

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20694

研究課題名（和文）CTニューロンの全シナプス入力可視化による皮質-視床ループ回路構造の解明

研究課題名（英文）Analysis of thalamo-cortical loop circuit via the visualization of all synaptic inputs to CT-neurons in L6

研究代表者

岡本 慎一郎 (Okamoto, Shinichiro)

順天堂大学・健康総合科学先端研究機構・特任助教

研究者番号：70746940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：皮質6層の神経細胞を効率的に標識するため、AAVベクターのセロタイプによる感染特異性の違いについて調査した。その結果、どのセロタイプにおいても感染特異性の問題を排除することは困難であることが判明した。代替の標識法として、細胞に直接色素（Lucifer Yellow）を注入する手法を開発し、樹状突起の明瞭な可視化に成功した。

また、細胞膜に局在する蛋白の検出に優れたGlyoxal固定と透明化法を併用する手法の開発もおこなった。ScaleSF法を用いてGlyoxal固定サンプルを透明化することに成功した。

これらの手法を開発したことによって、効率的なシナプス入力解析が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、任意の神経細胞の樹状突起を効率的に可視化するLucifer Yellow注入法、細胞膜に局在する蛋白の検出に優れたGlyoxal固定サンプルを透明化する方法の開発をおこなった。これらの手法を組み合わせることにより、標識する細胞数のコントロールが難しく多数のマウスが必要となるウイルスベクター注入法に比べて、より効率良く樹状突起のシナプス入力を解析することが可能となった。

本研究成果は、神経細胞が構築するネットワーク解析におけるコストの削減だけでなく、実験に必要となる動物数の減少といった動物倫理の面においても貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：To efficiently label CT-neurons in cortical layer 6 (L6), the differences in infection specificity among the serotypes of AAV vectors were investigated. The results showed that it is difficult to efficiently label only L6 neurons with any serotypes. As an alternative labeling method, a technique to directly inject the dye (Lucifer Yellow) into cells was developed, achieving clear visualization of dendrites.

Additionally, a method combining glyoxal fixation, which excels at detecting membrane-localized proteins, with tissue clearing was developed. Using the ScaleSF method, glyoxal-fixed samples were successfully cleared.

These methods have enabled us to efficiently analyze synaptic inputs.

研究分野：神経解剖学

キーワード：細胞標識法 Glyoxal固定法 透明化法 神経回路解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は6層からなり、各層は特徴的な入出力様式を示すことが知られている。例えば、皮質の最も深い部分に位置する6層(L6)は、視床からの入力を受け取ると同時に、視床へと出力も行っている(Deschênes et al., Brain Res Rev, 28:286-308, 1998)。この皮質-視床間のループ回路は、皮質と視床の活動状態を同期させる機能を持ち、覚醒状態を決定づけるUp/Down stateを生み出している(McCormick et al., Curr Opin Neurobiol, 31:133-140, 2014)。また、このループ回路によってニューロンの異常な発火活動が増幅されることでてんかん症状が引き起こされること(Avoli and Gloor, Exp Neurol, 76:196-217, 1982; Vergnes et al., Brain Res, 523:87-91, 1990)なども報告されており、皮質-視床ループの回路構造を解明することは、高次脳機能の動作原理の理解へ繋がると期待される。

最近になって、皮質-視床ループを構成する皮質-視床投射(CT)ニューロンが、皮質パルブアルブミン(PV)ニューロンを好んで情報を伝達していることが報告された(Kuramoto et al., eNeuro, 9:ENEURO.0567-20.2021, 2022)。PVニューロンは皮質の抑制性神経細胞の一種であり、高次機能の発現や精神疾患とも深い関連があることが知られている(Lewis et al., Trends Neurosci, 35:57-67, 2012)。また、PVニューロンは皮質の興奮性細胞を強く抑制することが知られているが、PVニューロンからCTニューロンへのシナプス入力の総数や分布は明らかになっていなかった。

以上の背景より、「CTニューロンへのシナプス入力は、どのような分布様式に従って、どれだけの数が存在しているのか?」という学術的問いを設定した。

2. 研究の目的

Cajal が小脳の回路構造を発見して以降(Cajal, Histology of the nervous system, Vol 2, 1911)、様々な脳部位で回路構造を解明するための研究が進められてきた。しかし、「単一の神経細胞がどれだけの数のシナプス入力を受けているのか」という、神経回路を描く上で必要不可欠な点についても未だ明らかとなっていない。この基礎的かつ重要な疑問への答えを得るため、本研究課題では特にL6CTニューロンに焦点を絞って、「L6CTニューロンに存在する全ての興奮性・抑制性シナプス入力を可視化し、分布様式を解明すること」を目的として、実験手法の開発をおこなった。

3. 研究の方法

(1) ウイルスベクターのセロタイプ比較

解析対象のL6CTニューロンを標識するため、まずはAAVベクターの開発をおこなった。AAVベクターには複数のセロタイプがあり、各セロタイプによって感染特異性が異なることが知られている。皮質の錐体細胞に対しても感染特異性があり、例えば研究においてよく使われているAAV2/1では、皮質2/3層と5層のニューロンに効率的に感染をする一方、4層や6層のニューロンに対しては感染効率が悪くなる。L6に位置するニューロンを効率的に標識するため、申請者はAAV2/2, 2/5, 2/6, 2/8, 2/9, 2/PHPeBの各セロタイプのベクターを作成し、マウスの大脳皮質へと注入をおこなって、感染特異性を評価した。

