

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目 マウス初期視覚系における情報統合機構の神経解剖学的解明

氏 名 沖川 沙佑美

論 文 内 容 の 要 旨

我々は、外界から受容する視覚・聴覚・体性感覚などの感覚情報や、学習・記憶・情動などの自己情報に基づき、環境の変化に柔軟に対応し、状況に応じた最適な行動を選択し実行する。感覚器から受け取る情報のうち、視覚が占める割合は 80～90%と非常に大きい。視覚情報は網膜で受容され、脳に伝達されることで知覚・認知に至る。その際、膨大な量の視覚情報は並列階層的に処理され、光の電気信号への変換、画像情報の符号化、局所的な情報抽出、画像認識という段階を経て知覚される。網膜の視細胞で受容された視覚情報は、網膜内局所回路により様々な視覚属性に分けられ、視覚属性ごとに網膜神経節細胞 (RGC) の活動電位として圧縮される。分けられた視覚属性は、異なるタイプの RGC から外側膝状体背側核 (dLGN) を経由し、大脳皮質の一次視覚野 (V1) へと並列階層的に伝達される。マウスでは 40 種を超えるサブタイプの RGC が存在し、各サブタイプはその軸索を別の脳領域に投射する。視覚情報が、網膜の RGC で視覚属性ごとに分けられ情報伝達されることは解剖学的な解析により示されているが、分離された視覚情報がどのように統合されるのかは未だ不明点が多い。

また、我々の脳は不均一な神経細胞集団により構成され、個々のサブタイプの神経細胞は固有の機能を担う。これら多様な神経細胞が精密な神経回路を形成し情報処理を行うことで、知覚や認知、意識などの脳機能が生まれ、脳の複雑さが生じる。したがって、多彩な脳機能を理解するには、精緻な神経回路構造を細胞種レベルで解明することが重要である。細胞種特異的に Cre を発現する遺伝子改変マウス系統を用いた研究や神経トレーサーを用いた研究により、どの細胞種がどの領域に接続しているのかを特定することができる。しかしこれらツールの特性上、細胞－細胞間接続の可視化は困難であり、どの細胞種と細胞種がシナプスを介して神経回路を構築するのかは明らかとなっていない。また、一種類の Cre マウス系統で標識できる細胞種の中には、遺伝子発現の異なる細胞種、形態学的あるいは電気生理学的特徴が異なる細胞種が含まれることが多い。より細かな細胞種の分類と解析が必要であるが、膨大な細胞種を

網羅することの限界やマーカーの制限により、中枢神経系における細胞種特異的な解析は未だ不十分である。

そこで著者は、ウイルストレッシング法およびゲノム編集技術を駆使することで、細胞－細胞間接続を可視化した神経回路解析、さらには、同一領域内における細胞集団の分離に成功した。本技術をマウス初期視覚系に適用し不均一な細胞種を分離することで、初期視覚系の情報統合機構の一端を、以下の通り解剖学的に明らかにした。

1) dLGN shell/core における細胞種あるいは層特異的な情報統合の解剖学的解析

初期視覚系の主経路を構成する dLGN は、core 領域と shell 領域の 2 つに分離でき、各々異なる情報処理を担う。加えて dLGN は視覚応答だけではなく、運動依存的な活動を示すこと、選択的注意により神経活動を変化させることが明らかになっている。そこで dLGN に焦点を当て、core 領域および shell 領域における情報統合機構を解剖学的に明らかにすることを目的とした。

マウス dLGN core と shell は極小領域であり、境界も曖昧で個々のマーカーも同定されていないため、標的とすることが技術的に困難である。そのため、2 領域を区別した詳細な解析はこれまで実施されていない。筆者は、dLGN shell 領域と core 領域とを分離して解析するため、ウイルスの局所感染を可能とする iontophoresis injection 法を導入した。次いで、各 dLGN 領域に入力するシナプス前細胞を同定する目的で、経シナプス感染能を制御可能な G 欠損型狂犬病ウイルスベクター (RVΔG) を用いた。アデノ随伴ウイルスベクターである①AAV2-syn-iCre ②AAV-FLEX-TVA ③AAV-CAG-RV glycoprotein (G) の混合液を iontophoresis injection により、マウス成体脳 dLGN 領域に微量注入し、その後、TVA に結合する EnvA をエンベロープに有する RVΔG (EnvA-RVΔG) を dLGN に注入することで、dLGN core あるいは shell 領域特異的に入力する細胞群を網羅的に標識した。本手法はシナプス前細胞とシナプス後細胞の両方を可視化することができるため、injection 部位の特定に加え、従来法では実現できなかった細胞レベルでの神経接続の解析が可能である。

