

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ~ 2009
 課題番号：20700315
 研究課題名 (和文) レンチウイルスベクターによる視床一大脳新皮質相互結合の定量的解析
 研究課題名 (英文) Quantitative analysis of reciprocal connection between the thalamus
 and neocortex by using lentiviral vectors

研究代表者
 日置 寛之 (HIOKI HIROYUKI)
 京都大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：00402850

研究成果の概要 (和文)：

レンチウイルスは長期発現が可能であるという利点はあるものの、目的遺伝子の発現量が他のウイルスベクターよりも弱いという欠点があった。そこで、神経細胞特異的かつ高発現を可能にするレンチウイルスの開発を進めた。神経細胞特異的プロモーター (SYN プロモーターなど) の制御下で GFP を発現させた場合、ウイルス注入から一週間程度では GFP の蛍光輝度は非常に弱く、GFP の発現を検出するには免疫染色法が必須となる。そこで、SYN プロモーター下でテトラサイクリン調節性トランス活性化因子 (tTA: Tet-Off) を神経細胞特異的に発現するウイルス、Tet 応答性プロモーター下で GFP を発現するウイルスを二重感染させるシステムを開発した (Double Lentiviral Vector Tet-Off Platform)。神経細胞特異的に発現した tTA は TRE プロモーターを活性化し、その結果 GFP の蛍光輝度は 40 倍程度まで増大した。8 週間に渡って GFP の発現を観察したが、神経細胞特異性に変化はなく、また細胞傷害性も認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：

We developed novel lentiviral vectors by using “Tet-Off system” and succeeded in achieving high-level and neuron-specific gene transduction in vivo. One week after viral injection into the rat neostriatum, the GFP expression was almost completely neuron-specific and about 40 times higher than the expression of a conventional lentiviral vector. High transcriptional activity and neuronal specificity were sustained for up to 8 weeks. Furthermore, neuronal processes of the infected neurons were efficiently visualized by adding a plasma membrane-targeting signal to GFP. These results suggest that the present method is valuable for strong gene transduction and clear visualization of neurons in vivo.

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：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路網

1. 研究開始当初の背景

神経回路網の解析は各種神経回路標識法の開発と共に 1970 年代頃より急速に進展していった。しかし従来の神経回路標識法 (BDA 等) では、非選択的に複数の神経細胞が標識されてしまう為、領域から領域への投射を解析 (region to region analysis) することには適していたが、個々の神経細胞が構成する精緻な局所神経回路を解析 (neuron to neuron analysis) することは困難であった。

また近年、遺伝子工学的手法により、経シナプストレーサータンパクである TTC や WGA、そして狂犬病ウイルス等が神経回路網の解析に使用されるようになった (Yoshihara et al., 1999; Kinoshita et al., 2002; Maskos et al., 2002; Miyachi et al., 2005)。その多くは、神経細胞集団レベルでの入出力特性を解析するものであったが、単一神経細胞レベルでの結合様式を明らかにしようとする試みも報告されている (遺伝子改変狂犬病ウイルス; Wickersham et al., 2007a, 2007b)。この新たな試みは、スライス標本を作成後、微小ガラス電極にて単一神経細胞に核酸を導入し、その核酸導入細胞のみで増殖可能な遺伝子改変狂犬病ウイルスを利用するものである。これにより、単一神経細胞に入力する神経細胞が可視化されるが、幾つかの問題点が指摘されている。特に問題となり得るのは、マーカータンパク発現選択性 (感染はしてもマーカータンパクを発現しない; Kasparov, 2007)・細胞毒性 (毒性は低いものの、感染から一週間程度で膜電位が上昇する等; personal communication) である。

本研究課題で用いる経シナプストレーサータンパク (WGA・TTC) であり、上に挙げた発現選択性・細胞毒性といった問題は生じ得ないと考えられる。細胞毒性が無いことから、他分野 (生理学・薬理学・行動学的解析等) との融合も視野に入れながら研究を進める。また、本研究課題では成体ラットを利用するので、解析対象範囲がスライスの厚みに限定されるという問題も回避できると考えられる。

2. 研究の目的

中枢神経系は外界から絶えず様々な刺激入力を受けながら、認知・思考・記憶・感情といった高次機能を実現している。外界からの刺激は元来予測不能なものであり、そのような非平衡開放系に置かれた中枢神経系が、どのような戦略 (情報処理システム) を採用しているかについては謎のままである。高次機能を実現する素子・構成単位として、神経細胞を想定することは妥当であろう。しかし

