

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871060

研究課題名(和文) マウス一次視覚野に投射する視床神経細胞の多様性の解明

研究課題名(英文) Diversity of thalamic relay neurons projecting to mouse primary visual cortex

研究代表者

森 琢磨 (MORI, Takuma)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70545798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病ウイルスを用いた単シナプストレース法を用いて、大脳新皮質神経細胞にシナプス入力する細胞の分布を解析した。狂犬病ウイルスは毒性の違いによる実験株が多く存在するが、それぞれの実験株に由来する糖タンパク質を用いて単シナプストレースを実施した結果、糖タンパク質によってトレースされる細胞が異なることが明らかになった。特に、動物個体に毒性の低いウイルスは神経細胞だけでなくグリア細胞にも感染することが明らかになった。このことから、グリア細胞への感染がウイルスの毒性を低下させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I analyzed the distribution of presynaptic cells to layer 2/3 pyramidal cells of mouse neocortex using rabies monosynaptic tracing. Rabies virus is various among a group of various experimental strains. I used rabies glycoproteins originated from two different strains of rabies virus for the monosynaptic tracing. I found that monosynaptic tracing using different strains of rabies glycoprotein visualized distinct types of cells in mouse brain. An avirulent rabies glycoprotein helped rabies virus to infect not only neurons but also glial cells around the injection site. Considering that some glial cells, such as astrocytes and microglia, contribute to the immune system, these results suggest that infection of rabies virus to glial cells may decrease the virulence of rabies virus.

研究分野：神経科学

キーワード：狂犬病ウイルス 神経回路トレース

1. 研究開始当初の背景

マウス LGN-V1 神経回路では、LGN からの軸索分布様式をもとに、4 層興奮性神経細胞がおもに解析されてきた。4 層のみならず 2/3 層錐体細胞も、LGN 軸索が投射している浅層と 4 層に樹状突起を持つが、これら錐体細胞がそれぞれの層でどのような LGN 細胞サブタイプからシナプス入力を受けているのかは不明である。ネコやサルの X, Y, W 型 LGN 中継細胞はそれぞれ異なる視覚刺激に反応し、出力先である V1 神経細胞の視覚反応特性に影響を与える。これらの結果をもとに研究代表者は、マウス V1 で観察される多様な視覚反応選択性の形成過程を理解する上で、LGN から 2/3 層および 4 層の錐体細胞樹状突起に対する直接的シナプス入力を明らかにすることが重要であると考え、本研究課題を計画した。

研究代表者はこれまで、実際にシナプス結合する機能的神経回路を可視化することを目的として、形態解析用狂犬病ウイルスの開発に従事してきた。狂犬病ウイルスはシナプスを越えて神経細胞に逆行性感染する特性があり、シナプス結合する神経回路網の可視化に利用されてきた。研究代表者はその狂犬病ウイルスの遺伝子を改変することで、単一シナプスだけしか越えることのできない糖タンパク欠損狂犬病ウイルスベクター（以下単に、遺伝子改変狂犬病ウイルス）を作成した。そしてその遺伝子改変狂犬病ウイルスを用いて、単一神経細胞に実際にシナプス結合するシナプス前細胞だけを可視化する、「単シナプス性神経回路トレース法」を開発し、*in vivo* 動物にも応用する *in vivo* 単シナプス性神経回路トレース法もすでに開発した。

2. 研究の目的

本研究課題は、マウス視床-皮質回路における並列神経回路の存在を検証する。その

ために、マウス新皮質 2/3 層および 4 層の各錐体細胞に直接シナプス入力する視床中継細胞のサブタイプの同定、そして各視床中継細胞の新皮質における軸索投射パターンの解明を目指す。1 年目は、マウス新皮質 2/3 層および 4 層に分布する錐体細胞に直接シナプス入力する視床中継細胞サブタイプを解析する。各層の錐体細胞を対象として単シナプス性神経回路トレース法を適用し、シナプス入力する視床中継細胞のサブタイプを可視化し、その樹状突起形態と視床内分布を明らかにする。2 年目は、視床中継細胞の皮質内軸索投射パターンをサブタイプごとに明らかにする。少数の視床中継細胞をウイルスベクターで可視化し、新皮質における軸索の分布、および視床中継細胞サブタイプが錐体細胞にシナプス結合する細胞内サブドメインを解析する。

3. 研究の方法

A. 子宮内エレクトロポレーションによる遺伝子導入

単シナプス性神経回路トレース法では、遺伝子改変狂犬病ウイルスの選択的感染を可能にするトリ白血病ウイルス受容体遺伝子 (TVA) およびシナプス前細胞の標識に必要な狂犬病糖タンパク質遺伝子 (RG) を最初に導入する。大脳新皮質の 2/3 層および 4 層に分布する錐体細胞にこれら遺伝子を導入するために、胎生 15.5 日および 13.5 日齢の妊娠マウスを用いて子宮内エレクトロポレーション法を実施する。研究代表者による予備実験で、これら遺伝子を導入された胎児は正常に発達すること、そして遺伝子導入された神経細胞がタンパク質を発現し続けることは確認されている。

