

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：63904
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500300
 研究課題名（和文） ウイルスベクターを使った皮質回路研究:6 層ニューロンの種間、領野間比較
 研究課題名（英文） Study on cortical circuit using viral vectors:
 Species/area-comparison of layer 6 neurons
 研究代表者
 渡我部 昭哉 (Watakabe Akiya)
 基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・准教授
 研究者番号：40290910

研究成果の概要（和文）： 大脳皮質回路を形成する興奮性錐体ニューロンの分類と特徴付けを目指して研究を行い、主に以下の2点の成果を得た。

（1）逆行性トレーサーの注入と、in situ hybridization 法を組合わせて、ラット大脳皮質における CCK と PCP4 遺伝子の発現が、6 層においてそれぞれ皮質、視床投射と対応することを見だし、それらの発現分布の領野差を明らかにした。（2）逆行性レンチウイルスベクターに TET-OFF システムによる発現増幅系を搭載した新規ベクターを開発し、マーモセット（新世界ザル）の対側投射ニューロンを可視化することに成功した。

研究成果の概要（英文）： The specific aim of this study was to classify and characterize the excitatory pyramidal neurons that constitute the cortical circuit. I obtained the following two new findings. (1) By combining the retrograde tracers with the in situ hybridization method, I found that CCK and PCP4 genes are expressed in the cortical and thalamic projection neurons in layer 6. Furthermore, the area differences of their distribution were revealed. (2) I developed a novel lentiviral-based retrograde vector system that carries TET-Off components for high-level transgene expression. This vector was used to visualize the callosal neurons of the marmoset (New World monkey) cortex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：

キーワード：（1）大脳皮質回路（2）ウイルスベクター（3）蛍光タンパク質（4）レンチウイルス（5）逆行性感染（6）TET 誘導（7）6 層ニューロン（8）マーモセット

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質ニューロンが、さまざまな

形態的特徴や、電気生理的特性をもつことは古くから知られている。特に GABA 作働性の抑制性ニューロンについては、サブタイプを

見分ける抗体が多いこともあり、研究が進んでいる。一方、興奮性の錐体ニューロンについては、統一的な理解は遅れていた。形態、投射タイプ、電気生理学的特性などにおいて多様性があることは分かっていたが、種、領野を超えて「同じ」サブタイプかどうかを確定するのは、今でも難しい。この最大の理由は、種、領野間を超えて共通する各ニューロンサブタイプの基本特性が理解されていないからである。

我々は、遺伝子発現をベースにしたニューロン分類が、種を通じて共通に使えるユニバーサルマーカーとなることを予想し、層特異的な遺伝子マーカーに注目して、分子比較解剖学的なアプローチを行っていた。その結果、ネズミとサルの大脳皮質層構造は、遺伝子発現パターンによって相同な部分と大きく変化している部分が存在することを見いだした(Watakabeら 2006, 2007)。つまり、興奮性錐体ニューロンには、基本特性を一にするいくつかのサブタイプが存在するが、同時に、種、領野による分化も著しく、単純な比較には注意を要する。本研究提案は、この状況を受け、種、領野を超えて保存されている哺乳類大脳皮質の作動原理を解明することを念頭に計画された。

2. 研究の目的

この研究提案は、2000年頃から継続して行っている大脳皮質興奮性ニューロンサブタイプ分類の延長である。この研究計画の期間内において明らかにする目標としては、申請時には、以下の3つを掲げた。

- (1) 遺伝子発現プロファイリングと投射タイプの関係を調べる
- (2) Nurr1 遺伝子が規定するニューロンタイプの特性を調べる
- (3) ウイルスを使った皮質回路解析法の開発

この3つの目標は、いずれも、ネズミとサルを比較しつつ行うことで、普遍的なニューロンタイプを同定し、その回路特性を解明することを目指している。特に研究課題名にある通り、他の層に比べて知見の少ない6層ニューロンの解析を目指した。

このうち、(1)、(3)について、興味深い結果が得られたので、研究をこの2点に絞って行い、一部の結果は論文として公表した。2)については、予備的データは出ているものの、まだ論文発表まで至っていない。

