

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560436

研究課題名(和文)二重遺伝子導入システムを利用した特定神経路の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of specific neural pathway using double viral vector system

研究代表者

小林 憲太 (KOBAYASHI, Kenta)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：70315662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳の機能は複雑な神経回路網によって制御されている。脳機能を理解するためには、回路網を形成する特定神経路の機能を解析する必要がある。Rho GTPaseは、標的タンパク質の一つであるRho-kinaseを介して、種々の神経機能を調節することが明らかにされつつある。本研究では、我々が独自に開発した高頻度逆行性遺伝子導入ベクターと、アデノ随伴ウイルスベクターを組み合わせた二重遺伝子導入システムを駆使して、皮質線条体路を形成する大脳皮質ニューロンの生存にRho/Rho-kinaseシグナル伝達系が重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Brain functions are controlled by the complicated neural circuit. In order to understand brain functions, we need to analyze each specific neural pathway, a component of the neural circuit. Rho GTPase signaling pathway via Rho-kinase, one of the major effector molecules of Rho, is becoming increasingly clear to regulate various neuronal functions. In the present study, by using a dual viral vector approach combining a neuron-specific retrograde gene transfer lentiviral vector and an adeno-associated virus vector, we demonstrated that the Rho/Rho-kinase signaling pathway was essential for the survival of cortical neurons forming the corticostriatal pathway.

研究分野：分子神経科学

キーワード：Rho GTPase Rho-kinase ウイルスベクター 皮質線条体ニューロン アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

脳機能は複雑な神経回路網によって制御されており、脳機能を理解するには、複雑な回路網を構成する特定神経路を持つ役割を分子レベルで解明する必要がある。低分子量GTP結合タンパク質 Rho ファミリーとその関連分子は、種々の重要な細胞応答を制御することが知られているが、脳機能における役割は不明な点が多い。我々は、軸索の末端から感染して細胞体へと逆行性に遺伝子を導入出来る新規のレンチウイルスベクター（高頻度逆行性遺伝子導入ベクター）を独自に開発した。また、特定神経路における分子機能解析を可能にするために、高頻度逆行性遺伝子導入ベクターとアデノ随伴ウイルスベクター（AAV ベクター）を組み合わせた二重遺伝子導入システムを開発した。二重遺伝子導入システムを利用して、特定神経路における Rho ファミリーとその関連分子の網羅的な機能解析に取り組んだ。

2. 研究の目的

高次脳機能は緻密な神経回路網によって制御されるが、脳機能を解明するためには、特定神経路を持つ生理機能の分子基盤を理解する必要がある。しかし、このような解析に適用することが出来る有用な実験ツールが存在していなかったため、特定神経路の機能を解析することは不可能であった。ところが、我々のグループが、高頻度逆行性遺伝子導入ベクター<sup>1),2)</sup>と AAV ベクターを組み合わせた二重遺伝子導入システムの開発に成功したことによって、特定神経路を持つ機能を分子レベルで解析することが可能となり、すでに研究利用もされている<sup>3),4)</sup>。Rho ファミリー関連分子は、種々の重要な細胞機能を調節する多機能分子群であり、神経発生の過程でも重要な役割を果たすことが明らかにされているが<sup>5),6)</sup>、脳機能における役割は不明な点が多い。本研究では、生理学的・解剖学的に詳細な解析が行われている大脳基底核回路をモデルとして着目し、特に、大脳皮質-線条体路と黒質-線条体路に焦点を当てた。これらの神経路における Rho ファミリー関連分子の機能を網羅的に解析し、統合的に理解することを目的とした。

- (1) Kobayashi K, *et al.* (2016) Altering entry site preference of lentiviral vectors into neuronal cells by pseudotyping with envelope glycoproteins. *Methods Mol Biol* 1382:175-186.
- (2) Kato S, *et al.* (2013) Dissecting circuit mechanisms by genetic manipulation of specific neural pathways. *Rev Neurosci* 24:1-8.
- (3) Kinoshita M, *et al.* (2012) Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates. *Nature* 487:235-238.
- (4) Wahl AS, *et al.* (2014) Asynchronous