神経細胞一つ当たりの情報処理速度は高々 1KHz 程度であることから、神経細胞から構成されるネットワークにこそ、高次機能を生み出す原理があると考えられる。高次機能を実現する場として、大脳新皮質が一番重要であることは多くの研究者の意見が一致する所であるが、視床の重要性も再認識され始めている。視床は皮質下からの情報を中継するだけの部位と考えられることが多いが、視床の活動性は覚醒状態・個体が置かれた環境によって変化し (McCormic et al., 1997; Steriade et al., 2000)、大脳新皮質からのフィードバック入力を介すことで、視床の活動が各種感覚情報の統合・個体の行動発現に関与しているとの研究報告もある (Jones, 2002; Alitto and Usrey, 2003; Temereanca and Simons, 2004)。そこで申請者らは視床皮質相互結合のうち、まずは視床皮質投射の包括的理解を目指し (領野・層構造への入力特性解析)、遺伝子改変シンドビスウイルスを用いて、単一視床神経細胞の投射様式について解析を進めてきた (Fig.1; 運動系視床の投射様式; 研究業績 2)。このシンドビスウイルスを用いる方法は、単一神経細胞の投射様式を解析するツールとしては非常に有用であるが (研究業績 2, 6)、出力先の神経細胞種・数が解析出来ないという欠点があった。そこで本研究課題では、経シナプス順行性・逆行性トレーサータンパクを発現するレンチウイルスを開発・利用し、視床皮質神経回路におけるシナプス結合特性を単一神経細胞レベルで解析することを目的とする。

3. 研究の方法

当研究課題では、経シナプス順行性・逆行性トレーサータンパクを発現するレンチウイルスベクターの開発を行い、視床皮質相互結合のうち視床皮質投射にまずは注目し、そのシナプス結合特性を単一神経細胞レベルで解析することを目的としている。レンチウイルスベクターは長期発現が可能という利点はあるものの、発現量が他のウイルスベクターに比べて低いという欠点があった。そこで、神経細胞特異的かつ高発現型レンチウイルスベクターの開発に着手した。

4. 研究成果

本研究で用いるレンチウイルスは HIV-I 由来であるが、長期発現が可能という利点はあるものの、発現量が他のウイルスベクターに比べて低いという欠点があった。そこで、神経細胞特異的かつ高発現型レンチウイルスの開発を行った (Fig. 4; 研究業績 5, 13)。神経細胞特異的プロモーター (SYN プロモータ

一) の制御下で GFP を発現させた場合、ウイルス注入から一週間程度では GFP の蛍光輝度は非常に弱く、免疫染色法が必須となる (Fig. 4A, C-D)。一方、SYN プロモーター下でテトラサイクリン調節性トランス活性化因子 (tTA: Tet-Off) を神経細胞特異的に発現させ、Tet 応答性プロモーター (TRE) 下で GFP を発現させると、その蛍光輝度は 40 倍程度まで増大した (Fig. 4B, E-F)。8 週間に渡って GFP の発現を観察したが、神経細胞特異性に変化はなく、また細胞傷害性も認められなかった。よって本研究課題のように、目的遺伝子 (GFP-TTC や WGA) の強発現を必要とする実験系には、有用なツールであると言える。

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 11 件)

[1]

Ge S-N, Ma Y-F, Hioki H, Wei Y-Y, Kaneko T, Mizuno N, Li J-L, Gao G-D. Co-expression of VGLUT1 and VGLUT2 in trigeminothalamic projection neurons in the principal sensory trigeminal nucleus. *J Comp Neurol.* in press. 査読有

[2]

Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Yasuyo, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S. (2010) Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nature Neuroscience* 13(2):173-179. 査読有

[3]

Hioki H, Nakamura H, Ma Y-F, Konno M, Hayakawa T, Nakamura KC, Fujiyama F, Kaneko T. (2010) Vesicular Glutamate Transporter 3-Expressing Nonserotonergic Projection Neurons Constitute a Subregion in the Rat Midbrain Raphe Nuclei. *J Comp Neurol.* 518(5):668-686. 査読有

[4]

Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hioki H, Kaneko T. (2009) Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: a single neuron tracing study using viral vectors. *Cereb Cortex.* 9(9):2065-2077. 査読有

[5]

Fujiyama T, Yamada M, Terao M, Terashima T, Hioki H, Inoue YU, Inoue T, Masuyama N, Obata K, Yanagawa Y, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, *Hoshino M. (2009) Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, *Ptfla* and *Atohl*. *Development.* 136(12):2049-2058. 査読有

[6]

Nakamura KC, Fujiyama F, Furuta T, Hioki H, Kaneko T. (2009) Afferent islands are larger than μ -opioid receptor patch in striatum of rat pups. *NeuroReport.* 20(6):584-588. 査読有

[7]

Hioki H, Kuramoto E, Konno M, Kameda H, Takahashi Y, Nakano T, Nakamura KC, Kaneko T. (2009) High-level transgene expression in neurons by lentivirus with Tet-Off system. *Neurosci Res.* 63(2):149-154. 査読有

