英司、背側運動前野肩領域への前頭葉入力様式、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.18、名古屋
- ⑤ 山脇琢磨、大原慎也、井上謙一、山田真広、筒井健一郎、Menno P. Witter、飯島敏夫、改変狂犬病ウイルスベクターによるラット海馬-嗅内皮質神経回路の二重標識、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.17、名古屋
- ⑥ 星 英司、佐賀洋介、高原大輔、平田快洋、井上謙一、宮地重弘、丹治順、高田昌彦、淡蒼球内節から大脳皮質背側運

動前野への入力様式、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.17、名古屋

- ⑦ 橋本雅史、高原大輔、平田快洋、井上謙一、宮地重弘、丹治順、高田昌彦、星 英司、小脳から大脳皮質背側運動前野への入力様式、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.17、名古屋
- ⑧ Takada M, Inoue K, Miyachi S, Nishi K, Okado H, Nambu A. Prevention of MPTP-induced parkinsonism by calbindin recruitment into nigral dopaminergic cells. 9th International Conference ADPD (Alzheimer's and Parkinson's diseases), 2009.3.14, Prague
- ⑨ Inoue K, Kato S, Kobayashi K, Yasoshima Y, Miyachi S, Inoue S, Hanawa H, Shimada T, Kobayashi K, Takada M. Efficient retrograde gene transfer into primate brain with an HIV-1-based lentiviral vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein, 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2008.11.16, Washington, D. C.
- ⑩ Kato S, Inoue K, Kobayashi K, Yasoshima Y, Miyachi S, Inoue S, Hanawa H, Shimada T, Takada M, Kobayashi K. Efficient gene transfer system through retrograde axonal transport with a human immunodeficiency virus type 1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2008.11.16, Washington, D. C.
- ⑪ 山崎吉之、井上謙一、仁平友子、遠藤 歩、島田 隆、望月秀樹、水野美邦、高田昌彦、アルファシヌクレイン過剰発現によるパーキンソン病モデルザルの開発とパーキンソン遺伝子導入によるパーキンソン病の抑制、第 31 回日本神経科学大会、2008.7.10、東京
- ⑫ 高原大輔、星 英司、宮地重弘、井上謙一、南部 篤、高田昌彦、前頭前野腹側部から運動前野背側部への経シナプス投射、第 31 回日本神経科学大会、2008.7.9、東京
- ⑬ 井上謙一、加藤成樹、小林憲太、宮地重弘、島田 隆、小林和人、高田昌彦、霊長類神経系における改変シュードタイプウイルスベクターを用いた逆行性遺伝子導入法、第 31 回日本神経科学大会、

2008.7.9、東京

- ⑭ 加藤成樹、井上謙一、小林憲太、八十島安伸、宮地重弘、井上 智、埜 秀樹、島田 隆、高田昌彦、小林和人、新規逆行輸送組換え体レンチウイルスベクターの開発、第31回日本神経科学大会、2008.7.9、東京

[図書] (計 4 件)

- ① 高田昌彦、井上謙一、宮地重弘、狂犬病ウイルスによる多シナプス性神経路の解析法. 医学書院、Brain and Nerve, 62:3, 「特集 神経回路解析法の最近の進歩」, 2010, 3. 221-230.
- ② 高田昌彦、井上謙一、高次脳機能の解明と精神・神経疾患の克服のためのサルモデル. 医学書院、生体の科学, 61:1, 「特集 脳科学のモデル実験動物」、2010, 1. 6. 53-58.
- ③ Takada M, Inoue K, Miyachi S, Okado H, Nambu A. Prevention of calbindin recruitment into nigral dopamine neurons from MPTP-induced degeneration in *Macaca fascicularis*. Springer, The Basal Ganglia IX, 2009, 9. 377-386.
- ④ 高田昌彦、井上謙一、サル類モデル. アドスリー、老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック, 日本基礎老化学会編, 2008, 10. 78-87.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上謙一 (INOUE KEN-ICHI)
京都大学・霊長類研究所・特定助教
研究者番号：90455395