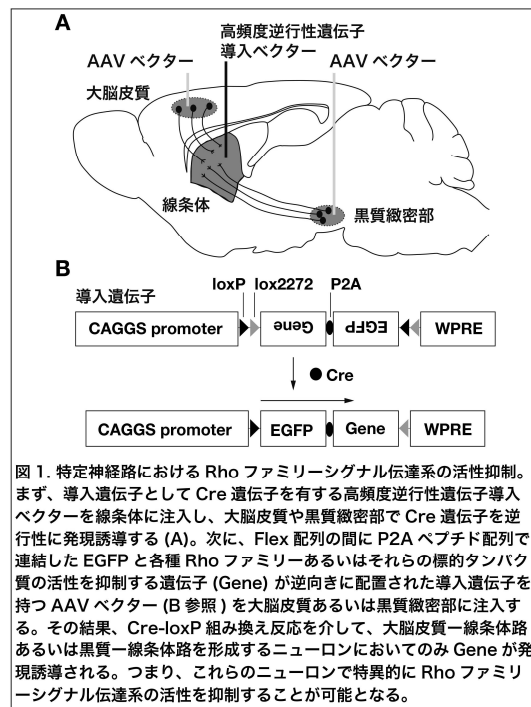
therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke. *Science* 344:1250-1255.

(5) Kobayashi K, *et al.* (2004) Survival of Developing Motor Neurons Mediated by Rho GTPase Signaling Pathway through Rho-Kinase. *J Neurosci* 24:3480-3488.

(6) Kobayashi K, *et al.* (2011) Rho/Rho-kinase signaling pathway controls axon patterning of a specified subset of cranial motor neurons. *Eur J Neurosci* 33:612-621.

3. 研究の方法

二重遺伝子導入システムを用いて、大脳皮質-線条体路あるいは黒質-線条体路において、Rho ファミリー (Rho, Rac, Cdc42) と Rho の標的タンパク質の一つである Rho-kinase、それぞれの活性が抑制されたマウスの網羅的な作出を試みた(図1)。これらの遺伝子改変マウスを利用して、分子生物学・組織学・行動生理学な実験手法を駆使しながら、特定神経路における Rho ファミリーシグナル伝達系の機能解析に取り組んだ。



(1) 分子細胞生物学的解析

Rho, Rac, Cdc42, Rho-kinase それぞれの活性を抑制する遺伝子 (Gene) を有する AAV-Flex-GFP-Gene ベクター (図1) を作製した。

(2) 組織学的解析

Cre 遺伝子を有する高頻度逆行性遺伝子導入ベクターをマウスの線条体に注入し (図1)、Cre 遺伝子を大脳皮質や黒質緻密部に逆行性に発現誘導した。次に、各種 AAV-Flex-GFP-P2A-Gene ベクターを大脳皮質や黒質緻密部に注入して (図1) 皮質-線条

体路と黒質-線条体路でそれぞれの Gene が発現誘導されるマウスを網羅的に作製し、これらの動物における Gene の発現を観察した。

### (3) 行動生理学的解析

Gene を発現するマウスを利用して Open field test を行い、自発運動量を測定すると同時に静止時の姿勢等を観察した。また、メタンフェタミン投与による運動量の変化を測定した。

Gene を発現するマウスを利用して RotaRod test を行い、運動学習能力を測定した。

## 4. 研究成果

(1) 二重遺伝子導入システムの検討。まず最初に、二重遺伝子導入システムが機能するか否かを検討するコントロール実験として、このシステムを用いて、皮質-線条体路と黒質-線条体路それぞれを形成するニューロンに緑色蛍光蛋白質 EGFP の発現誘導を試みた。その結果、皮質線条体ニューロンでは多くの EGFP 陽性細胞が確認出来たが(図 2)、黒質

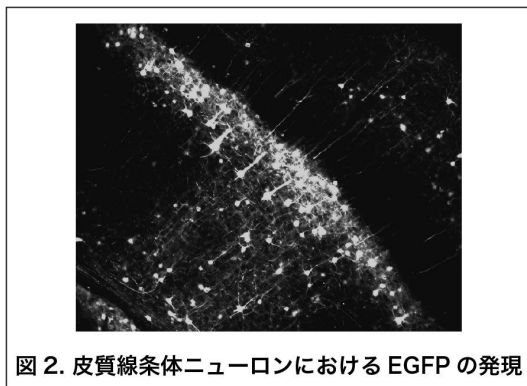


図 2. 皮質線条体ニューロンにおける EGFP の発現

線条体ニューロンでは殆ど確認出来なかった。黒質線条体路においては、高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの逆行性遺伝子導入効率が極めて低いことが分かったので、この神経路を解析するためには、現行の高頻度逆行性遺伝子導入ベクターを改良して、新たなベクターを開発する必要がある。従って、以後の解析は、皮質線条体ニューロンに焦点を当てて実行した。なお、皮質領域における EGFP 陽性シグナルは、NeuN 陽性の神経細胞に認められることを確認した(図 3)。