(2) Glyoxal 固定法

AAVベクターの開発と並行して、シナプス前膜と後膜を効率的に可視化するための固定法について検討を行った。近年、細胞膜上に存在する蛋白の検出能に優れた方法として、Glyoxal液を用いた固定法が報告された(Ritcher et al., EMBO J, 37:139-159, 2018)。しかしGlyoxal固定法と透明化法を併用した報告は前例がないため、Glyoxal固定脳の染色法・透明化を組み合わせたプロトコルの開発を行った。

(3) Lucifer Yellow (LY) 注入法の開発

AAVベクターの各セロタイプの感染特異性を評価した結果、大脳皮質において普遍的に興奮性神経細胞へ感染するセロタイプを発見することはできなかった。感染特異性を排除できない場合、解析対象のニューロンが偏ってしまう危険性も残ってしまうこととなる。そこで申請者は、

細胞種非特異的に標識が可能な手法として、LY を直接細胞へと注入する方法に着目し、その開発をおこなった。

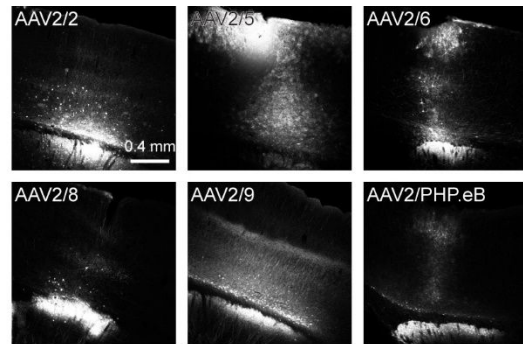
4. 研究成果

(1) ウイルスベクターのセロタイプ比較

緑色蛍光蛋白 (GFP) を発現する AAV2/2, 2/5, 2/6, 2/8, 2/9, 2/PHPeB の各セロタイプのベクターを作成し、マウス大脳皮質の 5 ~ 6 層を標的として注入をおこなった。注入の 1 週間後に固定をおこない、ウイルス注入部位を観察したところ、各セロタイプごとに特異的な感染様式が確認された (図 1)。残念ながら、全てのセロタイプにおいて感染特異性が観察され、皮質 6 層の神経細胞を高効率で標識できるセロタイプを見出すことは出来なかった。

AAV ベクターを用いた皮質 6 層のニューロンの標識が難しいことが判明したため、申請者らは代替の手法として色素 (Lucifer Yellow) 注入法の開発を検討することとした。

図1 AAVセロタイプの感染様式



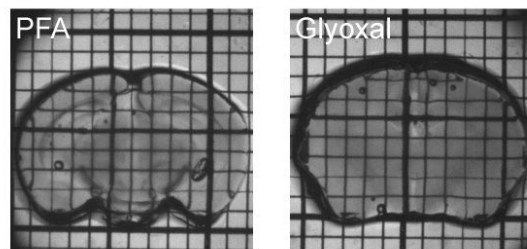
(2) Glyoxal 固定法

Glyoxal 固定したマウス脳を用いた透明化法の開発をおこなった。透明化法は、短時間での透明化が可能な Sca/eSF 法を採用した。Glyoxal 固定脳と一般的な固定で用いられる PFA 固定脳を比較したところ、同程度の透明度であることが分かった (図 2)。この結果より、Glyoxal 固定した脳においても、PFA 固定した脳と同様に、透明化処理を施しての観察が可能であることが判明した。

また、Glyoxal 固定したサンプルを用いた解析を念頭に、PSD95、Homer、Gephyrin、VGluT1、VGluT2 等のシナプス関連分子を標的とする抗体を用いて Glyoxal 固定サンプルを染色し、PFA 固定したサンプルと比べて染色性がどのように変化するかを比較・検討した。その結果、既存の報告にあるように、Glyoxal 固定サンプルにおいては、cytosolic なシグナルは減弱するものの、膜に局在している蛋白のシグナルは増強されることが、改めて確認された。

以上の結果より、Glyoxal 固定と、同固定サンプルの透明化は、シナプス分布を解析するにあたって非常に有用であることが示された。

図2 Glyoxal固定サンプルの透明化



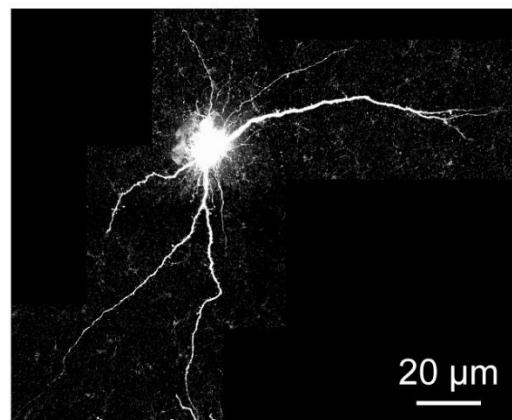
(3) LY 注入法の開発

AAV ベクターを用いた標識法では、皮質 6 層の神経細胞を効率よく標識するのが難しいと判明したため、LY を直接細胞へと注入して樹状突起を標識する手法の開発をおこなった。

サンプルの固定条件、LY 溶液の濃度、注入に使うガラス電極の形状、注入時の電圧量、色素注入後の染色法などについて検討をおこない、LY 注入により神経細胞の樹状突起を明瞭に可視化することに成功した (図 3)。

この手法を確立したことにより、任意の神経細胞の樹状突起を可視化し、解析することが可能となった。

図3 LY注入による樹状突起標識



5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1．発表者名 岡本 慎一郎
2．発表標題 免疫染色後に色素注入をおこなうポストホック細胞標識法の開発
3．学会等名 日本解剖学会2023（国際学会）
4．発表年 2024年

1．発表者名 岡本 慎一郎
2．発表標題 免疫染色と細胞内色素注入を組み合わせたポストホックな神経細胞標識法の開発
3．学会等名 NEUR02024（国際学会）
4．発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------