

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650063

研究課題名 改変狂犬病ウイルスベクターによる新しい神経回路トレーシング手法の開発

研究課題名（英文） Development of novel vector systems for neuronal tracing based on recombinant rabies virus vectors.

研究代表者

井上 謙一（INOUE KEN-ICHI）

京都大学・霊長類研究所・特定助教

研究者番号：90455395

研究成果の概要（和文）：

本研究では、神経回路解析に有用なトレーシングシステムを実現するための基盤的技術として、狂犬病ウイルスベクターを初めとするベクターシステムの開発を行った。まず、まず神経解剖学において有用な越シナプスのトレーサーとして使用されている狂犬病ウイルス CVS 株をベースとした伝播能欠損型ベクターを開発し、挿入するマーカートンパク質（蛍光蛋白質）の発現量を増強する為の改変を行った。また、アデノ随伴ウイルスベクターおよびレンチウイルスベクター構築と回収法の検討を行い、霊長類において実用可能な力価・精製度を持つベクターの作製に成功した。これらのベクターを用いて、ベクターの多重感染により目的細胞選択的な外来遺伝子発現制御が可能であることを霊長類において明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Recombinant viral tracers which can cross synapses and can express foreign genes are useful to study neural circuitry. However, for accurate and detailed analysis of neural circuits, a technique for the control of trans-synaptic transfer is required. We have constructed new rabies virus vectors by manipulating their genome. We first deleted the glycoprotein gene of the vector to extinguish the ability of trans-synaptic transfer from them. Then, we improved recovery systems for the vector which can efficiently express foreign genes in neurons. We also established efficient recovery systems for lentiviral vector and adeno-associated virus vector to use them in the primate brain. Using these vectors, we developed of novel vector system that enables us to induce target gene expression in a specific group of neurons that constitutes a particular pathway in the brain. These results indicate that viral vectors created in this study can be used for selective and efficient transsynaptic neuronal tracing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	360,000	3,060,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学、脳・神経、ウイルスベクター、解剖学

1. 研究開始当初の背景

脳機能（特に高次脳機能）の発現・制御機構を解明するためには、大脳皮質に張り巡らされたネットワークの基本的構築、すなわち、特定の皮質領域における入出力回路や局所情報処理回路の様式を解明することが必要不可欠である。しかしながら大脳新皮質では内部神経回路が複雑であるがために、神経回路を対象とした研究の進展が阻まれている。このため、複数の神経細胞のシナプス結合により形成される神経回路の全容を明らかにできる有用な手法の確立が急務となっている。近年、狂犬病ウイルスなどの神経向性ウイルスを用い、ニューロンの越シナプス性ラベルにより複数の領域を介する多シナプス性神経回路を同定するラベル法が試みられ、大脳皮質、大脳基底核、小脳などを巡るネットワークの構築様式が解析されてきた。狂犬病ウイルスはニューロンの軸索末端に特異的に感染し、逆行性のみ感染が伝播するため、特に収束性入力を持つ神経回路の解析に有用性が高い。しかしながら、この手法にはシナプスを介した伝播が早く起こるためにラベルされたニューロンが何次ニューロンであるかを同定できないという問題点があり、局所神経回路や領域間神経ネットワークの構築様式を正確に記述する為のツールとしては不十分であった。

2. 研究の目的

上記のような問題点を克服するトレーシングシステムを実現するためには、シナプスを介した感染伝播能を失った逆行性感染型ウイルスベクターと、同ベクターに感染伝播能を付与することが出来る別のウイルスベクターによる伝播制御が必要となる。このようなベクターシステムを実現するため、本研究ではまず基盤となる2つの技術開発を目指した。まず、神経解剖学において有用な越シナプスのトレーサーとして使用されている狂犬病ウイルス CVS 株をベースとした伝播能欠損型ベクターを開発し、実用可能な外来遺伝子の発現量および回収効率を実現することを目指した。次いで、アデノ随伴ウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いて、ベクターの多重感染により外来遺伝子の発現制御を *in vivo* で実現するベクターシステムの実現を目指した。この両者を組み合わせることで、目的細胞選択的なトレーシングシステムの実現が可能となると考えられる。また、本研究では、特定の神経路を選択的に

排除する逆行性越シナプスのトレーシング法の実現のため、感染伝播を阻害するシステムの開発も目的とした。

3. 研究の方法

まず、神経解剖学において有用な越シナプスのトレーサーとして使用されている狂犬病ウイルス CVS 株を感染伝播能欠損型ベクターとして利用できるよう、脳内継代株である狂犬病ウイルス CVS-26 株のフルゲノム配列、改変ハンマーヘッドリボザイム、D 型肝炎ウイルスリボザイム配列を含むベクタープラスミドを構築する。また、狂犬病ウイルス CVS-26 株の各構成遺伝子を、哺乳類細胞における高発現が期待出来るプラスミドベクターに挿入し、ウイルスゲノム cDNA から感染性ウイルス粒子を得る回収系を構築する。その後、ウイルスの外被タンパクをコードする遺伝子をウイルスゲノムから欠損させたゲノムプラスミドを作製し、伝播能欠損型ベクターを回収する系を構築する。その際、霊長類神経系で実用可能なレベルの高力価のベクターが得られるよう、ベクター回収効率の改良を行う。また、このベクターにマーカー蛋白質を挿入する際、マーカー蛋白質挿入部位や周辺配列などを検討し、*in vivo* での使用に適した高発現型のベクターを開発する。

