

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500379

研究課題名(和文) ウイルスベクターを用いた入出力解析法による、中脳ドーパミン細胞の機能的差異の解析

研究課題名(英文) Development of a novel technique for analyzing anatomical and functional difference in the nigral dopamine neurons by the use of viral vectors.

研究代表者

井上 謙一 (Inoue, Ken-ichi)

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：90455395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、中脳ドーパミンニューロンにおける機能集団ごとの入出力の違いを解剖学および光生理学的に解析するための技術開発を行った。まず、2種類のウイルスベクターを利用した経路選択的発現誘導法を改良し、発現量の増加とリーク発現の低下を実現した。また、狂犬病ウイルスベクターを改良し、外来遺伝子発現量の増加を実現し、そのG遺伝子欠損型ベクターを作出した。これらの開発により中脳ドーパミンニューロンの入出力を可視化することが可能となった。また、チャンネルロドプシンを発現するウイルスベクターを利用して、光刺激により特定の神経路に選択的な興奮を惹起し、それに伴うニューロンの活動変化を誘発させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel experimental technique that enabled us to analyze anatomical and functional difference in the nigral dopamine neurons. First, we improved a pathway-selective expression system we recently developed to increase gene expression and decrease leak expression. Second, we refined a rabies virus vector we recently established to increase foreign gene expression, and created G-deleted vector. These improvement enable us to visualize the input-output pattern of nigral dopamine neurons. Moreover, using a viral vector expressing channelrhodopsin-2, we demonstrated that selective stimulation of the pathway from the frontal eye field to the superior colliculus affected neuronal activity. These results indicate that the viral vector systems created in this study can be used for analyzing anatomical and functional difference in the specific neuron groups such as nigral dopamine neurons.

研究分野：神経科学、ウイルス学

キーワード：神経科学 脳・神経 バイオテクノロジー ウイルスベクター 解剖学

1. 研究開始当初の背景

中脳ドーパミンニューロンは、運動の実行・学習・意欲など様々な脳機能に関わると考えられている。歴史的には、1900年前後のパーキンソン病の責任病変の発見、1960年のパーキンソン病患者における線条体ドーパミン濃度低下の報告とその後の L-dopa 治療の成功などにより、大脳基底核機能と関連し運動の実行機能への関与が注目され、現在に至るまでそのメカニズムを探る研究が続いている。一方で、20世紀後半に入ってから、覚醒剤の研究などを通じ、大脳皮質広範に投射するモノアミン投射系として情動・意欲への関与が示唆され、Schultz らの1997年の報告からはドーパミンと学習（特に強化学習）との関係が線条体機能と共に精力的に調べられてきている。

これら広範な機能に関連するドーパミン投射系の神経メカニズムを解明するための重要な知見として、解剖学的には、Alexander, Parent, Strick および連携研究者である高田らの、皮質—線条体投射には Topography があることを示した一連の研究、および、Haber, Goldman-rakic らの、線条体・皮質へのドーパミン投射も Topography をもつことを示した研究がある。これらの研究は、中脳ドーパミンニューロンがその投射様式により、いくつかのサブグループに分類され、それぞれ異なる機能を持つ可能性を示している。一方、生理学的研究としては、近年までドーパミンニューロンは機能的に同一な細胞集団であると考えられていたが、連携研究者である松本らは、快・不快刺激を用いて、中脳ドーパミンニューロンがその活動様式から少なくとも3種類に分類でき、その分布には局在性があることを示した。これらのニューロン集団の刺激に対する応答潜時には違いがあり、このことは、中脳ドーパミンニューロンが入力の異なるいくつかのサブグループに分類され、それぞれ異なる機能を持つ可能性を示している。

以上の知見を総合すると、中脳ドーパミンニューロンはその入出力様式、および活動様式の異なるサブグループに分けられ、これがドーパミン投射系の機能の相違を生み出している可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、上記のような背景のもと、上記仮説を検証して、ドーパミンニューロンを巡る神経回路の全貌を明らかにする為の、新技術開発を目的とした。具体的には、

