

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02548

研究課題名(和文)比較コネクトミクスの創出

研究課題名(英文)Generation of comparative connectomics

研究代表者

宮道 和成 (Miyamichi, Kazunari)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：30612577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は狂犬病ウイルストランスシナプス標識法を基軸にして神経回路の構造を比較することにより、機能的に重要な回路要素を抽出する“比較コネクトミクス”の実装を目指した。マウスの生殖状態によって神経ホルモン・オキシトシンを分泌するニューロンに対する入力の変動を検討し、雌マウスの妊娠・授乳期に特徴的な回路変化を多数同定した。またマウスを超えて食肉目フェレットにおいてオキシトシンニューロン特異的な標識系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス・スパイン動態の研究からミクロ(sub- μm)スケールの神経可塑性については特に記憶・学習の文脈で膨大な知見があるが、領域間をつなぐようなマクロスケール(supra-cm)の大域的な神経回路は発達後には不変と見なすのがカハール以来の伝統だった。本研究は成熟した哺乳類の神経回路がマクロスケールで再編成していることを明らかにし、シナプス前後の神経細胞の種類を特定することに成功した点でパラダイムの転換を含む。これは将来的に脳機能の制御や失われた脳機能を回復させるための新たなイノベーションの基盤となり得る。

研究成果の概要(英文)：We aim to form a research field that we name ‘comparative connectomics’ to extract functionally important circuit elements by comparing the neural connection diagrams at a cell-type resolution based on rabies virus-mediated transsynaptic labeling method. Specifically, we examined input neural circuits to hypothalamic oxytocin neurons that secrete the hormone oxytocin in various reproductive states of mice and identified characteristic circuit alterations during pregnancy and lactation in female mice. Also, we established viral-genetic access to oxytocin neurons in ferrets as a model of Carnivora species.

研究分野：生殖や社会行動の神経科学

キーワード：トランスシナプス標識 視床下部 オキシトシン 妊娠・出産 養育行動

1. 研究開始当初の背景

脳の中では膨大な種類のニューロンが自らの特異性を踏まえて連結し神経回路を形成することで複雑な情報処理が行われる。一般に標的領域に存在する研究対象のニューロンは、広範な脳領域からさまざまな入力を受け取るため、それぞれの神経入力にどのような情報がコードされ、行動や内分泌系の制御といった脳の出力にどのような役割を果たしているのかを解明するのは難しい。現在の神経回路の機能に関する大部分の研究は、ある領域の標的ニューロンを光や薬剤で操作すると出力がどうなるのか？という“点の研究”に留まっており、それらニューロンの長距離の入出力構造の全体像や、それぞれの回路要素が果たす役割を複合的に捉える“ネットワークの研究”に到達していない。本研究ではこの問題に対し、標的ニューロンの形成する神経回路全体(コネクトーム)の構造を比較することで、各入力ニューロンの機能的な重要性を推定する新しいアプローチとして“比較コネクトミクス”を提案することを企図した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、回路構造の比較を通して機能的に重要な回路要素を抽出するという比較コネクトミクスを「妊娠に伴う個体内の変化」と「進化的時間による種間の変化」という時間軸の異なる二つの対象において実証することである。この目的のために、我々の実用化してきた逆行性の狂犬病ウイルスを用いたトランスシナプス標識を基軸に、CRISPR ゲノム編集やインフォマティクスを組み合わせた解析プラットフォームの構築を目指した。また、これを用いて雌マウスにおいて妊娠に伴って視床下部の特定のニューロンに生じる神経回路の変化を定量し、分娩や授乳などの母性機能の発現に重要な回路要素を網羅的に同定することを目的とした。さらに、特定の種類のニューロンが形成する神経回路の構造を異種間で比較し、種特異的な脳機能を支える神経回路の進化について解析することを目標に、マウス以外の非遺伝学モデル動物で特定の種類のニューロンを標識・操作する系の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞種特異的な遺伝子導入系の検討