B. 遺伝子改変狂犬病ウイルスの作成および感染

既に研究代表者が開発した GFP を発現する遺伝子改変狂犬病ウイルス (RV-GFP) をもとに、トリ白血病ウイルス糖タンパク質 (EnvA) でシュードタイプされた遺伝子改変狂犬病ウイルス (EnvA-RV-GFP) を精製する。EnvA-RV-GFP は通常のほ乳類細胞には感染せず、1 で前処理されたマウスの TVA を発現する各層錐体細胞だけに感染する。その錐体細胞は RG も同時に発現しているため、およそ 3 日でウイルスが逆行性にシナプスを越え、シナプス前細胞が GFP を発現しはじめる。神経細胞の詳細な形態が可視化される感染後 5 日程度で、動物を灌流固定し、脳切片固定標本作製する。

4. 研究成果

本研究では、子宮内エレクトロポレーションと狂犬病ウイルス単シナプストレース法を組み合わせた手法を用いる。妊娠 15 日齢の ICR マウスを用いて、TVA および RG 遺伝子を皮質 2 / 3 層錐体細胞に導入した。その後 EnvA によりシュードタイプされた狂犬病ウイルスを接種した。接種

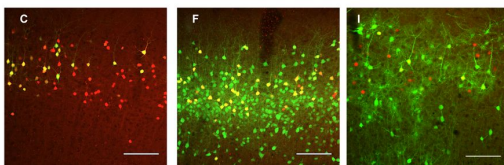


図 1 狂犬病ウイルスによる単シナプストレース法

2 日後にはウイルス感染細胞が TVA 発現細胞に局限していたことから、感染の特異性を確認した (図 1 C、雑誌掲載論文 1)。接種後 4 日後には遺伝子導入細胞周辺に無数の細胞が観察された。狂犬病ウイルスの糖タンパク質はウイルス株ごとに変異が存在するが、ウイルス作成に使用された

株 (HEPG、図 1 I) と異なるウイルス株由来の糖タンパク質が、より効率的に近傍に分布する神経細胞をトレースできることを見出した (SADcvsG、図 1 F)。

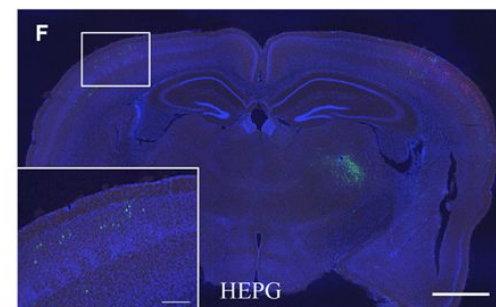
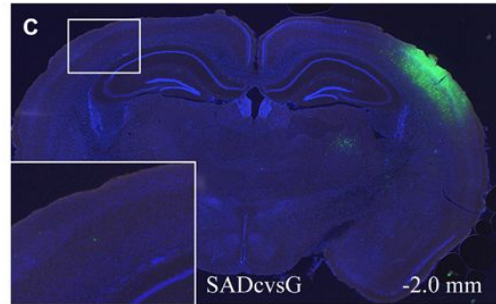


図 2 単シナプストレースによる長距離投射型細胞の可視化

更に、接種動物の全脳組織標本作成し、視床を含む切片標本を解析した (図 2)。その結果、近傍の神経細胞のトレース様式とは異なり、SADcvsG (図 2 C) よりも HEPG (図 2 F) によって視床神経細胞がトレースされることが明らかになった。反対側に投射する皮質錐体細胞も HEPG では効率的にトレースできることから、HEPG は長距離投射型神経細胞のトレースに適していると結論した。一方で、SADcvsG は局所投射型神経細胞のトレースには適しているものの、長距離投射型神経細胞のトレースには適していないことが明らかになった。

妊娠 13 日齢のマウスを用いて同様の実験を実施したところ、4 層に局限して遺伝子導入され、かつその細胞にシナプス入力する神経細胞を可視化することができた。4 層を起点とする単シナプストレースにおいても、2 / 3 層同様に HEPG によって効率良く視床神経細胞がトレースされた。現在

までに、2 / 3層および4層の神経細胞は主要な視床核から主に入力を受けており、その形態的特徴には多様性があることを確認した。

計画段階では予測されなかった、本研究成果として、糖タンパク質の変異によるトレース効率の差異についても述べる。HEPG および SADcvsG は異なるトレース特性を持つだけでなく、グリア細胞に対する感染特性も異なる。HEPG による単シナプス