①申請者が近年開発した逆行性感染型レンチウイルスベクターと Tet-On 発現制御法を利用したベクター多重感染法を改良し、特定部位に投射する特定領域のニューロン集団の軸索を強力に可視化し、その投射パターンを同定する新技術。

②申請者が近年開発した狂犬病ウイルス

ベクターと Callaway らが発表した単シナプス性逆行性トレーシング法を利用した多重感染法を改良し、特定部位に投射する特定領域のニューロン集団へ入力するニューロン集団を可視化し、その入力パターンを同定する新技術。

という2つの選択的トレーシング手法を開発し、線条体の特定部位に投射するドーパミンニューロン集団の入出力様式を同一個体で可視化できる新規解析手法の確立を目指した。また、

③光・リガンド依存的神経活動制御プローブを発現するウイルスベクターを利用して、霊長類において、特定神経路選択的な光・リガンド刺激によりニューロン活動を制御する新技術。

を開発し、ドーパミンニューロン集団の入出力様式と活動様式との関連性を明らかにすることのできる新規解析手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

まず、特定部位に投射する特定領域のニューロン集団の軸索を強力に可視化し、その投射パターンを同定する新技術を開発するため、研究代表者が近年開発に成功した逆行性 LV ベクター（狂犬病ウイルス膜蛋白質を利用した改変ベクター）と、Tet-On 発現誘導系を利用した。具体的には、改変テトラサイクリン応答配列の下流に蛍光蛋白質遺伝子、かつユビキタスプロモーターの下流にテトラサイクリンサイレンサー遺伝子、の2配列を組み込んだ逆行性 LV ベクターを作成し、また改変逆テトラサイクリンアクチベーターを発現する AAV ベクターを作成した。これら逆行性・順行性ベクターの多重感染が成立した細胞でのみ、ドキシサイクリン投与により強力な蛍光タンパク質の発現が誘導されるかの検証を行った。

次に、特定部位に投射する特定領域のニューロン集団へ入力するニューロン集団を可視化し、その入力パターンを同定する新技術を開発するため、研究代表者が近年構築したウイルス G 遺伝子欠損狂犬病ウイルスベクター (de1G-RV) を利用した。具体的には、狂犬病ウイルスベクターのゲノム改変を行い、外来遺伝子高発現型の改変型 de1G-RV の開発を行った。また、同様にゲノム改変により、de1G-RV の細胞毒性を低減することを試みた。開発した蛍光蛋白質を組み込んだ逆行性感染型の de1G-RV ベクターに、狂犬病ウイルス G 蛋白質 (RV-G) を発現する AAV ベクターが共感染することにより、AAV ベクターにより発現した RV-G によりウイルス粒子が形成されてシナプスを介した単シナプス性逆行性感染伝播が生じ、これらのニューロンへ投射を送るニューロン集団が XFP を発現するかの検証を行った。

さらに、特定神経路選択的な光・リガンド

刺激によりニューロン活動を制御する新技術を開発するため、チャンネルロドプシン-2を発現するウイルスベクターを作成して霊長類前頭眼野に注入し、上丘における軸索の光刺激が上丘ニューロンの活動を変化させるかを検証した。

4. 研究成果

まず線条体特定部位に投射する中脳ドーパミンニューロンにおいてマーカー蛋白質を強力に発現させるためのシステムとして、研究代表者らが近年開発に成功した逆行性レンチウイルス(LV)ベクターとアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、およびTet-On発現誘導系を利用した経路選択的細胞可視化法を開発した。逆行性レンチウイルスベクターのダブルプロモーター化、遺伝子配置の最適化およびCre-loxP部位特異的組換え反応の導入などの改良を加えて発現量の増加とリーク発現の低下を実現し、これら逆行性・順行性ベクターの多重感染が成立した細胞でのみ、ドキシサイクリン投与により強力な蛍光タンパク質の発現が誘導されると共に、多重感染細胞および単独感染細胞が区別できるベクターシステムを確立した。