本研究では、げっ歯類(マウス・ラット)の他に食肉目フェレットをモデルに特定の種類のニューロンを特異的に標識・操作する系の確立を目指した。具体的には、CRISPRを用いたノックイン型のゲノム編集をAAVベクターのみで行う手法を発展させるため、まずマウスの運動野を対象に抑制性ニューロン特異的な標識系の確立を目指した。同時にバックアップとして、アデノ随伴ウイルスに搭載可能で細胞種特異的に発現の可能なミニエンハンサーの収集を行った。

(2) 雌マウスにおける妊娠・出産に伴うOxt神経回路の変化

非妊娠雌マウス、後期妊娠マウス、および出産後の授乳期にある母マウスの3群について入力ニューロンの分布をトランスシナプス標識法により定量した。ニューロン数の多い領域に関して、データベース検索と *in situ* hybridization 法を組み合わせることで Rabies 標識ニューロンの組織化学を行い、入力ニューロンの種類を決定した。また変動する回路要素の機能解析に繋げるため、オキシトシンニューロン特異的なファイバーストリーを構築し、分娩時および授乳時におけるこのニューロン群の集団活動を行動とリンクする形で長期間記録した。さらに薬理遺伝学を用いて上流のニューロンを阻害あるいは賦活化した場合のオキシトシンニューロンの活動、および分娩や授乳の時間や効率に与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞種特異的な遺伝子導入系の検討

AAVベクターを用いた非相同組み換え(HITI法)によりCre遺伝子を任意の遺伝子の制御下にノックインする系を試みた。ドナーとして機能的なopen reading frame(ORF)を持つCre遺伝子を導入するとAAVベクターに内在するプロモータ活性によってノックインの有無にかかわらずCreが十分量発現してしまうことが分かった。そこでCreのORFから開始コドン(ATG)を極力排除した変異体Creをドナーとし、splice acceptorと2a peptideを介して目的遺伝子のイントロン内にノックインする手法を探った。しかし、AAVベクターやトランスジーン内に内在するsplice donor様の配列を介して、同一AAV

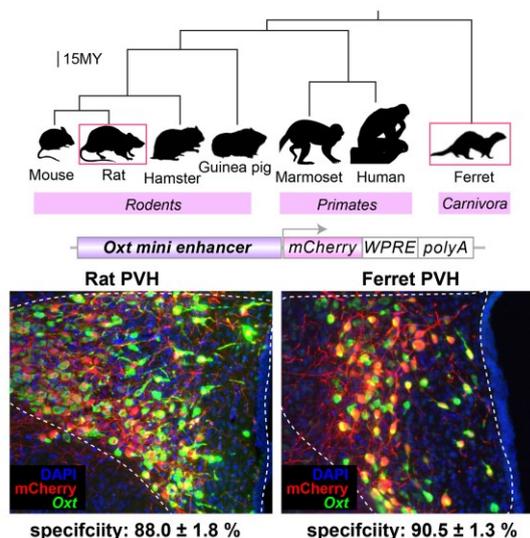


図1: AAVベクターによる齧歯類と食肉類における室傍核Oxtニューロン特異的標識

粒子の転写産物内部、または異なる AAV 粒子の転写産物間で様々なパターンで RNA splicing が発生し、機能的な Cre の発現が起きてしまうことが分かった。これを阻止するため、様々な保護機構を考案したが奏功せず、また、遺伝子の coding end にノックインする戦略も十分な特異性を得ることができなかった。このように計 25 種類の AAV を作製してマウスや非遺伝学モデル動物の大脳皮質において検討を進めたが、ドナーとして用いる AAV ベクターからの非特異的な Cre 活性（リーク）を制御することができず、細胞種特異的な遺伝子の発現パターンを再現するようなノックインを高効率に起こす系の確立を断念せざるを得なかった。