3. 研究の方法

本研究では、投射タイプ特異的な興奮性ニューロンの特性を遺伝子発現と形態から調べることを中心に行った。このための手法として、逆行性トレーサー、及び逆行性ウイルスベクターを使用した。

◎ 遺伝子発現プロファイリングと投射タイプの関係を調べる

ラットのさまざまな視床副核や、大脳皮質領野に逆行性トレーサーを注入し、その部位に投射するニューロンを標識したのち、サンプルを採取し、ISH法を行った。さまざまなマーカー遺伝子との共染色を行い、視床、及び、皮質投射ニューロンを特徴づけるマーカー遺伝子を検索した。

◎ ウイルスを使った皮質回路解析法の開発

狂犬病ウイルスのコートタンパクを使った、逆行性レンチウイルスベクターを使って、GFPやRFPなどの蛍光タンパク質を導入することで、特定の投射ニューロンを標識し、その形態を調べた。通常の方法だと、強力なプロモーターを使っても、観察に耐えるレベルの発現が得られなかったため、TETシステムによる増幅がかかるような新規ウイルスベクターを開発した。

4. 研究成果

- (1) CCKとPCP4遺伝子を用いたラット6層の興奮性ニューロン分類

CCK及びPCP4遺伝子は、6層において相補的

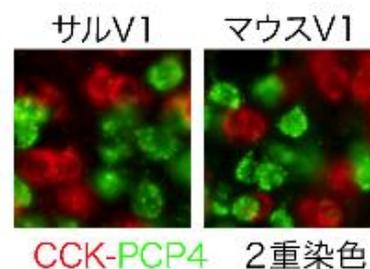


図1 CCK, PCP4 遺伝子プロンプによる染色で、2種類の6層ニューロンを染め分けることがで

な発現を示す(図1)。

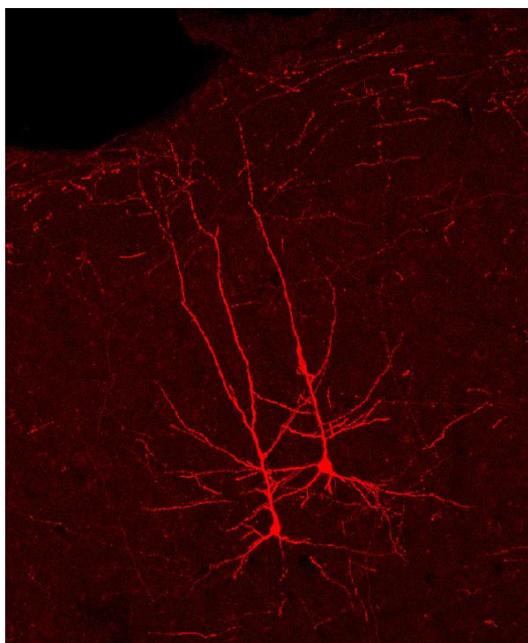
我々は、さまざまな視床、皮質への逆行性トレーサー注入実験を行い、この両者の発現が、それぞれ皮質投射、及び視床投射と高く相関することを見いだした。この2つのプローブを使って、ラット大脳皮質領野における細胞

サブタイプの分布状況を調べたところ、PCP4 遺伝子は、一次感覚野、CCK 遺伝子は連合野により多く分布していることが分かった。以上の結果は、J. Comp Neurol 誌に報告し、その号の表紙を飾った (図2)。



(2) 新規逆行性ベクターを使ったニューロンの形態解析

福島医科大学の小林らは、狂犬病ウイルスのコートタンパクを改良することで、高頻度逆行性遺伝子導入 (highly efficient retrograde gene transfer, HiRet) ウイルスベクターを



開発した。私は、この逆行性ウイルスベクターを使って霊長類脳に蛍光タンパク質遺伝子を導入し、特定の脳部位に投射する神経細胞の全体像を可視化することに挑戦した。しかし、従来の HiRet ウイルスベクターでは蛍光タンパク質の発現量が低いために、複雑な神経繊維の全体像を見ることはできなかった。そこで発現を増幅するために、TET-Off