また、線条体特定部位に投射する中脳ドーパミンニューロンからの単シナプス性逆行性トレーシングを実現するために利用する感染伝播能欠損型(G遺伝子欠損型)のベースとなる狂犬病ウイルスベクターに遺伝子順序の変更などのゲノム配列の改変を行い、従来型と比べて外来遺伝子発現能を向上させ、かつ細胞毒性を低減して長期間の外来遺伝子の発現を可能とした改変型ウイルスベクターを開発することに成功した。次いで、各種蛍光タンパク質遺伝子を導入した同ベクターのサル皮質内注入により、蛍光タンパク質による多重ラベリングが可能であることを確認した。この株のG遺伝子欠損型ベクターを効率的に作成するため、Gタンパク質安定発現細胞株の樹立実験を行ってこれに成功し、同細胞株を用いたG遺伝子欠損型ベクターと狂犬病ウイルスG蛋白質(RV-G)を発現するAAVベクターが共感染することにより、AAVベクターによ発現したRV-Gによりウイルス粒子が形成されることを確認した。現在これらの開発したウイルスベクターを利用して中脳ドーパミンニューロンの入出力を明らかにするための実験を進めている。

また、興奮性のOpsin(ChR2改変体)を発現するアデノ随伴ウイルスを作成し、微量注入を行うことにより、マカクサル前頭眼野ニューロンにチャンネルロドプシン2を発現させた。30日後、オプトロード(光ファイバーを取り付けた記録電極)を上丘に刺入し、前頭眼野ニューロンの軸索末端を光刺激すると、上丘においてニューロン活動の上昇が確認された。すなわち霊長類において光刺激により特定の神経路に選択的な興奮を惹起す

ることに成功した。現在、同様の手法をマカクザルのドーパミン神経系に適用するべく、プロモーターの改良やサルのトレーニングを進めている。

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. Hiraoka M, Inoue K, Senoo H, Takada M (2015) Ischaemia in the Zinn-Haller circle and glaucomatous optic neuropathy in macaque monkeys. *Anat Rec*, 査読有, Vol. 41, pp. 999-1012, DOI: 10.1111/ejn.12858
2. Hirata Y, Miyachi S, Inoue K, Ninomiya T, Takahara D, Hoshi E, Takada M (2013) Dorsal area 46 is a major target of disynaptic projections from the medial temporal lobe. *Cereb Cortex*, 査読有, Vol. 23, pp. 2965-75, DOI: 10.1093/cercor/bhs286
3. Takada M, Inoue K, Koketsu D, Kato S, Kobayashi K and Nambu A (2013) Elucidating information processing in primate basal ganglia circuitry: a novel technique for pathway-selective ablation mediated by immunotoxin. *Front Neural Circuits*, 査読有, Vol. 7, pp. 140 DOI: 10.3389/fncir.2013.00140
4. Yoshida T, Suzuki S, Iwasaki Y, Kaneko A, Saito A, Enomoto Y, Higashino A, Watanabe A, Suzuki J, Inoue K, Kuroda T, Takada M, Ito R, Ito M, Akari H (2013) Efficient in vivo depletion of CD8+ T lymphocytes in common marmosets by novel CD8 monoclonal antibody administration. *Immunol Lett*, 査読有, Vol. 154, pp. 12-17 DOI: 10.1016/j.imlet.2013.08.005
5. Miyachi S, Hirata Y, Inoue K, Lu X, Nambu A, Takada M (2013) Multisynaptic projections from the ventrolateral prefrontal cortex to hand and mouth representations of the monkey primary motor cortex. *Neurosci Res*, 査読有, Vol. 76, pp. 141-9 DOI: 10.1016/j.neures.2013.04.004
6. Hiraoka M, Kuroda T, Inoue K, Senoo H, Takada M (2013) Developmental anatomy in the zonular connection with lens capsule in macaque eye. *Anat Rec*, 査読有, Vol. 296, pp. 726-35 DOI: 10.1002/ar.22684
7. Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M (2012) Multisynaptic inputs from the medial temporal lobe to V4 in macaques.