そこで代替戦略として AAV ベクターに搭載可能で細胞種特異的にトランスジーンを発現させられるミニエンハンサーを収集し、視床下部室傍核のオキシトシン (Oxt) ニューロンに特異的にトランスジーンを導入することのできる AAV ベクターを得た。具体的には、mCherry を発現させる AAV を齧歯類モデルのラットと食肉類モデルのフェレットの室傍核に導入して特異度を検討したところ、いずれの種でも標的脳領域において特異度 90%以上、導入効率最大 80%超の性能で、目的の種類ニューロンを標識できた (図 1)。フェレットは進化的に齧歯類・霊長類の分化より前に分かれているのでこの結果は本 AAV ベクターが霊長類でも Oxt ニューロン特異的に作動する可能性を示唆する。この結果を受けて本研究では室傍核 Oxt ニューロンに的を絞って以後の実験を行った。

(2) 雌マウスにおける妊娠・出産に伴う Oxt 神経回路の変化

狂犬病ウイルスを用いたトランスシナプス標識法を導入し、脳全域における Oxt ニューロンのシナプス前細胞の分布を脳切片において調べた (図 2)。約 30 の脳領域における入力を定量的に解析し、従来知られていなかった入力領域・細胞を多く見出した。入力細胞の約 8 割は視床下部の広範な神経核に分布した。視床下部以外への入力経路としては、循環系の浸透圧情報等をモニターする脳下弓器官 (SFO)、フェロモン (鋤鼻嗅覚) 系からの入力を受ける分界条床核 (BST)、臓器からの入力情報を中継する結合腕傍核 (PB) 等が顕著だった。

次に妊娠による変化を定量するため、非妊娠期、妊娠後期、授乳期における Oxt ニューロンへの入力ニューロンを定量的に比較した (図 3)。その結果、前腹側脳室周囲核 (AVPV) の興奮性ニューロンや外側中隔 (LS)、分界条床核 (BST) の抑制性ニューロンから Oxt ニューロンへの入力が妊娠後期に顕著に低下し、周産期に速やかに回復する現象を見出した。こ

これはマウスにおいて妊娠に伴ってシナプス接続頻度のレベルで神経回路の再編成が起こることを示す知見である。この現象の機能を探るため、自由行動下のマウスにおいて Oxt ニューロン

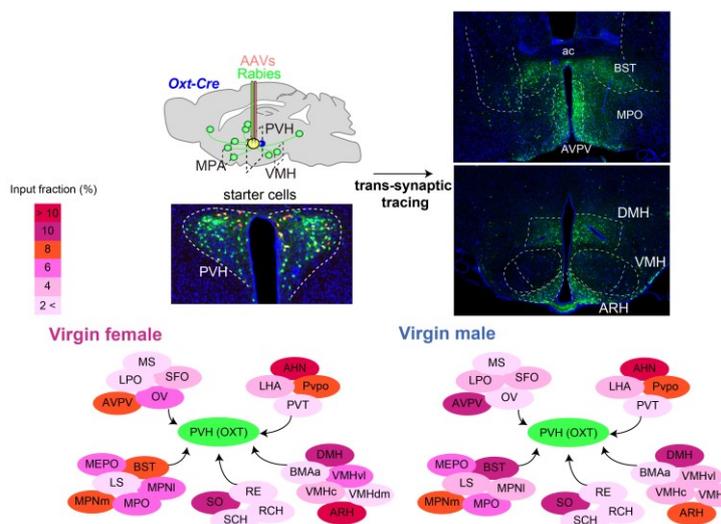


図 2: 室傍核 Oxt ニューロンへのインプットの概観。室傍核 (PVH) の Oxt ニューロンを起点とするトランスシナプス標識を行い、上の写真に示すように starter cells (黄色) から多数の標識 (緑) を得た。下には雌マウスと雄マウスにおける主な入力領域における標識頻度をヒートマップで示した。

