

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650169

研究課題名(和文) 神経回路研究のための新しい性質を持つ逆行性レンチウイルスベクターの開発

研究課題名(英文) Development of a novel lentiviral vector system for the research of specific neural circuit labeling through retrograde axonal transport.

研究代表者

加藤 成樹 (Kato, Shigeki)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90443879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：逆行性レンチウイルスベクターは、神経終末から軸索を逆行性に輸送し、細胞体において遺伝子導入を可能とすることから、特定の神経回路機能を選択的に制御するためのツールとして、極めて重要な役割を果たす。狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG)およびRVGと水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSVG)の一部から構成される融合型糖タンパク質を遺伝子組み換えにより複数作製し、これらの性状比較を行うことで、RVG/VSVGの境界位置が最適化された新しいタイプの融合型糖タンパク質を取得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We produced various types of fusion glycoproteins, in which the junction between the RVG and VSVG glycoprotein segments diverged in the membrane-proximal region of RVG, and generated HIV-1-based lentiviral vectors pseudotyped with these fusion glycoproteins. We then tested the efficiency of the pseudotyped vectors for the in vivo gene transfer through retrograde transport, comparing that of the NeuRet vector with FuG-C. We found a novel type of fusion glycoprotein, termed type E (FuG-E), that showed improved efficiency of retrograde gene transfer while retaining the property of neuron-specific transduction. This NeuRet vector with FuG-E will provide a powerful tool for genetic treatment of neurological and neurodegenerative diseases and for the study of neural circuit mechanisms underlying various brain functions.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：逆行性レンチウイルスベクター エンベロープ 神経回路

1. 研究開始当初の背景

我々のグループでは、レンチウイルス外被を構成する糖タンパク質であるエンベロープの構造を、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG)およびRVGと水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSVG)の一部から構成される融合型糖タンパク質(FuG-C)を開発した。また FuG-C 型エンベロープにシュード化することでニューロン特異的逆行性遺伝子導入 (Neuron-specific retrograde gene transfer; NeuRet)ベクターを取得した。これらの結果を得る過程で、エンベロープのアミノ酸配列改変により逆行性遺伝子導入に与える性質の変化が多様であることから、その構造改変を行うことでさらに高頻度な遺伝子導入能を示すタイプの新しいエンベロープを獲得できる可能性が示唆されていた。

そこで本研究課題として、融合型糖タンパク質における RVG/VSVG の境界位置の最適化のため、その境界位置をずらした様々なタイプの融合型糖タンパク質を遺伝子組み換えにより作製し、それらの性状比較を行うことで RVG/VSVG 境界位置が最適化された新しいタイプの融合型糖タンパク質の作製を計画した。

2. 研究の目的

脳機能の解明には、神経回路を構成する様々なニューロンや神経路がどのような役割を持つかを知る必要がある。逆行性レンチウイルスベクターは、神経終末より取り込まれ軸索を逆行性に遺伝子輸送して、遠方の神経細胞体において導入遺伝子の発現を誘導し、数ある神経回路の中から標的とする特定の神経回路にのみ遺伝子標識することを可能とする。また、遺伝子に合わせた誘導因子によって、標識した神経回路の機能を制御する技術への応用も報告されている。このことから、逆行性遺伝子導入効率を高めることは、高次脳機能の基盤となる神経回路研究の進展に大きく寄与することが見込まれ、本研究課題としてそのための新たなベクター開発を計画した。

さらには、新規のベクター開発がパーキンソン病やハンチントン病などの神経変性疾患に対する新たな遺伝子治療への足がかりとして、臨床・基礎研究の両面からの多角的アプローチへの発展に取り組む。

3. 研究の方法

(1) <平成 24 年度>

我々の開発した融合型糖タンパク質である FuG-C 型エンベロープの構造を基点とし、RVG/VSVG の境界位置の最適化のため、その境界位置を前後に 3 アミノ酸および 1 アミノ酸ずつずらした様々なタイプの融合型糖タンパク質を遺伝子組み換えにより作製した(図 1)。次に、これらのエンベロープタンパク質にシュード化したウイルスベク

