

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 投射先特異的な単一神経細胞を起点とした
狂犬病ウイルストレーシング法

氏名 正木 佑治

論文内容の要旨

脳内では、多様な神経細胞がシナプスを介して接続し、複雑な神経回路を構成している。カハールらはゴルジ染色法を用いた脳切片の顕微鏡観察を行い、神経細胞は一つ一つが独立した細胞であり、多数の神経細胞が相互に情報伝達を行うことで、脳内の情報処理が行われることを見出した。以降、神経解剖学は神経細胞の染色法と顕微鏡の開発とともに発展してきた。近年、ウイルスベクターにより神経細胞へ蛍光タンパク質を発現させ、生体内の神経細胞をイメージングする技術が確立されている。特定の脳領域に入力する投射神経細胞を標識する場合、一般的に cholera toxin subunit B (CTB) や retrobeads、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) やレンチウイルスベクターなどを標的の脳領域に微量注入することで解剖学的解析や機能的解析が進められてきた。しかし、これらの方法ではどの神経細胞とどの神経細胞がシナプス接続しているのかを同定することは不可能であった。一方で、ウイルスベクターの一つである狂犬病ウイルスベクターは、シナプスを介してシナプス前細胞へと逆行性に感染する経シナプス感染能を有していることから、神経回路を可視化する有用なツールとして広く使用されている。狂犬病ウイルスベクターを用いて特定の細胞の神経回路を解析するために、G 欠損型狂犬病ウイルスベクター (RVΔG) のエンベロープをトリ白血病肉腫ウイルス由来のエンベロープである EnvA に置換し (EnvA-RVΔG)、EnvA の受容体である TVA を標的細胞にのみ発現させることで、標的細胞特異的なウイルス感染法が開発された。このシステムを用いることで、標的神経細胞へ入力するシナプス前細胞群の解剖学的分布と機能を全脳レベルで網羅的に明らかにすることができる。

大規模な神経回路は、基本的な演算処理構造である回路モチーフの組み合わせにより構成されている。個々の回路モチーフは興奮性神経細胞と抑制性神経細胞から構成されており、情報の統合、分配、選別、増強、減弱などを実行する。回路モチーフは多様な動物種のあらゆる脳領域で使用される神経回路の基盤であるにも関わら

ず、技術的な限界から包括的な理解は進んでいない。そこで著者は、単一神経細胞を起点とした狂犬病ウイルストレーシング法（単一神経細胞ネットワーク標識法）に着目した。この手法は、脳内の単一神経細胞と、その細胞へ入力するシナプス前細胞群を網羅的に解析できる唯一の方法であり、特定の神経回路に組み込まれる回路モチーフを同定することで、神経回路の情報処理機構を解明できる。しかしながら、単一神経細胞ネットワーク標識法は極めて複雑で実験効率が低いことが長らく課題であった。そこで著者は、分子生物学的な改良により、単一神経細胞ネットワーク標識法の効率を改善する条件を見出した。さらに、内因性信号光学的イメージングと AAV を用いた逆行性神経細胞標識を組み合わせることで、投射先特異的な単一神経細胞を起点とした狂犬病ウイルストレーシング法を考案し、以下の新知見を得た。

まず、動物個体ごとの脳の領域構造を同定するために、内因性信号光学的イメージング法の構築を行った。本手法では、成体マウスにチェッカーフラッグ柄のバーが水平方向および垂直方向へ動く視覚刺激を呈示した際に活動する脳領域を、血液動態の変化を利用して特定した。視覚刺激選択的に応答した脳の活動シグナルから、視覚野のレチノトピーマップを算出し、マウス大脳皮質の 1 次視覚野 (V1) および複数の高次視覚野の領域構造を正確に同定した。さらに、透明な歯科用セメントを塗布することで頭蓋骨の透明度を上げ、経頭蓋イメージングを行い、V1 と 8 つの高次視覚野領域の構造を同定した。このシステムにより、マウスの開頭手術を行う前に個体ごとの脳の領域構造を詳細に同定することが可能となった。