[8]

Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. (2009) Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci.* 29(2):444-453. 査読有

[9]

Koshimizu Y, Wu S-X, Unzai T, Hioki H, Sonomura T, Nakamura KC, Fujiyama F, Kaneko T. (2008) Paucity of enkephalin production in neostriatal striosomal neurons: analysis with preproenkephalin/green fluorescent protein transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 28(10):2053-2064. 査読有

[10]

Nishino E, Yamada R, Kuba H, Hioki H, Furuta T, Kaneko T, Ohmori H. (2008) Sound-intensity-dependent compensation for the small interaural time difference cue for sound source localization. *J Neurosci.* 28(28):7153-7164. 査読有

[11]

Kameda H, Furuta T, Matsuda W, Ohira K, Nakamura K, Hioki H, Kaneko T. (2008) Targeting green fluorescent protein to dendritic membrane in central neurons. *Neurosci Res.* 61(1):79-91. 査読有

〔学会発表〕(計 30 件)

【1】

亀田浩司, 且置寛之, 田中康代, 田中琢真、
菌村貴弘, 藤山文乃, 中村公一, 金子武嗣
パルブアルブミン発現皮質神経細胞への抑制
性入力は細胞体周辺部に多い
第 115 回日本解剖学会
2010 年 3 月 29 日 盛岡

【2】

大野幸, 倉本恵梨子, 古田貴寛, 且置寛之,
椛山加綱, 金子武嗣
組換えウイルストレーサーによる単一細胞
標識法を用いて、ラットの視床後核群ニュー
ロンの軸索分岐を解析する
第 115 回日本解剖学会
2010 年 3 月 29 日 盛岡

【3】

中村悠, 且置寛之, 中村公一, 古田貴寛, 金
子武嗣
後外側核ニューロンの視床皮質投射: ウイル
スベクターを用いた単一ニューロンの形態
学的解析
第 115 回日本解剖学会
2010 年 3 月 29 日 盛岡

【4】

且置寛之, 中村悠, 馬雲飛, 今野美知輝,
早川隆, 中村公一, 藤山文乃, 金子武嗣
VGLUT3 発現・非セロトニン作動性神経細胞は
投射型ニューロンであり、ラット背側縫線核
において垂核を構成する
第 115 回日本解剖学会
2010 年 3 月 29 日 盛岡

【5】

倉本恵梨子, 藤山文乃, 古田貴寛, 雲財知,
且置寛之, 金子武嗣
ラット視床内側腹側核ニューロンの軸索投
射を単一ニューロンレベルで解析する
2010 年 3 月 28 日 盛岡

【6】

Kameda H, Hioki H, Tanaka Yasuyo, Tanaka
T, Sonomura T, Fujiyama F, Nakamura KC,
Kaneko T.
Parvalbumin-expressing cortical
interneurons receive GABAergic inputs
preferentially on the proximal dendrites.
The 56th NIBB Conference “Neocortical
Organization”
2010 年 3 月 13 日 岡崎

【7】

Okamoto S, Hioki H, Konno M, Kameda H,
Kaneko T.

Efficient visualization of central
neurons with lentiviral vectors
expressing red fluorescent protein.
The 56th NIBB Conference “Neocortical
Organization”
2010 年 3 月 13 日 岡崎

【8】

Konno M, Hioki H, Nakamura KC, Kaneko T.
Search for molecular markers of layer VI
corticothalamic neurons in the rat
neocortex.
The 56th NIBB Conference “Neocortical
Organization”
2010 年 3 月 13 日 岡崎

【9】

且置寛之
ラット中枢神経系 神経回路網の解析: ウイ
ルスベクター・遺伝子改変動物を用いて
第 3 回ラットリソースリサーチ研究会
2010 年 1 月 29 日 京都

【10】

倉本恵梨子, 藤山文乃, 中村公一, 且置寛之,
金子武嗣
ラット運動性視床核における大脳基底核お
よび小脳核からの軸索終末の相補的分布
第 85 回日本解剖学会 近畿支部学術集会
2009 年 11 月 28 日 奈良

【11】

篠原亮太, 上條博史, 且置寛之, 金子武嗣,
石崎敏理, 古屋敷智之, 成宮周
神経発生における Rho 標的分子 mDia の役割
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 16 日 名古屋

【12】

倉本恵梨子, 藤山文乃, 且置寛之, 金子武嗣
ラット運動性視床核における大脳基底核お
よび小脳核からの軸索終末の分布
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 16 日 名古屋

【13】

今野美知輝, 且置寛之, 中村公一, 金子武嗣
ラット大脳皮質第 VI 層の皮質一視床投射細
胞に対する特異的マーカーを探索する
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 16 日 名古屋