ターを作製し、それぞれについて各種培養細胞への感染実験、定量 RT-PCR によるウイルスパーティクル数の測定などの *in vitro* 実験を行う。



図 1. RVG/VSVG の境界位置を変えた様々なタイプの融合型糖タンパク質の構造とアミノ酸配列

(2) <平成 25 年度>

24 年度の *in vitro* 解析の結果を元に、ウイルスパーティクルが形成されなかったものを除いて、それぞれのエンベロープタンパク質にシュード化したウイルスベクター (2.0×10^{11} copies/ml) を作製し、マウス線条体に注入する ($1.0 \mu\text{l} \times 4$ sites/hemisphere)。4 週間後、線条体に投射する神経核の 1 つである視床束傍核へ逆行性遺伝子導入された神経細胞を免疫組織化学的手法により染色することで陽性細胞数をカウントし、遺伝子導入の頻度を解析してより高い効率で遺伝子発現を誘導するタイプの融合型糖タンパク質を選抜する。

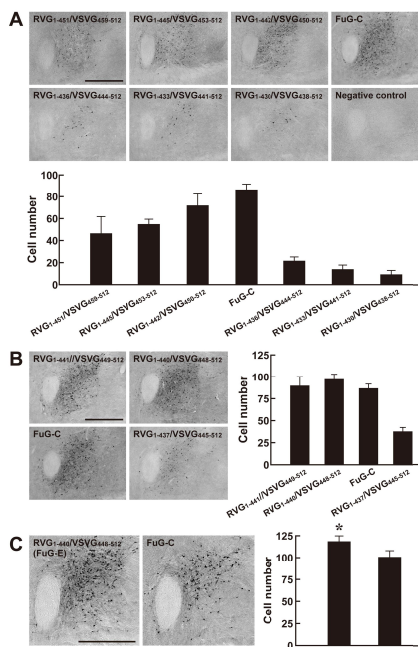


図 2. 様々なタイプの融合型糖タンパク質にシュード化したベクターによるマウス脳組織への逆行性遺伝子導入

4. 研究成果

図1に示した融合型糖タンパク質にシュード化したベクターを作製し、まずはFuG-C型の構造を基点として、RVG/VSVG境界位置を前後に3アミノ酸ずつずらしたタイプのベクターにおける比較検討を行った。その結果、RVG/VSVGの境界位置がFuG-C型糖タンパク質の位置、またはその前後にもっとも高頻度遺伝子導入を示す融合型糖タンパク質が存在することを見出した(図2A)。次に、FuG-C型の構造を基点とし、RVG/VSVG境界位置を前後に1アミノ酸ずつずらしたタイプの融合型糖タンパク質にシュード化したベクターを作製して、上記と同様に陽性細胞数をカウントしたところ、FuG-C型に対してVSVG配列が1アミノ酸長い(RVG配列が1アミノ酸短い)タイプの融合型糖タンパク質(RVG₁₋₄₄₀/VSVG₄₄₈₋₅₁₂; FuG-E型)がもっとも高い遺伝子導入を示すことを明らかにした(図2B)。この結果を元に、FuG-EおよびFuG-C型の両ベクターにおける統計解析を行ったところ、FuG-Eベクターが有意に高い遺伝子導入能を持つことを示唆した(図2C)。

また、視床-線条体神経路だけでなく他の神経路への逆行性遺伝子導入を調べるため、線条体に投射する皮質1次運動野(M1)および皮質体性感覚野(S1)領域を免疫組織化学的手法により染色して陽性細胞をカウントした。この解析結果から、M1、S1の両領域において、陽性細胞数はFuG-E型ベクターがFuG-C型ベクターに対して有意に高いことが示された(図3A, B)。

