

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19362

研究課題名(和文)自由行動下・組織特異的な脳末梢間神経回路の活動解析法の開発

研究課題名(英文)Development of new tools to analyze central-peripheral neural circuits in freely moving animals

研究代表者

近藤 邦生(Kondoh, Kunio)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・助教

研究者番号：90784950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：昨今の神経科学の技術進歩にも関わらず、脳と末梢組織の間を結ぶ神経回路の解析は、いまだに進んでいない。本研究では、それぞれの末梢組織を制御する脳末梢間神経回路の神経活動を自由行動下の動物において計測できる、新しい技術の開発をおこなった。

本研究では、シナプス結合を介して神経細胞間を逆行的に輸送される経シナプス性ウイルストレーサーを用いて、「末梢組織から脳まで移動して、脳の感染細胞に影響を与えず目的遺伝子を発現できる」新しいウイルスベクターの開発を行った。ウイルス遺伝子の発現を人為的に制御することで、ウイルス神経回路内の輸送を時間的に制御することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心(脳)と体(末梢組織)の相互作用は、紀元前から科学者や哲学者の関心を引き起こしてきた。このような脳と末梢組織のつながりを解明するためには、脳からそれぞれの末梢組織へ至る神経回路が、「どのような状況において」「どのように活動し」「どの末梢組織の機能を制御するのか」という点を理解する必要がある。本研究は、末梢組織特異的な脳の神経細胞から記録を行うという独自のアプローチを用いて、自由行動動物の脳末梢組織間の神経回路の活動の計測に取り組むものである。本研究で開発したウイルスベクターと中枢神経系の解析で用いられている様々な手法組み合わせることで、末梢神経系の解析が今後飛躍的に進む事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Despite recent technological advances in neuroscience, the study of neural circuits connecting the brain and peripheral tissues has yet to progress. In this project, we aimed to develop a new technique to measure neural activity in the brain-peripheral neural circuits that control each peripheral tissue in freely behaving animals.

For this purpose, we used a transsynaptic viral tracer that is transported retrogradely between neurons via synaptic connection, we tried to develop new viral vectors that travel from peripheral tissues to the brain and express target genes without affecting the physiology of infected cells in the brain. By artificially controlling the expression of viral genes, we succeeded in temporally controlling their transport in the viral neural circuit.

研究分野：神経科学

キーワード：脳-末梢組織間神経回路 経シナプス性トレーサー 仮性狂犬病ウイルス 自律神経

## 1. 研究開始当初の背景

「病は気から」と昔から言われるように、脳と末梢組織の機能は深く結びついている。我々の体を構成する各組織は、互いに情報を交換して協調的に機能することで、内部状態の変化を一定の範囲内に保つ「恒常性(ホメオスタシス)」を維持している。エネルギー恒常性や免疫恒常性など、恒常性の維持は生命にとって欠かすことができない。恒常性の制御において司令塔として機能するのが、脳(中枢神経系)である。脳は外環境や体内の生理状態を検知し、末梢組織の機能を制御する。したがって、脳が末梢組織を制御するメカニズムを解明することが、生体の恒常性メカニズムの理解に必要不可欠である。

脳による末梢組織の機能制御の多くは、ホルモン分泌と、交感神経系などの脳-末梢組織間の神経回路が担っている。これまで多くの研究が行われているが、ほとんどの研究は出発点(脳の神経細胞)または終着点(末梢組織)の解析にとどまり、その間を結ぶ脳-末梢組織間の神経回路の構造と機能の解析は、昨今の神経科学の技術進歩にも関わらず、いまだに進んでいない。特に、自由行動下の動物において脳-末梢間神経回路の活動がどのように変化するか、ほとんどわかっていない。この主な理由として、脳-末梢組織間を結ぶ神経細胞が全身に散在していることが挙げられる。神経系の解析に良く用いられる光遺伝学には、光ファイバーの生体の目的箇所への固定が必要である。また、神経細胞に目的遺伝子を発現するウイルスベクターも、目的箇所へ数十 $\mu\text{m}$ の精度で注入する必要がある。これらの技術は、神経細胞が密集して存在し頭蓋骨によりある程度固定されている脳では容易に行えるが、柔軟な末梢組織では困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では、「1. 研究開始当初の背景」に記載した困難を克服し、それぞれの末梢組織を制御する脳-末梢間神経回路の神経活動を特異的に計測できる、新しい手法を開発することを目標とした。そして、この手法により、自由行動下の動物において、脳から特定の末梢組織へつながる神経回路の活動を、世界で初めてリアルタイムで計測し、これまでの解析では得られなかった全く新しい観察結果を得ることを目指した。

