

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430018

研究課題名(和文) TET 2重感染法(TEDI)を使った大脳皮質ニューロンの軸索側枝解析

研究課題名(英文) Analysis of axon collaterals of cortical projection neurons by Tet double infection (TEDI) method

研究代表者

渡我部 昭哉 (Akiya, Watakabe)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40290910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、順行性と逆行性のウイルスベクターを組み合わせることで特定の投射ニューロンに遺伝子導入するTEDI(TET 2重感染法)の手法の確立、応用のための研究を行い、その成果として、マウスの視床、及び皮質投射ニューロンが、皮質内外で示す特徴的な軸索側枝分岐の様子を可視化し、特徴解析することに成功した。また将来的にマーモセットにおいてTEDIを適用するために、様々なAAV血清型の感染条件の違いを比較解析し、重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this project, I endeavored to establish and further polish up my new viral technology termed TEDI (TET double Infection method), in which retrograde and anterograde viral vectors were combined to selectively transduce a particular type of projection neurons. Using this technique, I was able to selectively visualize and analyze the morphologies of the axon collaterals of the corticothalamic and corticocortical neurons in mice. I also examined the infection conditions of various serotypes of AAV in marmosets, which result is useful in planning an efficient TEDI in non-human primates.

研究分野：神経生物学

キーワード：大脳皮質 逆行性 神経解剖学 マーモセット ウイルスベクター 投射ニューロン 視床 層構造

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は脳の外側を覆うシート状の構造で、哺乳類においては最高次の連合機能を果たしている。この機能は、さまざまな性質を持った層状に配置した皮質ニューロンによって担われている。私はこの研究の開始までに、層特異的な遺伝子発現と、投射パターンに強い相関が存在することを見だし、それをきっかけとして、投射タイプ特異的ニューロンの特性を調べる方法を開発する必要性を感じていた。現在(2016年)主流になっているのは、細胞タイプ特異的なトランスジェニック(TG)マウスラインを用いた方法だが、それだとマウスの解析しかできない。私が興味を持っている霊長類脳を研究するためには、種を超えて適用できる方法を開発する必要がある。そこで考案したのが、TET2重感染法(TEDI)と名付けたウイルスベクターを使った遺伝子導入法である。この手法は、従来の神経解剖学的手法とは異なり、注入部位から、注入先、さらには軸索側枝までの全体を集団で可視化することができる。この方法を使えば、比較的簡単に投射タイプ特異的ニューロンを解析することができ、ひいては、領野や種特異的な分化を調べることができると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

大脳皮質ニューロンが作る複雑な神経ネットワークを解明するために、TET2重感染法(TEDI)を使った形態解析を行うことを目的とする。ターゲットは、視床投射ニューロン及び皮質投射ニューロンの2タイプである。この2種類のニューロンは、皮質第6層で共存しているが、マウス、ラットにおいて非常に異なる遺伝子発現パターンを示す。そこでマウス、及びマーモセットの代表的な領野において、この2種類のニューロンが、皮質内外でどのような軸索側枝を持つかを調べて、神経ネットワーク形成における軸索側枝の重要性を探る。またこの目的を達成し、ひいてはオプトジェネティクスとの組み合わせなど、より汎用的な用途に使えるように、TEDIという手法の応用や、最適化を検討する。また霊長類モデルとしてのマーモセットでの適用を視野に入れて、マーモセットでTEDIを行うのに必要な技術を養成する。

3. 研究の方法

TEDIでは、ターゲットニューロンの投射元と投射先に、TETシステムの二つのコンポーネント(TETアクチベータとTRE-トランスジーン)を別々に搭載した順行性及び逆行性ウイルスベクターをそれぞれ感染させる。これらのベクターは単独では発現しないが、同じ細胞に共感染した時、強力な発現が誘導される。従って、投射元と投射先を連結するニューロ

ンに特異的な遺伝子発現を誘導できる。順行性ウイルスとしては、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を、逆行性ウイルスとしては、狂犬病ウイルスでシュードタイプしたレンチウイルスベクターを使用した。マウス、あるいはマーモセットの皮質や視床にウイルスベクターを注入し、数週間後、脳を取り出して、導入遺伝子の発現を観察した。

4. 研究成果

[概要]

TEDIの手法確立、及びその手法を用いた研究の一例として、マウスの視床、及び皮質投射ニューロンが、皮質内外で示す特徴的な軸索側枝分岐の様子を可視化し、特徴解析することに成功した。また将来的にマーモセットにおいてTEDIを適用するために、様々なAAV血清型の感染条件の違いを比較解析し、重要な知見を得た。