システムを組み込んだ新しい逆行性ベクターシステム (以降逆行性 TET-Off ベクターと呼ぶ) を構築した。このシステムを用いる事で蛍光タンパク質が大量に作られ、神経細胞の微細構造の観察が可能となった。

この逆行性 TET-Off ベクターが霊長類脳でも使えるのかどうかを確かめるために、新世界ザルのマーモセットで実験を行った。マーモセットの大脳皮質は、マウスより大きく、大脳皮質内部でのつながり方も複雑さを増している。図3の例ではマーモセット大脳皮質に逆行性 TET-Off ベクターを注入し、1 cm (細胞体の約 1000 倍) 離れた反対側の大脳皮質で観察された神経細胞を示している。

この成果は PLOS ONE 誌に論文として公表し、プレスリリースも行った。

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 Kinoshita M, Matsui R, Kato S, Hasegawa T, Kasahara H, Isa, K, Watakabe A, Yamamori, T, Nishimura, Y, Alstermark, B, Watanabe, D, Kobayashi, K, Isa, T. (2012) Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates. Nature 487: 235-238. 査読有
- ② Watakabe A, Hirokawa J, Ichinohe N, Ohsawa S, Kaneko T, Rockland, KS, Yamamori, T. (2012) Area-specific substratification of deep layer neurons in the rat cortex. J Comp Neurol 520: 3553-3573. 査読有
- ③ Watakabe A, Kato S, Kobayashi K, Takaji M, Nakagami Y, Y, Sadakane, O, Ohtsuka, M, Hioki, H, Kaneko, T, Okuno, H, Kawashima, T, Bito, H, Kitamura, Y, Yamamori, T. (2012) Visualization of Cortical Projection Neurons with Retrograde TET-Off Lentiviral Vector. PLoS ONE 7: e46157. 査読有
- ④ Rossini L, Moroni RF, Tassi L, Watakabe A, Yamamori T, Spreafico, R, Garbelli, R. (2011) Altered layer-specific gene expression in cortical samples from patients with temporal lobe epilepsy. Epilepsia 52:

1928-1937. 査読有

- ⑤ Watakabe A, Komatsu Y, Ohsawa S, Yamamori T (2010) Fluorescent in situ hybridization technique for cell type identification and characterization in the central nervous system. Methods 52: 367-374. 査読有

- ⑥ 実験医学 2011年2月号
クローズアップ実験法
脳の蛍光 in situ hybridization 法
【渡我部 昭哉／小松勇介／山森哲雄】

〔学会発表〕(計4件)

- ①
渡我部 昭哉他6名
Differential labeling of the cortical projection neuron subpopulations by TET-double infection method (TEDD).
北米神経学会(2012年10月13-17日)米国ニューオーリンズにてポスター発表

- ②
渡我部 昭哉他5名
TET 2重感染法(TEDD)による皮質視床投射ニューロン形態の可視化
第34回日本神経科学学会(2011年9月16日)パシフィコ横浜(神奈川県)にてポスター発表。

- ③
渡我部 昭哉他11名 “TET-OFF”
LENTIVIRAL VECTORS DRIVE
HIGH-LEVEL TRANSGENE
EXPRESSION IN MARMOSSET BRAINS
北米神経学会(Neuroscience 2010)(2010年11月16日)San Diego(米国)にてポスター発表

- ④
渡我部 昭哉他11名 TET-OFF レンチウイルスベクターによるマーモセット脳への遺伝子導入
第33回日本神経科学学会(Neuro2010)(2010年9月2日)神戸コンベンションセンター(兵庫県)にてポスター発表

〔その他〕

ホームページ等

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

本研究に用いている in situ hybridization 法の普及を目的としたホームページの更新。

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡我部 昭哉 (WATAKABE AKIYA)
基礎生物学研究所・脳生物学研究部門・
准教授
研究者番号：40290910

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：