次に、単一神経細胞ネットワーク標識の効率改善を試みた。TVA には GPI アンカー型の TVA800 と膜貫通型の TVA950 の 2 つのアイソフォームが存在する。狂犬病ウイルストレーシングにおいて、EnvA と TVA の相互作用は、EnvA-RVΔG の一次感染効率に直結する重要なファクターであるにも関わらず、2 つのアイソフォームと EnvA の親和性や、TVA の発現量と一次感染効率に関する定量的な解析はされていなかった。これまでの *in vivo* における単一神経細胞ネットワーク標識法を用いた研究では TVA800 が使用されてきた。しかしながら、培養細胞を用いた先行研究において、TVA950 は TVA800 に比較しウイルス粒子の取り込み速度が早いこと、さらに、TVA の発現量の増加にともない一次感染効率が上昇することが報告されている。そこで本研究では、まず TVA の発現量の増加や 2 種類の TVA アイソフォームによる、生体内での EnvA-RVΔG の一次感染効率の違いを検証した。まず、pCMMP-TVA800 (CMV プロモーターの下流に TVA800 遺伝子を有する) をマウス V1 の単一神経細胞へ 2 光子顕微鏡下にてエレクトロポレーションにより導入し、導入細胞周辺に EnvA-RVΔG-DsRed を微量注入した。EnvA-RVΔG-DsRed 注入後に生存していた細胞のうち 42% (5/12) の細胞において一次感染が認められた。次に、この 1 次感染効率を向上するために、TVA の発現量を調節するプロモーターおよび 2 つの TVA アイソフォームの比較を行った。EF1a プロモーターは CMV プロモーターと比較して、幅広い細胞種で高い転写活性を示すことから、EF1a プロモーターの下流に TVA 遺伝子をコードした pEF1a-TVA800 および pEF1a-TVA950 を作製した。これらプラスミドを Neuro-2A 細胞

に導入したところ、*TVA* mRNA 量が有意に上昇した。次に、生体内においても比較するために、各プラスミドをマウス V1 の単一神経細胞へ導入し、EnvA-RVΔG-DsRed を微量注入した。その結果、pEF1a-TVA800 発現細胞のうち微量注入後に生存していた細胞の 50% (3/6) において一次感染が認められたが、その後の経シナプス感染が成立した細胞はわずか 17% (1/6) であった。一方で、pEF1a-TVA950 発現細胞のうち微量注入後に生存していた細胞の 80% (4/5) において一次感染が認められ、全ての細胞で経シナプス感染が成立した。このことから、TVA950 を高発現することで生体内の RVΔG を用いたトレーシング効率が大きく上昇することが明らかとなった。

続いて、内因性信号光学的イメージングと単一神経細胞ネットワーク標識法を組み合わせ、領域特異的な単一神経細胞ネットワークの構造を全脳レベルで解析した。その結果、V1 内の単一神経細胞ネットワークは、V1 内局所回路を形成するシナプス前細胞の層分布の違いにより、全脳レベルでのシナプス前細胞の分布様式が大きく異なることが明らかとなった。さらに、高次視覚野の anteromedial area (AM) と posteromedial area (PM) の単一神経細胞ネットワーク解析により、各領域の単一神経細胞ごとに独自のネットワーク構造を有していることが示唆された。

次に、大規模な神経回路に組み込まれた回路モチーフを同定するために、投射先特異的な単一神経細胞を起点とした狂犬病ウイルストレーシング法を構築した。マウスの開頭手術前に内因性信号光学イメージングを行い、視覚野の領域構造を同定した後に、PM に AAV2-retro-CAG-tagBFP-FLAG×3 を微量注入し PM 投射 V1 神経細胞を逆行性標識した。その蛍光標識した細胞に 2 光子顕微鏡下で pEF1a-TVA950 をエレクトロポレーションにより導入し、EnvA-RVΔG-DsRed を微量注入し、PM 投射 V1 単一神経細胞ネットワークを標識した。その結果、長距離投射神経細胞を組み込んだ投射先特異的な神経回路構造が観察された。投射先を限定した単一神経細胞ネットワークは、V1 の多様性に富んだ単一神経細胞ネットワーク構造と比較してより均一であり、V1 内に投射特異的な独自の回路モチーフが存在した。以上、内因性信号光学的イメージングと AAV を用いた逆行性神経細胞標識を組み合わせることで、特定の領域に投射する単一神経細胞ネットワークの標識に成功した。そして、投射先特異的な単一細胞ネットワークが、大脳皮質における情報伝達の選り分けを担い、大脳皮質の機能分化の基盤であることが示唆された。

著者は、RVΔG トレーシングを用いた単一神経細胞ネットワーク標識法を最適化し、特定の領域の単一神経細胞ネットワーク、さらには特定の領域に投射する単一神経細胞ネットワークの標識を可能にした。本手法は、単一神経細胞がどのような細胞集団からの入力を統合し、統合した情報をどの領域へ伝達するかを明らかにすることができる。本研究の独自の手法を用いることで、並列階層的な情報処理における単一細胞ネットワークの役割を解剖学的に明らかにすることを可能とした。本研究は、生体内におけるウイルス感染様式について重要な知見を提供すると同時に、神経回路の情報処理様式の理解に大きく貢献すると期待される。