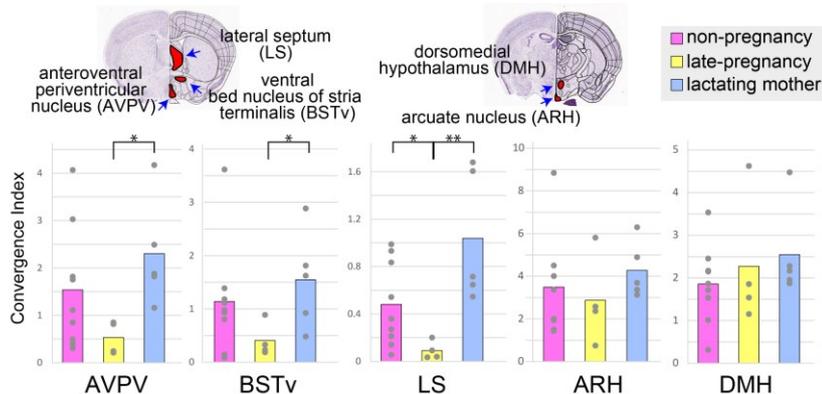


図 3: 室傍核 Oxt ニューロンへの入力の変化。非妊娠雌を対照に、妊娠後期及び授乳期の雌マウスの 5 種類の脳領域から Oxt ニューロンへの入力の多寡を convergence index (各領域の標識細胞数を starter cells の数で割った値) によって示した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ by Mann Whitney's u-test.

の活動を長期的・自動的に取得できるファイバーフォトメトリー法を導入し、雌マウスの出産・授乳中の Oxt ニューロンの活動動態を捉えることに初めて成功した。また薬理遺伝学の手法を用いて BST の抑制性ニューロンの活動を亢進すると授乳中の Oxt ニューロンの活動が低下し射乳反射に異常が生じることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Murata Koshi, Kinoshita Tomoki, Fukazawa Yugo, Kobayashi Kenta, Kobayashi Kazuto, Miyamichi Kazunari, Okuno Hiroyuki, Bito Haruhiko, Sakurai Yoshio, Yamaguchi Masahiro, Mori Kensaku, Manabe Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 GABAergic neurons in the olfactory cortex projecting to the lateral hypothalamus in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43580-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Ode KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saïdo TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR.	4. 巻 11
2. 論文標題 Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15906-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Hamasaki Y, Fukui K, Ito K, Miyamichi K, Minami M, Amano T.	4. 巻 40
2. 論文標題 Amygdalohippocampal Area Neurons That Project to the Preoptic Area Mediate Infant-Directed Attack in Male Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 3981-3994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0438-19.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mano Tomoyuki, Murata Ken, Kon Kazuhiro, Shimizu Chika, Ono Hiroaki, Shi Shoi, Yamada Rikuhiro G., Miyamichi Kazunari, Susaki Etsuo A., Touhara Kazushige, Ueda Hiroki R.	4. 巻 0
2. 論文標題 CUBIC-Cloud: An Integrative Computational Framework Towards Community-driven Whole-Mouse-Brain Mapping	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.08.28.271031	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazunari Miyamichi
2. 発表標題 ニューロンタイプ特異的な神経回路の可視化：達成と展望
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazunari Miyamichi
2. 発表標題 Dynamics of Neuronal Circuits in the Life Cycles
3. 学会等名 第三回これからの神経回路研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazunari Miyamichi
2. 発表標題 Expanding Rabies virus-mediated Trans-synaptic Tracing
3. 学会等名 Biomedical Imaging Science Seminar（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazunari Miyamichi
2. 発表標題 ニューロンタイプ特異的な神経回路の可視化：What 's Next?
3. 学会等名 これからの神経回路研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazunari Miyamichi
2. 発表標題 Reorganization in Hypothalamic Neural Circuits Underpinning Parental Behaviors
3. 学会等名 NGI symposium 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazunari Miyamichi
2. 発表標題 Neural Circuit Dynamics in Life-stage Transition to Parents
3. 学会等名 The 3rd Kobe University-RIKEN BDR joint symposium (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazunari Miyamichi
2. 発表標題 Neural Circuit Dynamics in Life-stage Transition to Parents
3. 学会等名 BRI 11th international symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazunari Miyamichio, Kengo Inada, Hiroko Goto
2. 発表標題 Dynamics of Oxytocin Neural Circuits in Mice
3. 学会等名 43rd JNS annual meeting
4. 発表年 2020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
---------	---------