また、感染伝播制御用ベクターとして、アデノ随伴ウイルスベクター・レンチウイルスベクターの構築と回収法の検討を行い、霊長類において実用可能な力価・精製度を持つベクターを作製する。これらのベクターと Cre/loxP 部位特異的組換え反応およびテトラサイクリン依存性遺伝子発現制御システムを応用して、神経路選択的な外来遺伝子発現制御を実現するベクターシステムを構築し、霊長類においてシステムが機能することを確認する。

さらに、狂犬病ウイルスのポリメラーゼ蛋白質に対する細胞内抗体の、狂犬病ウイルス固定株の感染伝播に対する阻害効果を検討し、良好な阻害効果が見られた場合、この細胞内抗体を用いた、感染伝播阻害型ベクターシステムの開発を検討する。

4. 研究成果

国立感染症研究所の協力を得て、神経解剖学において有用な越シナプスのトレーサーとして使用されている狂犬病ウイルス CVS 株を感染伝播能欠損型ベクターとして利用で

きるよう、脳内継代株である狂犬病ウイルス CVS-26 株のフルゲノム配列、改変ハンマーヘッドリボザイム、D 型肝炎ウイルスリボザイム配列を含むベクタープラスミドを構築した。また、狂犬病ウイルス CVS-26 株の各構成遺伝子を哺乳類細胞における高発現が期待出来るプラスミドベクターに挿入し、これらの新規作成プラスミドベクターを用いた回収系により、ウイルスゲノム cDNA から感染性ウイルス粒子が高効率に得られることを確認した。感染伝播能欠損型ベクターを複製するため、ウイルスの外被タンパクをコードする遺伝子をウイルスゲノムから欠損させたゲノムプラスミドを複製した。ゲノムの遺伝子間領域に外来遺伝子発現の為の配列を挿入する際、挿入部位や挿入部位付近の配列を検討し、挿入するマーカータンパク質（蛍光蛋白質）の発現量が従来型と比べ飛躍的に増強する伝播能欠損型ベクターの構築を行った。また、ウイルス回収率を向上して高力価のベクターを得るために回収法を検討し、神経芽腫細胞を用いた高力価ベクター回収系を構築した。

感染伝播制御用ベクターとして、アデノ随伴ウイルスベクター・レンチウイルスベクターの構築と回収法の検討を行い、霊長類において実用可能な力価・精製度を持つベクターの作製に成功した。逆行性感染型ベクターを目的細胞の投射領域に、順行性感染型ベクターを目的細胞の細胞体存在領域に注入する実験を行った結果、Cre/loxP 部位特異的組換え反応およびテトラサイクリン依存性遺伝子発現制御システムを応用した神経路選択的な外来遺伝子発現制御が霊長類において効率的に機能していることを確認した。また、特定の神経路を選択的に排除する逆行性越シナプスのトレーシング法の実現のため、狂犬病ウイルスのポリメラーゼ蛋白質に対する細胞内抗体をベクターにより細胞に強制発現させることを試みた。その結果、細胞内抗体の発現が狂犬病ウイルス CVS 株の感染伝播を阻害することが確認された。上記の成果により、特定の細胞集団において、狂犬病ウイルスベクターの感染伝播を OFF から ON に、あるいは ON から OFF に制御し、特定の神経路に限定した回路解析を行う為の基盤的技術の開発に成功した。

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 8 件）

- ① 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. 597-603, DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300831
- ② Hiraoka M, Inoue K, Kawano H, Takada M (2012) Localization of papillofoveal bundles in primates. *Anat Rec*, 査読有, Vol. 295, pp. 347-354, DOI: 10.1002/ar.21519
- ③ Kato S, Kuramochi M, Takasumi K, Kobayashi K, Inoue K, Takahara D, Hitoshi S, Ikenaka K, Shimada T, Takada M, Kobayashi K (2011) Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein. *Hum Gene Ther*, 査読有, Vol. 22, pp. 1511-1523, DOI: 10.1089/hum.2011.111
- ④ Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M (2011) Differential architecture of multisynaptic geniculo-cortical pathways to V4 and MT. *Cereb Cortex*, 査読有, Vol. 21, pp. 2797-2808, DOI: 10.1093/cercor/bhr078
- ⑤ Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, Yaginuma H, Morimoto K, Shimada T, Takada M, Kobayashi K (2011) A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. *Hum Gene Ther*, 査読有, Vol. 22, pp. 197-206, DOI:10.1089/hum.2009.179
- ⑥ Saga M, Hirata Y, Takahara D, Inoue K, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Hoshi E (2011) Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor area in macaques. *Eur J Neurosci*, 査読有, Vol. 33, pp. 285-297, DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07492.x
- ⑦ Hiraoka M, Inoue K, Ohtaka-Maruyama C, Ohsako S, Kojima N, Senoo H, Takada M. (2010) Intracapsular organization of ciliary zonules in monkey eyes. *Anat Rec*, 査読有, Vol. 293, pp. 1797-804, DOI: 10.1002/ar.21220
- ⑧ Hashimoto M, Takahara D, Hirata Y, Inoue K, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Hoshi E (2010) Motor and nonmotor projections from the cerebellum to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor cortex in macaques. *Eur J Neurosci*, 査読有, Vol. 31, pp. 1402-1413, DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07151.x