TEDIと直接の関係はないものの、霊長類におけるウイルスベクターの応用例として、in vivo 2光子撮像のための新しいベクターシステムの開発に成功し、マーモセットへの適用例を報告した。また、遺伝子発現解析も過去の研究テーマから継続して行っており、Claustriumに強く発現する特徴的な一群の遺伝子の発現様態を明らかにした。

[詳細]

(1) マウス視床、及び皮質投射ニューロンの解析

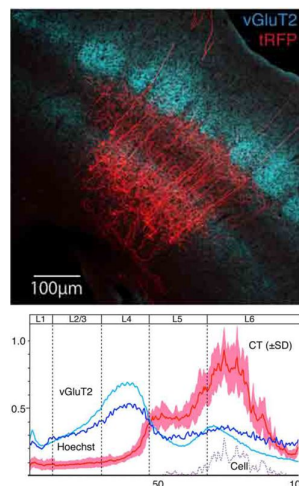


図1
マウスバレル野において、視床投射ニューロンを、tRFP(赤色蛍光タンパク)で標識したものの。シアンは、4層への視床入力を受けるニューロンをvGluT2抗体で染めたもの。樹状突起と軸索側枝の伸展が、5層までに限定されていることが分かる。

Deschneenesらによる一連の研究により、ラットバレル野の第6層を構成するニューロンが層特異的に樹状突起や皮質内軸索側枝を展開することはすでに報告されていた。またCallawayらのグループは、マカクや、ラット視覚野の第6層ニューロンが種特異的な樹状突起展開を示すことを報告している。しかし、これらの研究では、ニューロンの複雑な形態を一つずつ解析しているため、数に限り

がある。私は、TEDI を使って、視床投射ニューロンを選択的に可視化することで、集団としての共通の性質を明らかにすることに成功した。その結果、図 1 に示す通り、マウスパレル野の視床投射ニューロンは、5 層まで樹状突起と軸索側枝を密に伸展するが、視床入力を受容層である 4 層にはほとんど侵入しないことを明らかにした。これは意外な発見であった。なぜなら、一般的にはネズミの視床投射ニューロンは、入力受容層である 4 層と神経連絡すると考えられて来たからだ。文献を見直した結果、これは先行していたネコやサルの研究に引きずられた考えであり、我々のデータは必ずしも先行報告と矛盾しないことが分かった。なお、本成果と独立に、視床投射ニューロン特異的な TG マウスが確立され、ほぼ同様な結論が得られたこと付記しておく。

私は、運動野においても TEDI 実験を行い、パレル野の層特異性が領野を超えて保存されていることを確認した。また、運動野において、対側皮質投射ニューロンを同時に別の色を使って標識し、視床投射ニューロンと対側皮質投射ニューロンが、それぞれ独自の皮質内軸索投射を示し、また特徴的な皮質外軸索側枝を示すことを示した。

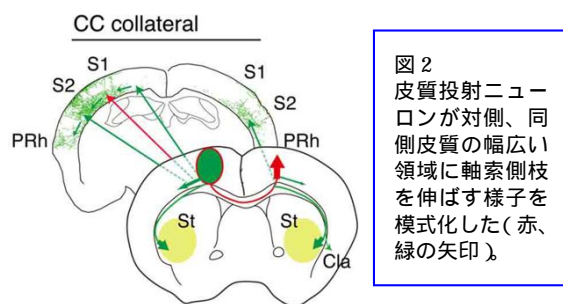


図 2
皮質投射ニューロンが対側、同側皮質の幅広い領域に軸索側枝を伸ばす様子を模式化した(赤、緑の矢印)。

皮質投射ニューロンには、対側皮質投射ニューロンと、同側皮質投射ニューロンが存在するが、我々の実験結果は、この両者が厳密には区別できず、対側と同側に軸索側枝を伸ばすニューロンが存在することを示した。同じニューロンが対側に投射する際は白質を、同側に投射する際は皮質第 6 層を走行することが分かった。

以上の研究結果は、これまで部分的に知られていたことを別の方法で裏付けるとともに、TEDI を使えば、体系的に特定の投射ニューロンの特徴を調べられることを例証し、この手法の重要性を示した。この研究成果は、Front Neural Circuits 誌に論文として公表した。

(2) マーモセットにおける AAV 感染実験

TEDI をマーモセットに適用する実験を試みたが、2 重感染がうまく成立しなかったため、まずは、マーモセットにおけるウイルス感染系を確立する必要性を感じ、順行性ウイルス