【14】

亀田浩司, 菌村貴弘, 田中康代, 中村公一,
藤山文乃, 且置寛之, 金子武嗣
BAC 遺伝子改変マウスを用いた、パルブアル
ブミン発現皮質神経細胞への興奮性・抑制性

入力の定量的解析
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 16 日 名古屋

【15】

岡本慎一郎、日置寛之、今野美知輝、亀田浩司、金子武嗣
RFP 発現レンチウイルスによる中枢神経細胞の可視化
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 16 日 名古屋

【16】

日置寛之、岡本慎一郎、今野美知輝、亀田浩司、倉本恵梨子、金子武嗣
Tet-Off システム搭載レンチウイルスによる、神経細胞特異的共発現ベクターの開発
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 16 日 名古屋

【17】

大平耕司、古田貴寛、日置寛之、中村公一、倉本恵梨子、船津宣雄、清水慶子、大石高生、林基治、宮川剛、金子武嗣、中村俊
成熟期大脳皮質に存在する神経前駆細胞
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 17 日 名古屋

【18】

馬雲飛、日置寛之、中村公一、中村悠、潘世秀、古田貴寛、金子武嗣
ラット体性感覚野における connexin36 発現神経細胞の化学的解析
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 17 日 名古屋

【19】

田中康裕、田中康代、今野美知輝、藤山文乃、岡本一古田敬子、菌村貴弘、亀田浩司、日置寛之、古田貴寛、中村公一、金子武嗣
大脳皮質興奮性細胞から皮質視床投射細胞への皮質内入力の定量
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 17 日 名古屋

【20】

松田和郎、古田貴寛、中村公一、日置寛之、藤山文乃、安原治、金子武嗣
中脳辺縁皮質系ドパミン細胞の投射様式を解析する
第 32 回日本神経科学学会
2009 年 9 月 17 日 名古屋

【21】

亀田浩司、日置寛之、中村公一、金子武嗣
BAC 遺伝子改変マウスを用いた、パルブアル

ブミン発現皮質神経細胞への興奮性・抑制性入力の定量的解析
第 114 回日本解剖学会
2009 年 3 月 30 日 岡山

【22】

日置寛之、倉本恵梨子、今野美知輝、亀田浩司、高橋康尋、仲野孝史、中村公一、金子武嗣
Tet-Off システムを介した、神経細胞特異的かつ高発現型レンチウイルスの開発
第 114 回日本解剖学会
2009 年 3 月 30 日 岡山

【23】

倉本恵梨子、古田貴寛、中村公一、雲財知、日置寛之、金子武嗣
ラット視床から大脳新皮質運動関連領野への二種類の投射様式：ウイルスベクターを用いた単一ニューロンレベルでの解析
第 84 回日本解剖学会 近畿支部学術集会
2008 年 11 月 19 日 大阪

【24】

大平耕司、古田貴寛、日置寛之、中村公一、金子武嗣
Truncated TrkB-T1 による樹状突起形成の制御
第 31 回日本神経科学学会
2008 年 7 月 9 日 東京

【25】

日置寛之、倉本恵梨子、今野美知輝、亀田浩司、金子武嗣
Tet-Off システムを介した、神経細胞特異的かつ高発現型レンチウイルスの開発
第 31 回日本神経科学学会
2008 年 7 月 9 日 東京

【26】

倉本恵梨子、古田貴寛、中村公一、日置寛之、雲財知、金子武嗣
ラット視床から大脳皮質・運動関連領野への投射様式を単一ニューロンレベルで解析する
第 31 回日本神経科学学会
2008 年 7 月 10 日 東京

【27】

中村悠、日置寛之、中村公一、古田貴寛、金子武嗣
大脳皮質視覚野における単一視床ニューロンの軸索分枝
第 31 回日本神経科学学会
2008 年 7 月 10 日 東京

【28】

松田和郎、古田貴寛、中村公一、日置寛之、
藤山文乃、新井良八、金子武嗣
中脳辺縁系および中脳皮質系ドーパミン神
経細胞の投射様式を解析する
第 31 回日本神経科学学会
2008 年 7 月 11 日 東京

【29】

今野美知輝、日置寛之、古田貴寛、中村公一、
三橋賢大、金子武嗣
神経細胞に逆行性感染する Sindbis ウイルス
の開発
第 31 回日本神経科学学会
2008 年 7 月 11 日 東京

【30】

田中康裕、田中康代、古田貴寛、日置寛之、
亀田浩司、金子武嗣
高効率ゴルジ染色様標識による大脳皮質視
床投射神経細胞の可視化：樹状突起移行性
GFP を発現するアデノウイルスを用いた逆行
性標識
第 31 回日本神経科学学会
2008 年 7 月 11 日 東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mbs.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日置 寛之 (HIOKI HIROYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00402850