

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 鈴木 俊章

論 文 題 目

直交型感染性ウイルスベクターを用いた
新規神経回路解析システムの開発

論 文 審 査 担 当 者

主 査	名古屋大学准教授	小 坂 田 文 隆
委 員	名古屋大学教授	饗 場 浩 文
委 員	名古屋大学教授	人 見 清 隆
委 員	名古屋大学准教授	加 藤 竜 司

論文審査の結果の要旨

21世紀は「脳の世紀」と謳われて10余年が経ち、脳に関する様々な発見がなされてきた。しかし、未だ謎は多く残されている。これまでに遺伝子や分子の挙動といったミクロな視点から、領野毎の機能解析等のマクロな切り口まで様々なレベルの研究がなされてきた。しかし、個々の神経細胞を素子とする神経回路がどのように構成され機能するかというメゾスコピックな視点からの理解は遅れている。近年、このメゾスコピックな回路レベルでの解析手法として、*optogenetics* やウイルスベクター等の分子生物学ツールが開発された。しかしこれらの手法では、高次脳機能を生み出す神経回路間の相互作用を明らかにすることはできなかった。そこで鈴木氏は本研究において、単一個体で複数の神経回路を同時に標識できるG欠損型狂犬病ウイルスベクター(RVΔG)の新規ツールを開発し、以下の新知見を得た。

RVは感染細胞からシナプスを介して逆行性に感染を拡げる。このシナプスを介した感染にはエンベロープ糖タンパク質Gが必要である。この性質により、Gを発現する細胞にRVΔGが感染した際、その1次感染細胞と単シナプス結合する細胞群にRVΔGが逆行性に2次感染する。さらに、RVΔGを特定の細胞にのみ感染させるために、EnvA/TVAシステムが開発された。トリ白血病肉腫ウイルス(ASLV)由来エンベロープEnvAで偽型したRVΔGは、EnvA特異的な受容体であるTVAを認識し、ウイルス感染が成立する。この性質を利用して、TVAを発現させた標的細胞にのみRVΔGを1次感染させることができる。これらを組み合わせることで、TVAおよびGを発現する細胞(starter cell)に入力する細胞群を標識でき、神経回路の構造を明らかにすることができる。

しかし、現行のEnvA/TVAシステムでは、TVAを発現する1細胞・集団に由来する神経回路のみしか標識することができず、複数の神経回路の関係性について単一個体を用いた解析はできない。そこで、複数の神経回路を同時に解析するために、異なるASLV株が有する感染系に注目した。EnvA/TVAと独立したRVΔGの感染システムの候補として、EnvB、EnvC、EnvEをエンベロープに選択した。偽型RVΔGを作製するために、細胞内ドメインをGの細胞内ドメインに置換したキメラエンベロープoEnvX(optimized EnvX)を作製した。これらoEnvXは、それぞれ偽型RVΔGを効率良く産生した。oEnvXに対する受容体の特異性を検討したところ、oEnvA-、oEnvB-、oEnvE-RVΔGは各々の受容体であるTVA、TVB、DR46-TVB発現細胞にのみ感染した。

加えて、oEnvAを特異的に認識するTVA⁹⁵⁰、EnvB受容体であるTVB、EnvEを認識するDR46-TVBを最適化した。その結果、*in vivo* single cell electroporationなどの高い発現量が期待できない条件で活用できる高親和性受容体であるoTVB-HとoTVE-H、一般的な神経回路標識に活用でき、受容体に融合した蛍光シグナルでstarter cellを同定できる低親和性受容体であるoTVA-LとoTVB-Lを開発した。

次いで、生体におけるoTVA-L-iRFPとoTVB-L-BFPとの交差性を検証するため、ア

デノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いてマウス大脳皮質一次視覚野 (V1) の異なる集団にそれぞれの受容体を発現させた。その後、oEnvA-RVΔG と oEnvB-RVΔG の混合ウイルスを V1 に微量注入したところ、対応する受容体特異的にウイルス感染が認められた。この結果より、これら oEnvA/oTVA-L および oEnvB/oTVB-L の感染システムは *in vivo* にて同時に使用できることが示された。

本研究にて得られた oEnvA/oTVA、oEnvB/oTVB システムを用いて、異なる 2 種の神経回路の関連を明らかにする目的で、① 投射先が異なる神経回路、② 細胞種が異なる神経回路に着目し、成体マウスの 2 種類の細胞集団について同時に経シナプス標識を行った。①中脳上丘へ投射する V1 の第 5 層神経細胞に AAV を用いて oTVA-L-iRFP と G を、高次視覚野 LM へ投射する V1 の第 5 層神経細胞に oTVB-L-BFP と G を発現させた。2 週間後に oEnvA-RVΔG-DsRed と oEnvB-RVΔG-GFP の混合ウイルスを感染させた。その結果、RVΔG-DsRed あるいは RVΔG-GFP の 2 次感染細胞は多数の脳領野に分布したが、両者の共感染細胞は認められなかった。以上の結果より、異なる領野へ出力する 2 種類の V1 の第 5 層細胞は、互いに独立した入力情報を統合・処理し、統合した情報を特定の領野へ出力していることが示唆された。

② V1 の抑制性神経細胞と第 5 層の興奮性神経細胞が構成する神経回路の違いに着目した。細胞種特異的プロモーターと Cre/loxP システムを用いて、対象の細胞に oTVA-L-iRFP と oTVB-L-BFP をそれぞれ発現させ、oEnvA-RVΔG-DsRed と oEnvB-RVΔG-GFP を注入した。その結果、RVΔG-DsRed と RVΔG-GFP の共感染細胞が、V1 だけでなく、V1 に視覚情報を入力することが知られている外側膝状体にも認められた。以上の結果より、V1 の抑制性神経細胞と第 5 層の興奮性神経細胞は、外側膝状体の神経細胞からの共通入力を受けることが示唆された。本回路解析法を用いることで、外側膝状体の神経細胞が V1 の第 5 層細胞および抑制性細胞の両者に入力する新たな情報伝達様式を見出すことに成功した。

以上、鈴木氏は新規ウイルス感染システムを開発することで、RVΔG による神経回路標識の多重化を可能にした。直交型感染性ウイルスベクターを用いた本神経回路解析法は、これまでに挑戦できなかった複合的な神経回路解析の基盤技術になり、神経回路の情報処理の仕組みの理解に大きく貢献すると期待される。本研究成果は、脳機能の解明および神経・精神疾患の病態解析や病因究明に資する極めて重要な基礎的知見を提供するものである。

よって、本論文は博士 (創薬科学) の論文として価値あるものと認める。さらに、2019 年 12 月 10 日に本論文とそれに関する口頭試問を行った結果、合格とした。