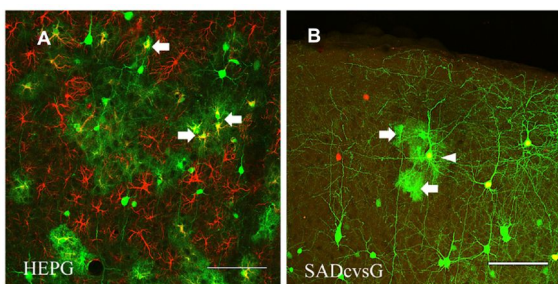


図3 狂犬病ウイルスによるグリア細胞のトレース

トレースは、より多くのグリア細胞を合わせてトレース・可視化してしまう(図3A)ため、トレースされた神経細胞の解析が困難になるという欠点が明らかになった。一方で SADcvsG はごく稀にグリア細胞がトレースされるが(図3B)、トレースされる大部分の細胞は神経細胞であるため解析が比較的容易である。本研究計画では、視床に分布する神経細胞の形態的解析を行っているため問題にはならないが、狂犬病ウイルスを用いた単シナプストレース法の実施において、糖タンパク質の選択は留意すべき点となることが明らかになった。

狂犬病ウイルスを神経トレーサー・ベクターとして使用する上で、ウイルスのもつ細胞毒性軽減は重要である。本研究で使用した HEP-Flury 株に基づく狂犬病ウイルスは、弱毒株であるが、その細胞毒性は不明であった。神経細胞形態を指標として細胞毒性を定量した結果(図4)本ウイルスベクターのもつ細胞毒性は、研究代表者が

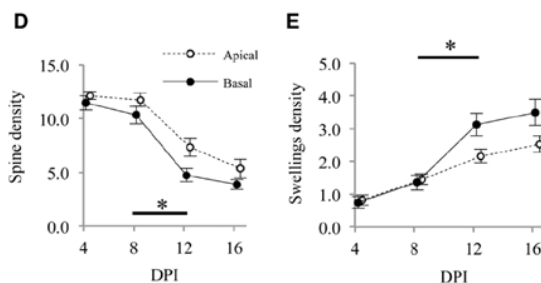


図4 神経細胞形態を指標とした狂犬病ウイルスの細胞毒性

開発した別の狂犬病ウイルスと同様であることが明らかになった。このことから、ウイルスの細胞毒性と動物個体に対する毒性には直接の相関がないことが明らかになった。

糖タンパク質により感染細胞タイプが異なり、弱毒株由来の HEPG によりグリア細胞に対する感染が促進されることを考慮すると、動物個体に対する毒性はグリア細胞に対する感染の有無によって変化すると推察された。現在は、本仮説に基づき、糖タンパク質の変異によるグリア細胞への感染親和性の変化を解析している。

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 2 件)

Ji Won Um, Gayoung Choi, Dongseok Park, Sangmin-Jeon, Hyeeyeon Kang, Takuma Mori, Theofilos Papadopoulos, Taesun Yoo, Yeunkum Lee, Eunjoon Kim, Katsuhiko Tabuchi, and Jaewon Ko.

IQ Motif and SEC7 Domain-containing Protein 3 (IQSEC3) interacts with gephyrin to promote inhibitory synapse formation. The Journal of Biological Chemistry (印刷中) 査読有 Mori T., and Morimoto T.

Rabies virus glycoprotein variants display different patterns in rabies

monosynaptic tracing. (2014)
Frontiers in Neuroanatomy. 2, 47. 査
読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Naoyuki Murabe, Satoshi Fukuda,
Noriko Isoo, Takuma Mori, Hiroaki
Mizukami, Keiya Ozawa, Yumiko
Yoshimura and Masaki Sakurai.
Retrograde monosynaptic tracing with
a recombinant rabies virus reveals
transient monosynaptic connections
between the corticospinal and motor
neurons during development in mice.
Society for Neuroscience (17-21
October 2015, Chicago IL, USA).

村部直之、福田諭、磯尾紀子、森琢磨、
水上浩明、小澤敬也、吉村由美子、桜井
正樹

発達過程における皮質脊-運動ニューロ
ン単シナプス結合の除去: 改変狂犬病ウ
イルスを用いた逆行性単シナプストレ
ーシングによる研究 第38回日本神
経科学大会(2015年7月28-31
日 神戸市)

森琢磨、吉村由美子

マウス海馬CA1における錐体細胞および
介在細胞サブタイプへの異なったシナ
プス入力様式 第37回日本神経科学
大会(2014年9月11日-13日
横浜市)

村部直之、福田諭、森琢磨、水上浩明、
小澤敬也、吉村由美子、桜井正樹

幼若マウス皮質には運動ニューロンと
直接結合する皮質脊髄神経細胞が後半
に分布する: 糖タンパク質欠損狂犬病ウ
イルスを用いた単シナプス逆行性ト
レーシング 第37回日本神経科学大
会(2014年9月11日-13日 横
浜市)

〔図書〕(計 1 件)

森琢磨(分担執筆)脳神経外科医が知っ
ておくべきニューロサイエンスの知識
(14神経栄養因子)文光堂(2015)
37-39

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 琢磨 (MORI, Takuma)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 70545798