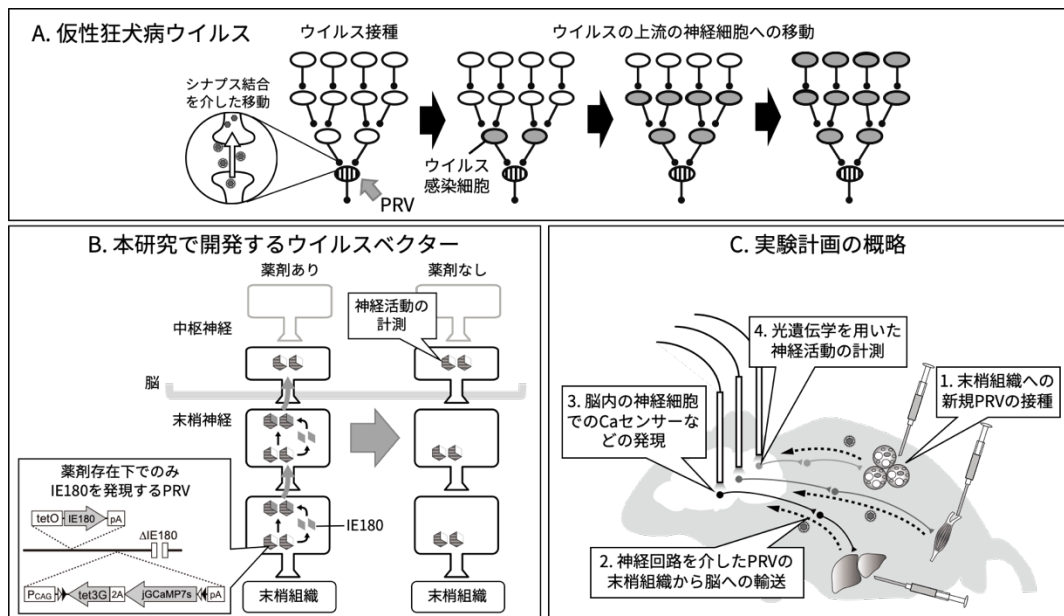
## 3. 研究の方法

本研究では、末梢組織中の神経活動を計測するのではなく、脳内の「各末梢組織へ接続する神経細胞」の活動を特異的に計測するという発想の転換により、脳-末梢組織間の神経回路の活動を計測することを目指した。

仮性狂犬病ウイルス(Pseudorabies virus; PRV)は、神経細胞へ感染後にシナプス結合を介して別の細胞に逆行的に(下流から上流の神経細胞へ)感染する(図 A)。目的の末梢組織の神経細胞に PRV が感染すると、PRV は順次輸送され最終的に脳の神経細胞へ感染する。したがって PRV を用いると、末梢組織を制御する脳の神経細胞を同定できる。しかし、ウイルス感染は毒性を持ち、細胞の生理状態に影響して細胞死を引き起こす。そのため現状では、光遺伝学などの解析手法と併用し、ウイルス感染細胞の神経活動の計測などを行うことができない。

研究代表者は最近、IE180 と呼ばれる遺伝子を欠損した PRV を元に「特定の神経細胞に直接投射する神経細胞に感染するが、毒性を持たない」新しい PRV の開発に成功した(論文準備中)。本研究ではこの知見を元に「末梢組織から脳まで移動して、脳の感染細胞に影響を与えず目的遺伝子を発現できる」新しい PRV の開発を行った。具体的には、薬剤の存在下でのみ IE180 を発現する PRV を開発し、このウイルスを目的の末梢組織に接種し、ウイルスが脳に到達するまで薬剤を投与し、その後は薬剤を除く。その結果、ウイルスは脳の神経細胞(ウイルスを接種した組織にシグナルを伝える)に感染するが、さらなる輸送は起こらず、感染細胞に安定的にカルシウムセンサーなどを発現できる(図 B)。このような処置を施したマウスの、ウイルス感染細胞が存在する脳領域に

光ファイバーを留置し、ファイバーフォトメリー法などで感染細胞のカルシウム濃度変化などを計測する。感染細胞の神経活動は、脳とウイルスを接種した末梢組織の間の神経回路の活動を反映しているため、この方法により、自由行動下でのマウスにおいて、脳と特定の末梢組織を結ぶ神経回路の活動状態の変化を計測することができる(図 C)。



#### 4. 研究成果

##### (1) 輸送を人為的に制御できる経シナプス性ウイルストレースターの作成

まず、薬剤(ドキシサイクリン)の存在下でのみ IE180 を発現し増殖できる PRV (Dox-on PRV) と、逆にドキシサイクリンの非存在下でのみ増殖できる PRV (Dox-off PRV) の作成をおこなった。組換え用シャトルベクターを構築し、IE180 欠損 PRV に発現ベクターを組み込んだ。次に培養細胞系を用いて、組み込み体の中で、薬剤依存的に増殖が制御できるウイルス株のスクリーニングを行い、少なくとも培養細胞において、薬剤により増殖が制御できる Dox-on PRV および Dox-off PRV の作出に成功した。