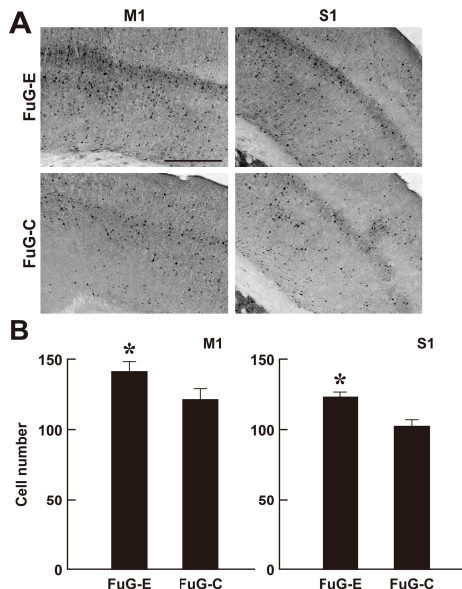


図3. FuG-E型ベクターにおける皮質-線条体神経路への逆行性遺伝子導入

以上の結果から、RVG/VSVG境界位置が最適化されたタイプの融合型糖タンパク質(FuG-E)を作製することに成功した。今後は、FuG-E型ベクターを用いて、様々な特定神経核間を遺伝子標識し、これまでの遺伝子

操作技術を組み合わせることを予定している。具体的には、選択的な神経路のターゲティング、神経伝達抑制系、さらには光遺伝学との組み合わせでは神経活動の制御にも応用が可能である。Cre/loxPやTet-On/Offシステムを用いることで特定神経路選択的に目的の遺伝子機能を改変させるストラテジーへの発展も見込まれる。これらの技術を通じて、特定の神経回路がどのような行動制御に関与するかを明らかにし、またその機能制御を可能とすることで、高次脳機能の基盤となる神経回路研究へのアプローチに貢献したい。

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)

Kato, S., Kobayashi, K., and Kobayashi, K. Improved transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene transfer by optimizing the junction of fusion envelope glycoprotein. *J Neurosci. Methods* 227: 151-158 (2014). 査読有り

Sooksawate, T., Isa, K., Matsui, R., Kato, S., Kinoshita, M., Kobayashi, K., Watanabe, D., Kobayashi, K., and Isa, T. Viral vector-mediated selective and reversible blockade of the pathway for visual orienting in mice. *Front. Neural Circuits* 7: 162 (2013). 査読有り

Hirano, M., Kato, S., Kobayashi, K., Okada, T., Yaginuma, H., and Kobayashi, K. Highly efficient retrograde gene transfer into motor neurons by a lentiviral vector pseudotyped with fusion glycoprotein. *PLoS ONE* 8(9): e75896 (2013). 査読有り

Takada, M., Inoue, K., Koketsu, D., Kato, S., Kobayashi, K., and Nambu, A. Elucidating information processing in primate basal ganglia circuitry: a novel technique for pathway-selective ablation mediated by immunotoxin. *Front. Neural Circuits* 7: 140 (2013). 査読有り

[学会発表](計4件)

加藤 成樹, 菅原 正晃, 小林 和人 高頻度逆行性ベクターによる大脳-小脳-基底核ネットワークへの遺伝子導入 平成25年度領域ミーティング(CREST)/2014年3月2日/東京・JST東京本部別館1階ホール

加藤 成樹, 深堀良二, 小林 和人 刺激弁別学習における2種類の主要な視床線条体路の行動生理学的役割

第 36 回日本分子生物学会/2013 年 12 月 5 日/神戸・神戸ポートアイランド

Shigeki KATO, Ryoji FUKABORI, Kenta Kobayashi, Hiromu Yawo, Yoshikazu Isomura and Kazuto KOBAYASHI

Functional control of specific neural pathways in basal ganglia circuit by HiRet.

Neuroscience 2013/2013 年 11 月 9 日 /SanDiego, CA, USA・San Diego Convention Center

Shigeki KATO, Ryoji FUKABORI and Kazuto KOBAYASHI

Comparative analysis for behavioral roles of the central lateral and parafascicular nuclear groups projecting to the dorsolateral striatum.

第 36 回日本神経科学大会/2013 年 6 月 21 日/京都・京都国際会館

〔図書〕(計 1 件)

Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Takada, M., and Kobayashi, K.

Croatia: In Tech

Gene Therapy (Francisco Martin Molina, ed) (2013)

pp389-398

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 成樹 (KATO SHIGEKI)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 90443879

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :