

研究終了報告書

「比較光遺伝学: 社会行動を司る神経回路の進化」

研究期間: 2018年4月～2021年3月

研究者: 宮道 和成

1. 研究のねらい

幼児が言語を用いてものごとを概念に分類して理解していくのと同じように、神経科学者は混沌とした脳組織の中に、「ニューロンの種類」という分節線を引くことによって、その発生や機能を明瞭に捉えることができるようになる。本研究は光遺伝学を含めた遺伝子工学的手法を目的の種類ニューロンに特異的に発現させる制御技術の高度化と、それを用いた比較神経科学の拡張を目指した。ニューロンの種類を規定する上で重要な要素は、遺伝子発現プロファイル、軸索投射パターン、神経活動のパターン(受容野)である。現状、これらの指標に基づいて高い解像度で発現操作を実現しているのは遺伝子改変技術の発達したマウスに限られており、他のほとんどの哺乳動物では、エフェクタータンパク質をごく大雑把に目的の脳領域に発現させることしかできない。さまざまな哺乳動物においてマウスと同程度の発現制御技術が実現されると、マウスの実験で観察された現象が種特異的なのか、それとも哺乳動物の間で普遍的に保存されたものなのかを決定できる。これによって、ヒトへのトランスレーショナルな応用に値する現象を選び出すことができる。さらに、高度な社会性や複雑な学習課題あるいは優れた視覚などマウスでは研究の難しい課題へのアプローチも開かれる。そこで本研究の第一段階ではウイルスベクターを用いた CRISPR *in situ* ゲノム編集技術やウイルスベクターにおいて駆動できるミニエンハンサーを用いて、遺伝子改変動物を使わない“オールウイルス”遺伝子工学の実装を目指した。第二段階では、まずマウスにおいて新規の生命現象を探索・解析し、その後、上記のオールウイルス遺伝子工学のプラットフォームに提供することで種間保存性の研究へと展開することを企図した。

2. 研究成果

1) 概要

本研究の第一段階では、遺伝子改変動物を使うことなく特定のニューロン群に遺伝子工学ツールを高発現させられる系の実装を目指した。アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて CRISPR ゲノム編集を成獣の脳内で駆動し、*Cre* 遺伝子を任意の遺伝子の制御下にノックインする系を試みた。通算 25 種類のドナーAAV を作製し、マウスや非遺伝学モデル動物の大脳皮質において検討したが、ドナーとして用いる AAV ベクターからの非特異的な *Cre* 活性(リーク)を完全に制御することができず、細胞種特異的な遺伝子発現パターンを再現するノックインを高効率に起こす系は確立できなかった。そこで代替戦略として AAV ベクターに搭載可能で細胞種特異的にトランスジーンを発現させられるミニエンハンサーを収集し、視床下部室傍核のオキシトシン (Oxt) ニューロン、外側核の MCH ニューロン、および汎抑制性ニューロンに特異的にトランスジーンを導入することのできる AAV ベクターを得た。

次に、室傍核 Oxt ニューロンを対象に神経回路の構造・機能に関する種間比較を目指し、まずマウスにおいて Oxt ニューロンに逆行性トランスシナプス標識を適用した。約 60 の脳領域に分布する入力パターンを定量的に解析し、新規の入力領域を多く発見した。さらに Oxt ニュ

一ロンへの入力パターンを非妊娠期、妊娠期、授乳期の雌でそれぞれ比較し、妊娠期特異的に変動する入力ニューロンの領域・種類を同定した。また、雄マウスが交尾・仔の誕生に伴い仔への攻撃行動を抑制し養育行動に転じる変化に着目し、交尾未経験雄マウスと父マウスの神経回路を比較することで、Oxtニューロンへの入力に変化する入力ニューロンの領域・種類を同定した。これら知見は、ライフステージの変化に伴うマクロスケールの神経回路再編を示すものである。現在までにこの回路再編の機能を探る過程で、雄マウスの養育行動におけるOxtの必要・十分性を遺伝学的に証明したり、雌マウスの授乳期におけるOxtニューロンのリアルタイムCa²⁺イメージングに初めて成功するなどの成果をあげて論文を準備中である。種間比較に関し、ラットにおいて室傍核Oxtニューロンを薬理遺伝学的に操作する系を構築したのに加え、齧歯類を超えて食肉目モデルでもこのミニエンハンサーが高い特異度でOxtニューロンの操作系に利用できることを示した。

(2) 詳細

研究テーマ 1: 細胞種特異的な遺伝子導入系の検討

本研究の初期段階では AAV ベクターを用いた非相同組み換え (HITI 法) により Cre 遺伝子を任意の遺伝子の制御下にノックインする系を試みた。まず、ドナーとして機能的な open reading frame (ORF) を持つ Cre 遺伝子を導入すると、AAV ベクターに内在するプロモータ活性によってノックインの有無にかかわらず Cre が十分量発現してしまうことが分かった。そこで Cre の ORF から開始コドン (ATG) を極力排除した変異体 Cre をドナーとし、splice acceptor と 2a peptide を介して目的遺伝子のイントロン内にノックインする手法を探った。しかし、AAV ベクターやトランスジーン内に内在する splice donor 様の配列を介して、同一 AAV 粒子の転写産物内部、または異なる AAV 粒子の転写産物間で様々なパターンで RNA splicing が発生し、機能的な Cre の発現が起きてしまうことが分かった。これを阻止するため、様々な保護機構を考案したが奏功せず、また、遺伝子の coding end にノックインする戦略も十分な特異性を得ることができなかった。このように計 25 種類もの AAV を作製してマウスや非遺伝学モデル動物の脳皮質において検討を進めたが、ドナーとして用いる AAV ベクターからの非特異的な Cre 活性 (リーク) を制御することができず、細胞種特異的な遺伝子の発現パターンを再現するようなノックインを高効率に起こす系の確立を断念せざるを得なかった。

そこで代替戦略として AAV ベクターに搭載可能で細胞種特異的にトランスジーンを発現させられるミニエンハンサーを収集し、視床下部室傍核のオキシトシン (Oxt) ニューロン、外側核の MCH ニューロン、および汎抑制性ニューロンに特異的にトランスジーンを導入することのできる AAV ベクターを得た。これらはいずれも標的脳領域において特異度 90% 以上、導入効率最大 80% 超の性能で、目的の種類ニューロンを標識できた。そこで本研究では室傍核 Oxt ニューロンに的を絞って以後の実験を行った。

研究テーマ 2: 雌マウスにおける妊娠・出産に伴う Oxt 神経回路の変化

Oxt は室傍核と視索上核の Oxt ニューロンから産生される神経ホルモンで、脳下垂体後葉から血中に分泌される。雌においては出産時の子宮収縮や授乳時の射乳への関与が知られるため、Oxt ニューロンの活動を制御するような上流の神経接続は妊娠・授乳期に構造的な変化を示す可能性を考えた。そこで、狂犬病ウイルスを用いたトランスシナプス標識法を導入し、脳全域におけるシナプス前細胞の分布を脳切片において調べた(図 1)。約 30 の脳領域に

おける入力を定量的に解析し、従来知られていない入力領域・細胞を多く見出した。入力細胞の約 8 割は視床下部の広範な神経核に分布した。視床下部以外に入力経路としては、循環系の浸透圧情報等をモニターする脳下弓器官(SFO)、フェロモン(鋤鼻嗅覚)系からの入力を受ける分界条床核(BST)、臓器からの入力情報を中継する結合腕傍核(PB)等が顕著だった。

次に妊娠による変化を定量するため、非妊娠期、妊娠後期、授乳期における Oxt ニューロンへの入力ニューロンを定量的に比較した(図 2 右)。その結果、前腹側脳室周囲核(AVPV)の興奮性ニューロンや分界条床核(BST)の抑制性ニューロンから Oxt ニューロンへの入力が妊娠後期に顕著に低下し、周産期に速やかに回復する現象を見出した。これはマウスにおいて妊娠に伴ってシナプス接続頻度のレベルで神経回路の再編成が起こることを示す知見である。この現象の機能を探るため、自由行動下のマウスにおいて Oxt ニューロンの活動を長期的・自動的に取得できるファイバーフォトメトリ法を導入し、雌マウスの出産・授乳中の Oxt ニューロンの活動動態を捉え

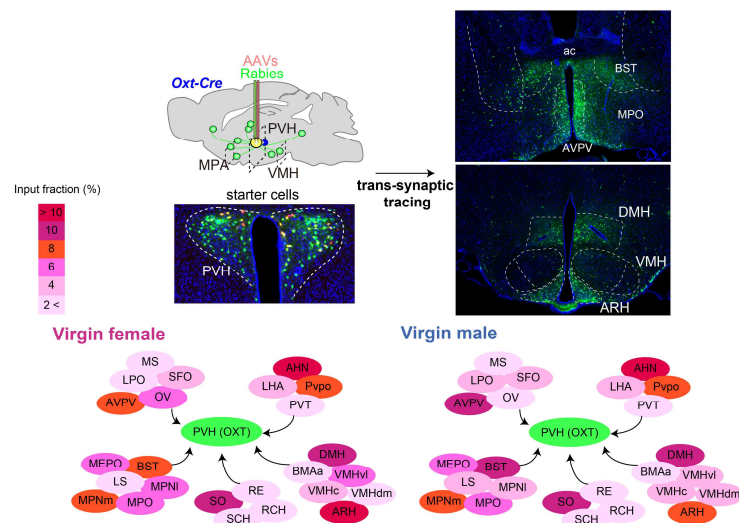


図 1: 室傍核 Oxt ニューロンへのインプットの概観。室傍核 (PVH) の Oxt ニューロンを起点とするトランスシナプス標識を行い、上の写真に示すように starter cells (黄色) から多数の標識 (緑) を得た。下図には雌マウスと雄マウスにおける主な入力領域における標識頻度をヒートマップで示した。

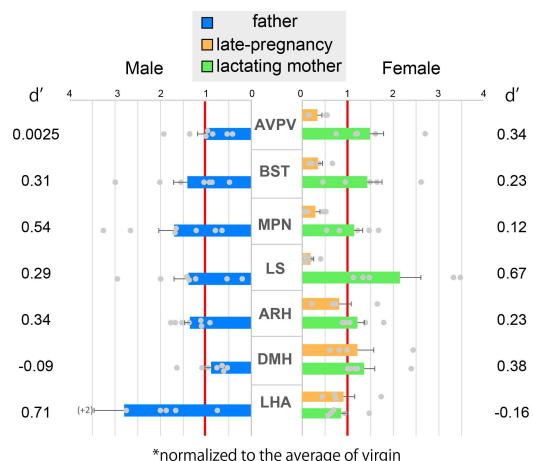


図 2: 室傍核 Oxt ニューロンへのインプットの状態依存的な変動。左側に雄マウス、右側に雌マウスのデータ。それぞれ性未経験個体のデータを用いて標準化した。両端には d' 値を示す。

ることに初めて成功した。

研究テーマ 3: 雄マウスにおける父性養育行動の発動に関わる神経回路の発見

雄マウスは交尾・妊娠雌との同居を経て子殺しが顕著に抑制され養育行動に転じることが知られているが、その神経基盤は分かっていない。Oxt は雌マウスにおける養育行動への関与を示唆する知見があるが、雄マウスの養育行動に関する報告は全くなかった。そこで Oxt 遺伝子の conditional knockout マウスを新規に作出し、室傍核にアデノ随伴ウイルスで Cre を導入したところ、父親になっても全く養育行動を示すことができなくなった。逆に Oxt ニューロンを薬理遺伝学的に強制的に活性化するだけで性未経験雄マウスの子殺しを完全に抑制し父性養育行動を発動させられることが分かった。父親となる際の Oxt ニューロンへの入力の変化をトランスシナプス標識法で調べると、ほとんどの入力に変化がない中で外側視床下部 (LHA) など少数の領域から Oxt ニューロンへの入力が父マウスで数倍程度上昇することを見出した(図 2 左)。

興味深いことに、雌雄のデータを比較すると、Oxt ニューロンへの入力頻度は父親、母親それぞれで性的未経験あるいは非妊娠状態から変化しているが、変化を示す脳領域には性差が見られた(図 2)。例えば雌では外側中隔(LS)からの入力が母マウスで 2 倍以上に増えたが雄ではほとんど変化しなかった。逆に雄では外側視床下部からの入力が 2.5 倍に増えたが雌では全く変化しなかった。このような性的二型的変化がどのようなメカニズムで生じるのかも将来の重要な課題である。

研究テーマ 4: マウスを超えて

テーマ 2・3 で示したような状態依存的な神経回路の変動、或いは同定した神経回路要素の養育行動や授乳生理における機能はマウスに特異的なものだろうか、それともヒトにまで保存された普遍的な現象だろうか。この問題への第一歩として、テーマ 1 に述べた Oxt のミニエンハンサー(ラット由来)により mCherry を発現させる AAV を齧歯類モデルのラットと食肉類モデルのフェレットの室傍核に導入して特異度を検討した。その結果、いずれの種でもこのミニエンハンサーは Oxt ニューロンに高い特異性を持って発現することが分かった(図 3)。フェレットは進化的に齧歯類-霊長類の分化より前に分かれているので、この結果は本 AAV ベクターが霊長類でも Oxt ニューロン特異的に作動する可能性を示唆する。

これらの研究に並行して、ハーバード大学の C. Dulac 教授、理化学研究所 CBS の黒田公美チームリーダー、北海道大学の天野大樹講師ら諸氏と共同研究を展開し、養育行動の神

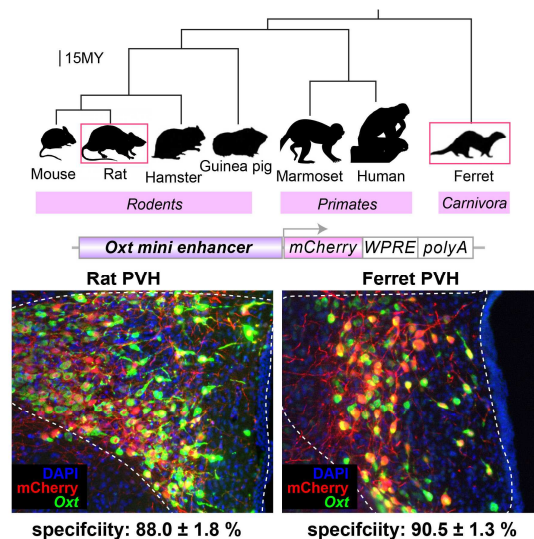


図 3: 同一 AAV ベクターによる齧歯類と食肉類における室傍核 Oxt ニューロン特異的標識

経路解析においていくつかの共同論文を発表した(Kohl *et al.*, *Nature*, Sato K *et al.*, *J Neurosci* 等)。

3. 今後の展開

妊娠に伴う神経回路の変化(テーマ 2)においては、この研究で同定した前腹側脳室周囲核や分界条床核から Oxt ニューロンへの入力を薬理遺伝学的に操作した雌マウスにおいて出産や授乳の表現型およびその際の Oxt ニューロンの活動動態を解明し、論文にまとめる予定である。父性養育行動の神経基盤(テーマ 3)においては、この研究で同定した外側視床下部から Oxt ニューロンへの入力の変化を電気生理学的に解析した後、薬理遺伝もしくは光遺伝学的な操作による父性養育行動の表現型を明らかにして論文にまとめる予定である。いずれの研究も、成獣の哺乳類において視床下部の神経回路が個体のライフステージに応じて変動するという新しいコンセプトを提示しており、今後、同様の現象が他の神経回路にもみられるかという一般性や、神経回路再編の分子・細胞メカニズムや、個体にとっての意義といった big questions に答えを出していきたい。さらに、Oxt ミニエンハンサーを用いて様々な哺乳類種でこのニューロン群を選択的に標識・操作できる(図 5)という知見に基づき、本研究で同定した Oxt ニューロンの状態依存的な変化や Oxt の機能がヒトにおいても成り立つのかどうかを調べる目的で、食肉類モデルや霊長類モデルの研究へと展開していく予定である。

4. 自己評価

本研究ではウイルスベクターを用いた遺伝子工学のスコープの拡張を目指したが、アデノ随伴ウイルスで CRISPR ゲノム編集を駆動し *Cre* 遺伝子をノックインする系の確立に至らなかったのは残念なところである。しかし、迅速に代替戦略としてミニエンハンサーの利用を進め、Oxt ニューロンを標的として将来的に霊長類を含めた比較神経科学に展開するべき核となる発見を複数残すことができたことで、総体としては想定以上の成果を得られたと考える。

本研究は、研究期間の開始と同時に開設した理化学研究所 BDR・比較コネクトミクス研究チームの初期メンバーと協力しながら進めることができ、本さきがけによる支援が円滑な研究室の立ち上げに非常に重要だった。特に、ウイルスインジェクションに必須の定位固定・インジェクション装置や、Oxt ニューロンの活動動態等の調査で必須となっているファイバーフォトメリー系の導入、電気生理学機器の購入、研究補助者の人件費などの支援が無ければ、円滑な実験の進展は不可能であった。

将来的には、本研究で明らかにした成熟した哺乳類の神経回路がマクロスケールで再編成するという新規のコンセプトを深く探求し、その背後にある分子・細胞メカニズムを解明することで、脳の可塑性を操作する新たな技術へと繋げていきたい。また、父性養育行動や出産・授乳の神経基盤の研究を深化させることで、これらの不調もしくは破綻に起因する多くの医療的・社会的困難に対する新たな対応策に貢献していきたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:6件

1. Osakada T*, Ishii KK*, Mori H, Eguchi R, Ferrero DM, Yoshihara Y, Liberles SD, **Miyamichi K***[#], Touhara K[#]. Sexual rejection via a vomeronasal receptor-triggered limbic circuit. *Nat Commun.* (2018) **9**: 4463. (* co-first, # co-corresponding)

幼若なマウスはESP22と呼ばれる涙液フェロモンを用いて雄マウスの性行動を抑制することが知られていたが、ESP22 の雌マウスに対する効果は不明だった。この論文では、ESP22 が雌マウスの性受け入れ行動を抑制することを見出したうえで、その神経機序として、特定の受容体(V2Rp4)と下流の責任神経回路(内側扁桃核→分界条床核→視床下部腹内側核)を同定した。フェロモンをプローブとして、特定の行動を制御する神経経路を同定できる点も評価されている。

2. Kohl J, Babayan BM, Rubinstein ND, Autry AE, Marin-Rodriguez B, Kapoor V, **Miyamichi K**, Zweifel LS, Luo L, Uchida N, Dulac C. Functional circuit architecture underlying parental behaviour. *Nature* (2018) **556**: 326-331.

神経回路の入出力構造を詳細に標識できる cTRIO 法(Schwarz LA, Miyamichi K et al. *Nature* 2015)を提供し、養育行動を制御する視索前野の galanin 陽性ニューロンを出力先ごとに分類して入力構造と機能の分化を検討した。Galanin 陽性ニューロンには中脳中心灰白質、腹側被蓋野、扁桃体内側核に優先的に投射する亜集団があり、それぞれバイアスのある入力を受け取り、養育行動の運動制御、動機付け、および他の成獣個体との社会的接触の抑制をそれぞれ担うという機能分化を見出した。

3. Sato K, Hamasaki Y, Fukui K, Ito K, **Miyamichi K**, Minami M, Amano T. Amygdalohippocampal Area Neurons That Project to the Preoptic Area Mediate Infant-Directed Attack in Male Mice. *J Neurosci* (2020) **40**: 3981-3994.

雄マウスの養育行動を制御する中枢として視索前野が知られていたが、視索前野の活動を上流から制御する神経核の機能についてはよく分かっていなかった。この論文では、扁桃体海馬移行領域と呼ばれる領域に視索前野に投射する興奮性ニューロンを同定し、このニューロン群の活性化が子殺しを促進することを見出した。TRIO 法を用いてこの子殺し促進ニューロンを抑制するような局所の抑制性ニューロンが養育促進ホルモンの Oxt 受容体を発現することを示した。これは父性養育行動が発動するメカニズムについての最初期の研究例となった。

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(主な講演・学会発表)

1. **Miyamichi K**, マウスフェロモンによる性行動制御の神経基盤、感覚器研究イニシアチブ・シンポジウム、大阪、April 2018
2. **Miyamichi K**, Pheromone-triggered limbic circuits that control sexual behaviors in mice. 41st Annual meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, July 2018
3. **Miyamichi K**, マウスのフェロモンによる性行動制御の神経回路基盤、情動研究会 2018、岡崎、Sept 2018

4. **Miyamichi K**, ニューロンタイプ特異的な神経回路の可視化: 達成と展望、日本動物細胞工学会 2019、鹿児島、July 2019
5. **Miyamichi K**, Inada K, Goto H, Dynamics of Oxytocin Neural Circuits in Mice. 43rd Annual meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe (online), July 2020
6. **Miyamichi K**, Reorganization in Hypothalamic Neural Circuits Underpinning Parental Behaviors. NGI symposium 2020, Mishima (online), Dec 2020