次にこれらの PRV の生体内での挙動を解析した。Dox-on PRV および Dox-off PRV をマウス脳に接種し、IE180 の発現およびウイルスの増殖・輸送への薬剤投与の影響を解析した。その結果、Dox-on PRV および Dox-off PRV のいずれのウイルスにおいても、薬剤の有無により IE180 の発現およびウイルスの増殖・輸送を当初の目的の通り制御できる事がわかった。一方で、Dox-on PRV と Dox-off PRV の結果を詳細に解析したところ、Dox-on PRV は薬剤の非存在下でもわずかな IE180 の発現が見られる事がわかった。Dox-off PRV ではこのような発現の「もれ」は観察されなかった。

さらに、これらの PRV において一度引き起こした増殖を止める事ができるかを検討した。Dox-on PRV については、ウイルス接種マウスを薬剤入エサで飼育後に通常エサで飼育し、Dox-off PRV については逆の組み合わせのエサで飼育した。その結果、Dox-off PRV においては、薬剤入エサで飼育することでウイルス感染細胞での IE180 の発現が大幅に減少し、増殖が止まっている様子が観察された。一方で、Dox on PRV ではこのような影響は限定的であった。

以上の結果から、Dox-off 型の PRV を用いることで、ウイルスの増殖・輸送期間、すなわちウイルスが感染する神経細胞の範囲を人為的に制御できる事がわかった。

##### (2) 神経活動の計測・操作が可能な経シナプス性ウイルストレースターの開発

研究代表者は、IE180 欠損 PRV が感染細胞に細胞死を引き起こさないことを見出していた。そこで本研究では、IE180 欠損 PRV を用いてチャネルロドプシンやカルシウムセンサーを発現させ、経シ

ナプス性ウイルスを用いて、神経活動の計測・操作を行うことを試みた。

まず、Cre リコンビナーゼ依存的にチャンネルロドプシン(ChR2)やカルシウムセンサー(GCaMP6s)を発現するPRVを作成した。これらのPRVをCre発現マウスに発現させ光ファイバーを留置し、発現タンパク質が機能することを検証した。その結果、ChR2を発現するPRVに感染したCre発現細胞は確かにChR2を発現し、さらに光照射により神経活性化マーカーであるc-Fosを発現した。また、GCaMP6sを発現するPRVに感染した細胞はGCaMP6sを高発現し、活性化する刺激(本実験ではストレスを用いた)によりカルシウム濃度の変化を検出することができた。以上の結果から、IE180欠損PRVを用いて、神経活動の計測・操作を行うことに成功した。

### (3) 将来展望

本研究の実施期間において、脳一末梢組織間の狙った細胞に目的遺伝子を発現させる技術(Dox-off PRV)、PRVを用いて神経活動の計測・制御を行う技術という、本研究の技術の根幹となる2つの技術開発に成功した。今後はこれらの技術を組み合わせることで、「C:研究の概略」に示したような末梢組織特異的、脳領域特異的な、脳一末梢組織間神経回路を構成する神経細胞の活動計測や活動操作を行う手法を開発する予定である。これにより、「自由行動下の動物において、脳から特定の末梢組織へつながる神経回路の活動を、世界で初めてリアルタイムで計測する」という本研究の最終目的を達成したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryuge A, Kosugi T, Maeda K, Banno R, Gou Y, Zaitso K, Ito T, Sato Y, Hirayama A, Tsubota S, Honda T, Nakajima K, Ozaki T, Kondoh K, Takahashi K, Kato N, Ishimoto T, Soga T, Nakagawa T, Koike T, Arima H, Yuzawa Y, Minokoshi Y, Maruyama S, Kadomatsu K	4. 巻 6
2. 論文標題 Basigin deficiency prevents anaplerosis and ameliorates insulin resistance and hepatosteatosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.142464	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 Izawa S, Yoneshiro T, Kondoh K, Nakagiri S, Okamatsu-Ogura Y, Terao A, Minokoshi Y, Yamanaka A, Kimura K	4. 巻 600
2. 論文標題 Melanin concentrating hormone producing neurons in the hypothalamus regulate brown adipose tissue and thus contribute to energy expenditure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 815 ~ 827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP281241	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤邦生
2. 発表標題 経シナプス性ウイルストレーサーと光を用いた神経回路解析
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kunio Kondoh
2. 発表標題 Development of new transsynaptic viral tracers
3. 学会等名 第 11 回 生理研 霊長研 新潟脳研 合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kunio Kondoh, Ken-ichi Inoue, Yasuhiko Minokoshi
2. 発表標題 Development of a new trans-synaptic viral tracing system with low cytotoxicity
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kunio Kondoh
2. 発表標題 Trans-synaptic protein expression in the nervous system using trans-synaptic viral vectors
3. 学会等名 19th International Conference on Retinal Proteins (ICRP2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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			
中国	中国科学院深セン先進技術研究院			
米国	プリンストン大学			