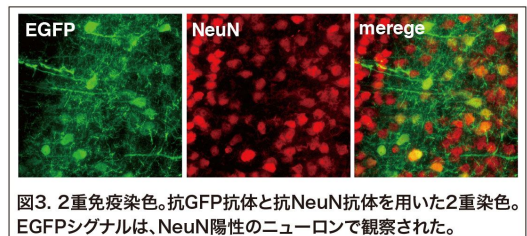


図 3. 2重免疫染色。抗EGFP抗体と抗NeuN抗体を用いた2重染色。EGFPシグナルは、NeuN陽性のニューロンで観察された。

(2) 皮質線条体ニューロンにおける Rho, Rac, Cdc42, Rho-kinase それぞれの活性抑制。皮質線条体ニューロンにおいて Rho, Rac, Cdc42, Rho-kinase それぞれの活性を抑制するために、二重遺伝子導入システムを利用して、ボツリヌス菌の菌体外毒素である C3 ト

ランスフェラーゼ、Rac ドミナントネガティブ変異体、Cdc42 ドミナントネガティブ変異体、Rho-kinase ドミナントネガティブ変異体をそれぞれ発現誘導した遺伝子改変マウス(C3 マウス、Rac DN マウス、Cdc42 DN マウス、Rho-K DN マウス)を作製した。C3 トランスフェラーゼ及びそれぞれのドミナントネガティブ変異体の発現を確認した。

(3) 遺伝子改変マウスを利用した自発運動量とメタンフェタミン投与による運動量変化の測定。それぞれの遺伝子改変マウスとコントロールマウス(EGFP マウス)の自発運動量を Open field test によって測定し、比較したところ、有為差は認められなかった。また、メタンフェタミン投与による運動量変化にも有為差は認められなかった。

(4) 遺伝子改変マウスを利用した運動学習能力の測定。それぞれの遺伝子改変マウスとEGFP マウスの運動学習を RotaRod test によって測定し、比較したところ、有為差は認められなかった。

(5) 遺伝子改変マウスにおける皮質線条体ニューロンの生存検定。運動を検討するための基本的な behaviour テストにはいずれのマウスにも顕著な表現型は認められなかったため、次に、皮質線条体ニューロンの生存を組織化学的に検討した。その結果、C3 マウスの皮質線条体ニューロンが、4 週間ではほぼ半減していることを見出した(図 4)。さらに、この細胞数の減少は、Caspase-3 依存性のアポトーシスに起因することが分かった(図 5)。

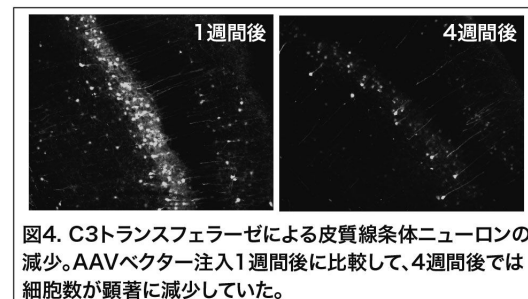


図 4. C3トランスフェラーゼによる皮質線条体ニューロンの減少。AAVベクター注入1週間後に比較して、4週間後では細胞数が顕著に減少していた。

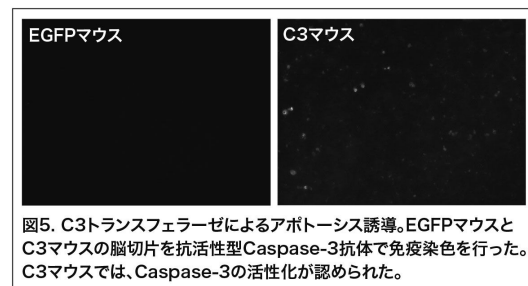


図 5. C3トランスフェラーゼによるアポトーシス誘導。EGFPマウスとC3マウスの脳切片を抗活性型Caspase-3抗体で免疫染色を行った。C3マウスでは、Caspase-3の活性化が認められた。