- PLoS ONE, 査読有, Vol.7, pp.e52115
DOI: 10.1371/journal.pone.0052115
8. Takahara D, Inoue K, Hirata Y, Miyachi S, Nambu A, Takada M, Hoshi E (2012) Multisynaptic projections from the ventrolateral prefrontal cortex to the dorsal premotor cortex in macaques – anatomical substrate for conditional visuomotor behavior. Eur J Neurosci, 査読有, Vol. 36, pp. 3365–75
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08251
 9. Inoue K, Koketsu D, Kato S, Kobayashi K, Nambu A, Takada M (2012) Immunotoxin-mediated tract targeting in the primate brain: selective elimination of the cortico-subthalamic “hyperdirect” pathway. PLoS ONE, 査読有, Vol.7, pp.e39149
DOI: 10.1371/journal.pone.0039149
 10. Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M (2012) Segregated pathways carrying top-down signals from frontal cortex to visual areas MT and V4 in macaques. J Neurosci, 査読有, Vol. 32, pp. 6851–8
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6295-11.2012
 11. Hiraoka M, Inoue K, Ninomiya T, Takada M (2012) Ischaemia in the Zinn-Haller circle and glaucomatous optic neuropathy in macaque monkeys. Br J Ophthalmol, 査読有, Vol.96, pp. 537–603
DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300831
- [学会発表] (計 19 件)
1. Inoue K, Takada M : “Manipulation of primate neural networks by means of modified viral vectors.” 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回 日本生理学会大会 合同大会 (2015. 3. 23) 神戸国際会議場, 神戸 (招待講演)
 2. Inoue K, Kimura K, Yasukouchi R, Sugawara N, Okuda Y, Fujiwara M, Takada M : “Systemic delivery of an AAV vector in neonatal macaques results in widespread gene transduction into neurons throughout the brain.” VMT2014 “Vision, Memory, Thought: how cognition emerges from neural network” (2014. 12. 6–7) 伊藤国際学術研究センター. 伊藤謝恩ホール, 東京
 3. Inoue K, Kimura K, Yasukochi R, Sugawara N, Okuda Y, Fujiwara M, Takada M : “Intravascular administration of an AAV vector to neonatal macaques results in widespread gene transduction into neurons throughout the primate brain.” Neuroscience 2014 (2014. 11. 18) Washington, D. C., USA
 4. Nagai Y, Kikuchi E, W. Lerchner, Inoue K, Oh-nishi A, Kaneko H, Kato Y, Hori Y, B. Ji, Kumata K, M. Zhang, Aoki I, Suhara T, Takada M, Higuchi M, B. J. Richmond, Minamimoto T : “In vivo PET imaging of the behaviorally active designer receptor in macaque monkeys.” Neuroscience 2014 (2014. 11. 17) Washington, D. C., USA
 5. 井上謙一: “ウイルスベクターを利用した霊長類遺伝子改変モデルの開発” 分子精神神経薬理学研究セミナー (2014. 11. 7) 大阪大学, 大阪 (招待講演)
 6. 永井裕司, 菊池瑛理佳, Walter Lerchner, 井上謙一, 大西新, 金子博之, 加藤陽子, 堀由紀子, 季斌, 熊田勝志, 張明榮, 青木伊知男, 須原哲也, 高田昌彦, 樋口真人, Barry J Richmond, 南本敬史 : “DREADD を用いたサル の 行動制御 と PET 生体内イメージング” 第 37 回日本神経科学大会 (2014. 9. 13) パシフィコ横浜, 横浜
 7. 木村活生, 井上謙一, 田中章景, 高田昌彦 : “マカクザル脳における加齢に伴うアミロイドβ蛋白の蓄積変化” 第 37 回日本神経科学大会 (2014. 9. 13) パシフィコ横浜, 横浜
 8. 井上謙一, 木村活生, 安河内 竜二, 菅原直也, 小笠原 宇弥, 奥田 泰弘, 藤原 真紀, 高田昌彦 : “AAV ベクターによる霊長類新生児への全脳的遺伝子導入” 第 37 回日本神経科学大会 (2014. 9. 12) パシフィコ横浜, 横浜
 9. Takada M, Inoue K : “Novel primate models for Parkinson’s disease due to nigrostriatal pathway-selective gene manipulation.” New Frontier of Molecular Neuropathology 2014 (2014. 3. 17) 東京医科歯科大学, 東京
 10. 井上謙一: “神経路選択的な遺伝子導入による神経ネットワークの機能操作” 生理研シンポジウム・グローバルネットワークによる脳情報処理 (2014. 1. 11) 自然科学研究機構, 岡崎 (招待講演)
 11. Kimura K, Inoue K, Tanaka F, Takada M : “Age-dependent alterations in the distribution of neurons expressing alpha-synuclein in macaque monkeys.” Neuroscience 2013 (2013. 11. 9–13) San Diego, USA
 12. 井上謙一: “霊長類脳研究に資する遺伝子導入技術の開発” 「霊長類認知ゲノミクス」キックオフワークショップ (2013. 10. 1) 自然科学研究機構, 岡崎 (招待講演)
 13. 木村活生, 井上謙一, 黒田呈子, 田中章景, 高田昌彦 : “マカクザルにおけるアルファシヌクレイン発現ニューロンの加齢による分布変化” 第 36 回日本神経科学大会 (2013. 6. 20–23) 国立京都国際会館, 京都
 14. 井上謙一, 藤原真紀, 奥田泰宏, 高田昌彦 : “神経回路解析に適した新規狂犬病