[学会発表] (計 14 件)

- ① 井上謙一、高田昌彦 (2012) 霊長類パーキンソン病モデルの作製と同モデルを用いた遺伝子治療研究、神経疾患のモデル動物研究会(招待講演)、2012. 1. 14、大阪大学・大阪
- ② Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K.-I, Takada M (2011) Organization of multisynaptic top-down pathways from frontal cortex to visual areas MT and V4 in macaques. 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2011. 11. 14, Washington, DC. USA.
- ③ 小林和人、加藤成樹、倉持真人、小林憲太、井上謙一、高田昌彦 (2011) 高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの霊長類脳科学への応用、第 34 回日本神経科学大会(シンポジウム)、2011. 9. 17、パシフィコ横浜・横浜
- ④ 倉持真人、加藤成樹、小林憲太、高住賢司、高原大輔、井上謙一、島田 隆、高田昌彦、小林和人 (2011) 脳機能研究のための神経特異的な高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの開発、第 34 回日本神経科学大会、2011. 9. 17、パシフィコ横浜・横浜
- ⑤ 二宮太平、澤村裕正、井上謙一、高田昌彦 (2011) マカクザル前頭葉から MT および V4 への多シナプス性入力様式、第 34 回日本神経科学大会、2011. 9. 17、パシフィコ横浜・横浜
- ⑥ 井上謙一、額額大輔、加藤成樹、小林和人、南部 篤、高田昌彦 (2011) イムノトキシン神経路標的によるサル大脳基底核ハイパー直接路の選択的除去、第 34 回日本神経科学大会、2011. 9. 15、パシフィコ横浜・横浜
- ⑦ Inoue K, Kato S, Kobayashi K, Takada M (2011) Development in pathway-selective gene delivery and neuronal ablation with enhanced retrograde transfer of a modified lentiviral vector in primate brain. The 8th IBRO World Congress Of Neuroscience, 2011. 7. 14, Florence, Italy.
- ⑧ Takahara D, Inoue K, Hirata Y, Miyachi S, Nambu A, Takada M, Hoshi E (2010) Multisynaptic inputs from the temporal cortex to the dorsal premotor cortex in macaques. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2010. 11. 17, San Diego, CA, USA.
- ⑨ Inoue K, Kato S, Takahara D, Endo A, Okuda Y, Kobayashi K, Kobayashi K, Takada M (2010) Development in

pathway-selective gene expression and cell ablation by using modified lentiviral vectors with retrograde transport in primates. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2010. 11. 15, San Diego, CA, USA.

- ⑩ Hirata Y, Inoue K, Takahara D, Takada M, Hoshi E (2010) Frontal lobe inputs to the shoulder region of the dorsal premotor area in macaque monkeys. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2010. 11. 14, San Diego, CA, USA.
- ⑪ 高原大輔、平田快洋、井上謙一、宮地重弘、南部 篤、高田昌彦、星 英司 (2010) 腹側前頭前野から背側運動前野への多シナプス性入力、第 33 回日本神経科学大会 2010. 9. 4、神戸国際会議場・神戸
- ⑫ 井上謙一、加藤成樹、高原大輔、遠藤 歩、奥田泰宏、小林憲太、小林和人、高田昌彦 (2010) 逆行性感染型レンチウイルスベクターを用いた神経路選択的細胞操作法の開発、第 33 回日本神経科学大会 2010. 9. 4、神戸国際会議場・神戸
- ⑬ 星 英司、佐賀洋介、高原大輔、平田快洋、井上謙一、宮地重弘、南部 篤、丹治 順、高田昌彦 (2010) マカクザルにおける大脳基底核から背側運動前野への多シナプス性入力、第 33 回日本神経科学大会 2010. 9. 3、神戸国際会議場・神戸
- ⑭ 二宮太平、澤村裕正、井上謙一、高田昌彦 (2010) マカクザルの前頭葉から 4 次視覚野への多シナプス性入力様式、第 33 回日本神経科学大会、2010. 9. 3、神戸国際会議場・神戸

[図書] (計 1 件)

- ① Kato S, Kuramochi M, Kobayashi K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K Intech (Croatia) Viral Gene Therapy (edited by Ke Xu) 2011 pp. 450

[その他]

ホームページ等

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・特定助教

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

星 英司 (HOSHI EIJI)
東京都医学研究機構・東京都医学総合研究
所・副参事研究員
研究者番号：50407681

宮地 重弘 (MIYACHI SHIGEHIRO)
京都大学・霊長類研究所・准教授
研究者番号：60392354

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