ベクターとして、さまざまな AAV 血清型の感染特異性を調べた。この実験においては、平行して、マウス、マカクでも実験を行い、AAV2 型は、感染の広がりも感染効率も他の血清型 (AAV1, 5, 8, 9) より低いこと、ニューロン特異的なプロモータである、synapsin I や、CamKII プロモータを併用すれば、神経特異的に 70%以上の細胞に遺伝子導入できることを示した。研究成果は、Neurosci Res 誌に公表した。

(3) in vivo 2 光子撮像のためのベクター開発

TEDI を使って、蛍光タンパク質ではなく、その他の機能タンパク質を発現させれば、TEDI の応用はさらに広がる。このために、TET システムを組み入れた、チャンネルロドプシン、GCaMP 発現系を開発した。この発現系は、マーモセットにおいて、強力に遺伝子発現を誘導できる。この系を使うことにより、初めてマーモセットにおいて効率的な in vivo 2 光子撮像が可能になった。スパインの動的形態変化や、カルシウム動態の研究が可能になり、今後の機能的な研究の重要な基盤となった。この成果は、eNeuro 及び、Cell Reports 誌に公表した。

(4) Claustrum の遺伝子発現解析

過去受けた科研費において、「Nurr1 遺伝子が規定するニューロンタイプの特性を調べる」という研究目的を設定した。本研究課題においては、TEDI の応用を主題に添えているが、遺伝子発現と、投射パターンによる細胞タイプ分類は、私の研究の根底にある基本テーマである。TEDI の研究と平行して、さまざまな遺伝子プローブを使った遺伝子発現解析を行っていたが、Nurr1 遺伝子が強く発現する Claustrum に強い発現を見せる一群の遺伝子が存在することが分かったので、それらの遺伝子の発現様式について、マウス、マカク、マーモセットで比較解析を行った。この結果は、Front. Syst. Neurosci 誌、及び、J. Comp. Neurol. 誌に報告した。

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 6 件)

(1) Watakabe A. In situ hybridization analyses of claustrum-enriched genes in marmosets. (2016) J Comp Neurol. in press (査読有)

(2) Sadakane O, Watakabe A et al. In vivo two-photon imaging of dendritic spines in marmoset neocortex (2015) eNeuro. 2(4). (査読有)

(3) Sadakane O, Masamizu Y, Watakabe A et al. Long-term two-photon calcium imaging of neuronal populations with subcellular resolution in adult non-human primates. (2015) Cell Rep. 13(9):1989-99. (査読有)

(4) Watakabe A, Takaji M, Kato S, Kobayashi K, Mizukami H, Ozawa K, Ohsawa S, Matsui R, Watanabe D, Yamamori T. (2014) Simultaneous visualization of extrinsic and intrinsic axon collaterals in Golgi-like detail for mouse corticothalamic and corticocortical cells: a double viral infection method. Front Neural Circuits;8:110. (査読有)

(5) Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, Takaji M, Isa K, Mizukami H, Ozawa K, Isa T, Yamamori T. (2014) Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. Neurosci Res. S0168-0102(14)00213-2. (査読有)

(6) Watakabe A, Ohsawa S., Ichinohe N., Rockland KS. and Yamamori T. (2014) Characterization of claustral neurons by comparative gene expression profiling and dye-injection analyses Front. Syst. Neurosci. | doi: 10.3389/fnsys.2014.00098 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 定金 理、渡我部 昭哉(共同報告)、他 9 名 “Two-photon calcium imaging using genetically encoded calcium indicator in primate neocortex”
北米神経学会(Neuroscience 2015)(2015年10月18日) Chicago (米国) にてポスター発表

(2) 定金 理、渡我部 昭哉(共同報告)、他 9 名
マーマセット大脳皮質における GCaMP を用いた 2 光子カルシウムイメージング
第 38 回日本神経科学学会 (2015 年 7 月 29 日)
神戸国際会議場 (兵庫県) にてポスター発表

(3)渡我部 昭哉、他 9 名 “Corticothalamic and corticocortical cells in mouse M1 exhibit layer- and area specific elaboration of axon collaterals”
北米神経学会 (2014 年 11 月 15 日~18 日)
Washington DC (米国) にてポスター発表

(4)渡我部 昭哉、他 5 名 “Differential labeling of the cortical projection neuron subpopulations by TET-double infection method (TEDI).”
第 36 回日本神経科学学会 (2013 年 6 月 22 日)
京都国際会館 (京都府) にてポスター発表

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/brish/>

で In situ hybridization 法などに関する情報を公開。累計 57 件の請求に応じて、ISH プローブの送付を行った。

6 . 研究組織
(1) 研究代表者

渡我部 昭哉 (WATAKABE AKIYA)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：40290910