本研究により、dLGN core 領域の興奮性神経細胞は、網膜 alpha-RGC、V1 第 6 層の興奮性神経細胞、上丘浅層(sSC) の興奮性 stellate 細胞と抑制性 horizontal 細胞、上丘中間層 (iSC) の 3 種の神経細胞、膝状体間葉 (IGL) の 2 種の神経細胞から、外側膝状体腹側核 (vLGN) のうち vLGNe (external vLGN) 下層と vLGNi (internal vLGN) の 4 種の神経細胞から、視床網様核 (TRN) の抑制性神経細胞および被蓋前核 (PT) の神経細胞から入力を受けることが明らかになった。一方、dLGN shell 領域は、網膜 alpha-RGC と DS-GC、V1 第 6 層、sSC、vLGNe 上層と下層、TRN、PT、二丘傍核 (PBG) からの入力を受けることが示された。ただし、iSC、IGL および vLGNi から dLGN shell 領域へは入力がなかった。以上の結果より、dLGN core 領域および shell 領域が構成する神経回路構造の解剖学的な違いが明らかになった。本解剖学的結果より、dLGN core 領域は shell 領域と比較し、視覚情報に加えてより多くのマルチモーダルな情報を統合・処理することが示唆された。dLGN が網膜と V1 との単純な中継地点として機能すると

いう一般的な概念とは異なり、本研究では、dLGN core 神経細胞は、非イメージ形成や運動情報などを含むマルチモーダルな情報を統合するという解剖学的証拠を示した。本結果より dLGN の異なる 2 領域は、細胞種および層特異的に異なる情報を統合・処理し、各々の収束情報を V1 の特定の集団に伝達し、視知覚や視覚誘導性行動において異なる役割を担うと考えられる。

2) 成体脳で同一領域内の異なる神経細胞種を可視化するゲノム編集技術

著者は、dLGN の core 領域および shell 領域は、V1 第 6 層の多種多様な細胞群より入力を受けることを明らかにした。しかし、異なる細胞形態を有する V1 第 6 層の細胞群の役割は未だ不明である。そこで、遺伝子発現パターンの異なる細胞種を *in vivo* で分離し、網羅的かつ効率的に細胞種特異的な解析を実施する手法の確立を目指した。

V1 第 6 層に存在する神経細胞は、形態学的に少なくとも 3 種存在することが報告されているが、各サブタイプ特異的なマーカー遺伝子は同定されていない。そのため V1 第 6 層に多様な細胞が存在するにも関わらず、これら細胞集団を分離した機能解析は困難であった。著者は Allen Institute の single cell transcriptome および *in situ* hybridization のデータより異なる 3 種類の V1 第 6 層神経細胞のマーカーとして *Ctgf*, *Sla*, *Rgs12* を見出した。マウス成体脳で細胞種特異的な解析を実現するため、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を用い、各遺伝子の 3'UTR 部位に GFP を *in vivo* でノックインすることで各細胞サブタイプの可視化を試みた。非分裂細胞である神経細胞において、非相同末端結合による修復機構を介して効率良くノックインを生じるように、ドナー配列の両端に Cas9 認識配列を設計した。次いで、ノックインに必要な Cas9 を発現する AAV-Cas9 およびガイド RNA およびドナー配列を含む AAV-U6-gRNA-donor を作製後、成体マウスの V1 領域に 2 つの混合液を局所注入し、*in vivo* で局所的なゲノム編集を実施した。V1 第 6 層のマーカー遺伝子である *ctgf*, *sla* および *rgs12* の遺伝子座をそれぞれ標的とした結果、V1 の第 6 層に GFP 陽性細胞が認められた。以上の結果より、成体脳の神経細胞の特定の遺伝子座にノックインすることで、遺伝子発現の異なる細胞種を分離できることが明らかになった。本手法は、ノックインするタンパク質を変更し、イメージングや光遺伝学へ応用することで、細胞種レベルでの神経活動の解析および制御も可能になると期待できる。また、前章の成果と併せることで、dLGN core あるいは shell 領域が、第 6 層の多様な細胞集団からどのような入力を受けるのかを詳細に解析でき、視覚初期段階の情報統合機構の更なる解明に繋がると期待される。

以上、本研究成果は、脳機能の理解や感覚情報処理機構の解明に資する極めて重要な基本的知見を提供するだけでなく、神経回路破綻による視覚関連疾患の新規治療への応用、幹細胞由来神経細胞の移植後の神経回路再構築への応用など、医薬品を用いた予防・治療法の開発および再生医療の実現に貢献すると期待する。