ウイルスベクターの開発” 第 36 回日本神経科学大会 (2013. 6. 20-23) 国立京都国際会館, 京都

15. Inoue K : “Manipulation of primate neuronal circuits by the use of modified lentiviral vector with enhanced retrograde transport.” 生理研ミニ国際シンポジウム Frontiers in Neural Control of Actions (2013. 6. 17) 自然科学研究機構, 岡崎 (招待講演)
16. 井上謙一: “神経路選択的な遺伝子導入による神経ネットワークの機能操作” 第 9 回ナショナルバイオリソースプログラム「ニホンザル」 公開シンポジウム (2012. 11. 9) 秋葉原 UDX, 東京 (招待講演)
17. Sawamura H, Ninomiya T, Inoue K, Takada M : “Architecture of multisynaptic inputs from the medial temporal lobe to V4 in macaques.” Neuroscience 2012 (2012. 10. 16) New Orleans, USA
18. 木村活生, 井上謙一, 奥田泰弘, 加藤成樹, 黒田呈子, 藤原真紀, 小林和人, 高田昌彦: “霊長類における改変型逆行性感染型レンチウイルスベクター使用による黒質ドーパミンニューロンへの選択的遺伝子発現” 第 35 回日本神経科学大会 (2012. 9. 20) 名古屋国際会議場, 名古屋
19. 井上謙一, 瀬瀬大輔, 加藤成樹, 小林和人, 南部 篤, 高田昌彦: “イムノトキシン神経路標的法を用いたサル皮質-視床下核路の選択的除去” 第 35 回日本神経科学大会 (2012. 9. 19) 名古屋国際会議場, 名古屋

[図書] (計 3 件)

1. 井上謙一, 高田昌彦 (2014) ウイルスベクターを用いた神経回路への機能介入法. Clinical Neuroscience 「メインテーマ 脳のゆらぎ・同期・オシレーション」, 中外医学社, 32:757-761.
2. Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K (2013) Vectors for highly efficient and neuron-specific retrograde gene transfer for gene therapy of neurological diseases. In: Gene Therapy - Tools and Potential Applications (Molina FM, ed), InTech: Rijeka (Croatia), pp 387-398.
3. Takada M, Hoshi E, Saga Y, Inoue K, Miyachi S, Hatanaka N, Inase M, Nambu A, Organization of two cortico-basal ganglia loop circuits that arise from distinct sectors of the monkey dorsal premotor cortex. In: Basal Ganglia - An Integrative View (Barrios FA, Bauer C, eds), 2012, pp 103-116. InTech: Rijeka (Croatia).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

京都大学霊長類研究所
統合脳システム分野 ホームページ
http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/systems_neuroscience/index.html

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・助教
研究者番号: 90455395

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高田 昌彦 (MASAHIKO TAKADA)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号: 00236233

松本 正幸 (MATSUMOTO MASAYUKI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 50577864

井上 智 (INOUE SATOSHI)
国立感染症研究所・獣医科学部・室長
研究者番号: 90213157