一方、Rac DN マウスと Cdc42 DN マウスでは、皮質線条体ニューロンの減少は観察されなかったことから、皮質線条体ニューロンの生存には、Rho シグナル伝達系が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに興味深いことに、Rho-K DN マウスが C3 マウスと類似した表現型を示すことを見出しており、Rho-kinase を介した Rho シグナル伝達系が皮質線条体ニューロンの生存に必須の

役割を担っていることを明らかにした。これらの研究結果は、現在、学術雑誌に投稿中である。

本研究結果は、以下のような理由で非常にインパクトがあるものと考えられる。

Rho シグナル伝達系が、成熟期ニューロンの生存に重要な役割を果たしていることを示した最初の研究例である。

特定神経路を形成するニューロンにおけるシグナル伝達分子の網羅的な生理機能解析を可能にした。

今後は、第一に、本研究で検討した分子以外の Rho ファミリー関連分子の解析を進めることによって、皮質-線条体路の生存に重要な役割を果たす分子群を網羅的に同定する必要がある。次に、C3 マウスや Rho-K DN マウスをはじめ、その他の Rho ファミリー関連分子の活性が抑制された遺伝子改変マウスが、アルツハイマー病等の新たなモデル動物となり得るか否かを検討することが必要である。新たなモデル動物の確立に成功すれば、アルツハイマー病等の新しい治療法や薬品の開発に大きく貢献出来る可能性があり、応用医学の分野にも大きな進歩をもたらすことが期待される。

## 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5件)

Kobayashi K, Kato S, Inoue K, Takada M, Kobayashi K (2016) Altering entry site preference of lentiviral vectors into neuronal cells by pseudotyping with envelope glycoproteins. *Methods Mol Biol* 1382:175-186. doi: 10.1007/978-1-4939-3271-9\_12. (査読有)

Nagai T, Nakamuta S, Kuroda K, Nakauchi S, Nishioka T, Takano T, Zhang X, Tsuboi D, Funahashi Y, Nakano T, Yoshimoto J, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Miura M, Nishi A, Kobayashi K, Yamada K, Amano M, Kaibuchi K (2016) Phosphoproteomics of the Dopamine Pathway Enables Discovery of Rap1 Activation as a Reward Signal In Vivo. *Neuron* 89:550-565. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.019. (査読有)

Ishida A, Isa K, Umeda T, Kobayashi K, Kobayashi K, Hida H, Isa T (2016) Causal Link between the Cortico-Rubral Pathway and Functional Recovery through Forced Impaired Limb Use in Rats with Stroke. *J Neurosci* 36:455-467. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2399-15.2016. (査読有)

Wahl AS, Omlor W, Rubio JC, Chen JL, Zheng H, Schröter A, Gullo M, Weinmann O, Kobayashi K, Helmchen F, Ommer B, Schwab ME (2014) Asynchronous therapy restores

motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke. *Science* 344:1250-1255. doi: 10.1126/science.1253050. (査読有)

Kato S, Kobayashi K, Kobayashi K (2014) Improved transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene transfer by optimizing the junction of fusion envelope glycoprotein. *J Neurosci Methods* 227:151-158. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.02.015. (査読有)

[学会発表](計4件)

Kenta Kobayashi, Survival of Corticostriatal Neurons by Rho GTPase signaling pathway, *Neuroscience* 2015, 2015.10.18, Chicago, United States of America.

小林憲太、ウイルスベクターを利用した脳機能解析、第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会、2014.11.21、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Kenta Kobayashi, Functional Analysis of Rho GTPase Signaling in Specific Neuronal Pathway using Newly developed Genetic Manipulation Technology, 9th FENS Forum of Neuroscience, 2014.7.7, Milan, Italy.

小林憲太、特定神経路における Rho GTPase シグナル伝達系の機能解析、2013.6.20、Neuro 2013、京都国際会議場(京都府京都市)

[図書](計2件)

小林憲太、実験医学、ウイルスベクターを利用した神経科学研究、2015、3093-3095

小林憲太、(株)技術情報協会、レンチウイルス、遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発、2014、224-227

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 憲太 (KOBAYASHI, Kenta)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：70315662